

UNIVERSIDADE DO ALGARVE
UNIDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS DOS RECURSOS AQUÁTICOS

ESTUDOS MICROBIOLÓGICOS DA RIA FORMOSA.
QUALIDADE SANITÁRIA DE ÁGUAS E MOLUSCOS
BIVALVES

LÍDIA ADELINA PÓ CATALÃO DIONÍSIO

FARO
1996





UNIVERSIDADE DO ALGARVE
UNIDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS DOS RECURSOS AQUÁTICOS

ESTUDOS MICROBIOLÓGICOS DA RIA FORMOSA.
QUALIDADE SANITÁRIA DE ÁGUAS E MOLUSCOS
BIVALVES

Dissertação apresentada à Universidade do Algarve para
obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas, na
especialidade de Microbiologia

LÍDIA ADELINA PÓ CATALÃO DIONÍSIO

FARO
1996

UNIVERSIDADE DO ALGARVE
SERVIÇO DE DOCUMENTAÇÃO

22/08/00 32074

579
DIO - Est

1

Este trabalho de investigação foi parcialmente subsidiado, durante um período de três anos, pela Fundação Calouste Gulbenkian. Beneficiou também de apoios da Agência Norueguesa para o Desenvolvimento (NORAD) e do Conselho de Reitores das Universidades Portuguesas (Acções Integradas Luso-Espanholas).

Parte deste trabalho foi publicado em: *Journal of Microbiological Methods* 23 (1995) 183-203. 'Evaluation of media for the enumeration of faecal streptococci from natural water samples'.

AGRADECIMENTOS

A realização desta tese de doutoramento só foi possível graças ao contributo de pessoas e instituições a quem gostaria de expressar os meus agradecimentos.

Ao Professor Lloyd Braga, na altura Reitor da Universidade do Algarve e ao Professor Sadat Muzavor a quem devo a ideia e suporte necessário para iniciar este projecto.

Aos meus supervisores Professores J. J. Borrego, G. Rheinheimer e S. Muzavor, pela orientação, sugestões, críticas, compreensão, confiança e incentivos que muito contribuíram para a realização deste trabalho assim como por todos os esforços desenvolvidos para a minha formação científica, pela disponibilidade de meios materiais e humanos durante os estágios que realizei nas instituições e departamentos sob sua responsabilidade. Foi um grande prazer e privilégio trabalhar sob a sua orientação.

À Administração Regional de Saúde do Algarve, Instituição onde grande parte da actividade experimental foi realizada, por todas as facilidades concedidas na utilização de equipamento e materiais sem as quais este trabalho não teria sido possível. Em particular, ao Dr. Jorge Albuquerque, na altura Presidente da Comissão Instaladora e à Dr^a Cecília Rocha, Chefe do Laboratório, pela confiança que em mim depositaram. A todo o pessoal do laboratório, e em particular às Sras D^a. Maria Emília Cabrita e D^a. Maria Isabel Alves Correia, pela forma como sempre me apoiaram, o que torna inesquecível o período que passei nessa Instituição.

Aos Doutores C. Gliesche, R. Cornax, R. Schmaljohann, Eduardo Manzanares e M. A. Moriñigo, pelos ensinamentos sobre técnicas utilizadas em microbiologia e microscopia electrónica.

À Dr^a M. Vitória Vaz Pato e Sr^a D. Deolinda Louro, do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, pelos ensinamentos sobre fagotipia de estirpes.

Aos Doutores K. Gocke, M. Dolores Castro, Marí Carmen Balebona e ao José Manuel Sanchez e à Regina Koppe, por todo o apoio prestado durante os meus estágios em Kiel e Málaga.

Quero também agradecer a todos os que de algum modo contribuíram para a realização deste trabalho, entre eles os meus amigos e colegas, Emygdio Cadima, Lília Brinca, Ana Cristina Cardoso, Rui Cachola e Teresa Baptista. Ao Senhor António Manuel Dias e à Senhora D. Helena Machado pelo apoio gráfico.

Muito especialmente, agradeço ao António e à Mónica, o incentivo e compreensão demonstrados ao longo desta experiência que juntos partilhámos.

RESUMO

O presente trabalho teve como objectivo principal a monitorização das águas da Ria Formosa com vista a contribuir para um melhor conhecimento deste importante ecossistema e para selecção de indicadores microbiológicos da qualidade de águas naturais poluídas.

A amostragem foi efectuada entre 1990 e 1992 e durante este período foram colhidas mensalmente amostras de água em três estações, com diferentes graus de poluição devida à descarga de efluentes urbanos, a fim de avaliar a variação espaço-temporal da abundância microbiana, sua relação com alguns parâmetros físico-químicos e o grau de poluição.

Os parâmetros físico-químicos considerados foram a temperatura, salinidade, concentração de oxigénio dissolvido e transparência. Como parâmetros microbiológicos foram avaliados os microrganismos mesófilos que crescem a 37° e 22° C, saprófitos a salinidades de 35 e 17,5‰, coliformes totais, coliformes fecais, estreptococos fecais, *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* e bacteriófagos de *Escherichia coli* C.

Foi aplicado um modelo de distribuição de probabilidades lognormal às concentrações de coliformes totais, coliformes fecais e estreptococos fecais. Em termos destes microrganismos este modelo permite uma interpretação adequada da qualidade das águas.

O nível de poluição das águas é adequadamente determinado pela concentração de bactérias indicadoras de contaminação, sendo máxima na estação Portas do Mar e mínima na estação Ilha.

Os resultados obtidos mostram que a qualidade microbiológica das águas analisadas está estreitamente ligada às descargas directas de efluentes domésticos.

Em relação aos microrganismos patogénicos, a presença de *Pseudomonas aeruginosa* foi registada com muita frequência nas amostras estudadas, pelo que se sugere a sua inclusão como análise complementar em programas de vigilância da qualidade de águas para fins recreativos.

Os bacteriófagos de *Escherichia coli* C constituem um indicador alternativo de poluição fecal atendendo à simplicidade da metodologia empregue para o seu isolamento e quantificação, e por apresentarem boas correlações com os coliformes fecais.

Adicionalmente, no presente estudo, foram colhidas amostras do molusco bivalve *Mytilus edulis* para comparar o seu conteúdo microbiano com o das amostras de água. Amostras colhidas no mesmo local e na mesma altura, apontam para valores mais elevados nas amostras de moluscos. Estes resultados comprovam a capacidade destes organismos concentrarem microrganismos. Assim, a análise microbiológica das águas de cultivo não é adequada para a avaliação da qualidade dos moluscos bivalves, principalmente quando os níveis de poluição da água são baixos.

Foram efectuados, em laboratório, estudos de sobrevivência, de coliformes totais, coliformes fecais, estreptococos fecais, colifagos de *Escherichia coli* C e K12, fagos somáticos de *Salmonella* e de *Bacteroides fragilis* e fagos F-específicos. Os coliformes fecais e totais foram os microrganismos que revelaram menor sobrevivência.

Não existe ainda uma metodologia padronizada para a enumeração selectiva de estreptococos fecais em águas naturais. O melhoramento dos métodos para a enumeração destes microrganismos constitui uma preocupação importante, pelo que foi realizado um estudo comparativo de meios selectivos para o seu isolamento e quantificação. Para a implementação deste estudo foram colhidas um total de treze amostras de água provenientes da Ria Formosa e poços de água doce dos Concelhos de Faro e Loulé. Foram efectuados estudos das características de diferentes meios de cultura quanto à especificidade, selectividade, eficiência relativa de recuperação, precisão e exactidão, através do emprego da técnica da membrana filtrante com os agares mEnterococcus, KF, BÍlis Esculina Azida (BEA), Kanamicina Esculina Azida (KEA), BÍlis Esculina (BE), Mítis-Salivarius; Acetato de tálio (meio de Barne) e do método do Número Mais Provável usando os caldos Azida Dextrose (meio de Rothe) e Etilo Violeta Azida (meio de Listky).

Os resultados obtidos indicam que nenhum dos procedimentos testados revelam uma selectividade óptima. O método do Número Mais Provável constitui um bom procedimento com base na alta eficiência de recuperação e boa selectividade. Contudo, o agar mEnterococcus usando a técnica da filtração por membrana apresenta a melhor eficiência de recuperação, precisão e exactidão, e também uma boa especificidade.

ABSTRACT

The main objective of the present work was to monitor Ria Formosa waters in order to acquire a better knowledge of this important ecosystem and for the selection of microbiological indicators of the quality of polluted waters.

Sampling was conducted between 1990 and 1992, and during this period, water samples were taken monthly in three stations with different degrees of pollution due to the discharge of urban effluents, to evaluate the spatial and temporal microbial abundance, its relationship with physico-chemical parameters and the degree of pollution.

The following physico-chemical parameters were considered: temperature, salinity, dissolved oxygen and transparency. The microbiological parameters mesophiles at 37° and 22° C, saprophytes at salinities of 35 and 17,5 ‰, total coliforms, fecal coliforms, fecal streptococci, *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* and *Escherichia coli* C bacteriophages were evaluated.

A lognormal distribution model was fitted to the concentrations of total coliforms, fecal coliforms and fecal streptococci. The quality of the water, considering these microorganisms, may be adequately evaluated by this model.

Water pollution is adequately measured by the concentration of bacterial indicators, being maximum at Portas do Mar sampling station and minimum at Ilha.

The results obtained show that the microbiological quality of the water studied is directly related to the discharge from domestic effluents.

The presence of *Pseudomonas aeruginosa* has been frequently detected. For this reason we suggest its inclusion as complementary analysis in the surveillance programmes of waters used for recreational purposes.

Escherichia coli bacteriophages may be used as an alternative indicator of fecal pollution, according to the simple methodology employed for their isolation and quantification as well as the close correlation with fecal coliforms.

In addition, in the present study, several samples of the bilvalve *Mytilus edulis* were collected to compare their microbiological content with those of water samples. Samples collected at the same place and at the same time, always, showed higher values for the mussel samples. These results demonstrate the ability of these organisms to concentrate microorganisms. For this reason, the analysis of water used for cultivation is not adequate to evaluate the microbial quality of the mussels, especially when there is a low degree of water pollution.

Survival experiments were carried out in laboratory conditions. The inactivation in the aquatic environment of total coliforms, fecal coliforms, fecal streptococci, *Escherichia coli* C and K12 bacteriophages, *Salmonella* and *Bacteroides fragilis* somatic phages and F-specific phages were tested. Fecal and total coliforms were the microorganisms that showed the lowest survival.

There is not yet a standard methodology for the selective enumeration of fecal streptococci in natural waters. The improvement of the methods for the enumeration of these microorganisms is an important concern, so a comparative study of selective media for the enumeration of fecal streptococci was performed. A total of thirteen samples from Ria Formosa waters and freshwater from wells from Faro and Loulé were taken. The Most Probable Number method using Azide dextrose broth and Ethyl violet azide dextrose broth, and the membrane filtration technique with the following agars: mEnterococcus, KF, Bile aesculin azide, Kanamycin aesculin azide, Bile-Aesculin, Thallous acetate (Barne's) and Mitis-Salivarius were compared on the basis of their accuracy, specificity, selectivity, precision, and relative recovery efficiency characteristics. The results obtained indicate that none of the above mentioned procedures show an optimal selectivity. The Most Probable Number method was a good procedure on the basis of its high recovery efficiency and good selectivity. However, using the membrane filtration technique mEnterococcus agar showed the best performance characteristics of the enumeration media tested, because this method possessed the best recovery efficiency, precision and accuracy, and also a good specificity.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1
1. Poluição microbiológica do meio marinho.	1
2. Microrganismos patogénicos: Infecções transmitidas por via hídrica.	3
3. Indicadores microbianos da qualidade da água.	6
3.1. Coliformes totais	9
3.2. Coliformes fecais	11
3.3. Estreptococos fecais	11
3.4. Clostrídios sulfito-redutores	16
3.5. Outros indicadores bacterianos	17
3.6. Os bacteriófagos como indicadores de contaminação fecal	18
3.7. Bactérias saprófitas	22
3.8. Número total de bactérias	22
4. Qualidade microbiológica de águas para uso recreativo. Regulamentação higiénico-sanitária.	25
5. Sobrevivência microbiana no meio marinho.	28
6. Poluição microbiológica em moluscos.	33
7. Critérios de qualidade microbiológica para moluscos.	35
OBJECTIVOS	37
CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO	38
1. Situação Geográfica	38
2. Condições climatográficas	40
3. Geomorfologia	40
4. Condições hidrográficas e químicas	41
5. Flora e fauna	43

6. Poluição	44
7. Economia	46
MATERIAL E MÉTODOS	48
1. Material	48
1.1 Zonas de amostragem e colheita das amostras	48
1.2. Periodicidade e número de amostras	50
1.2.1. Estudo sobre a variação espaço-temporal de microorganismos indicadores e patogénios em águas da Ria Formosa	50
1.2.2. Moluscos bivalves	51
1.2.3. Estudo sobre meios selectivos para estreptococos fecais	51
1.3. Microrganismos	51
1.4. Meios de cultura	51
1.4.1. Meios de inóculo e pré-enriquecimento	53
1.4.2. Meios de enriquecimento	55
1.4.3. Meios de enumeração pela técnica da membrana filtrante	55
1.4.4. Meios para contagem directa	57
1.4.5. Meios para provas bioquímicas	60
1.5. Soluções	61
1.6. Reagentes	62
1.7. Corantes	64
1.8. Soros	65
2. Métodos	65
2.1. Processamento das amostras	67
2.1.1. Amostras de água	67
2.1.2. Moluscos	67
2.2. Parâmetros físico-químicos	68
2.2.1. Transparência	68
2.2.2. Temperatura	68

2.2.3. Concentração de oxigénio dissolvido	68
2.2.4. Salinidade	69
2.3. Parâmetros microbiológicos	69
2.3.1. Contagem por incorporação em agar	70
2.3.2. Técnica dos tubos múltiplos e quantificação dos microrganismos pelo método do Número Mais Provável	71
2.3.3. Método de filtração por membrana	73
2.3.4. Método de dispersão usando ansa de Drigalski e Conradi	77
2.3.5. Métodos de contagem directa para a enumeração de bacteriófagos	77
2.3.6. Identificação das bactérias desenvolvidas em meios selectivos para estreptococos fecais	78
2.3.7. Estudo em laboratório sobre a sobrevivência de microrganismos indicadores, em águas marinhas	83
2.3.8. Contagens directas por microscopia de epifluorescência	84
2.3.9. Preparação de amostras para a observação em microscópio electrónico de varrimento	84
2.3.10. Técnicas de microscopia electrónica de transmissão	85
2.3. 11. Tratamento estatístico e informático dos dados	85

RESULTADOS 88

1. Estudo da variação espaço-temporal dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos de águas superficiais da Ria Formosa	88
1.1. Parâmetros físico-químicos	88
1.1.1. Temperatura	88
1.1.2. Salinidade	91
1.1.3. Concentração de oxigénio dissolvido	91
1.1.4. Transparência	96
1.1.5. Relações entre os parâmetros físico-químicos estudados	96

1.2. Parâmetros microbiológicos	100
1.2.1. Microrganismos heterotróficos totais	100
1.2.2. Indicadores microbiológicos de poluição fecal	117
1.2.3. Microrganismos patogénicos	131
1.3. Relações entre microrganismos indicadores e patogénicos	135
1.4. Relações entre microrganismos heterotróficos totais e indicadores fecais	137
1.5. Relações entre parâmetros físico-químicos e microbiológicos	139
1.5.1. Físico-químicos e indicadores de contaminação fecal	139
1.5.2. Físico-químicos e microrganismos heterotróficos	141
1.5.3. Físico-químicos e microrganismos patogénicos	142
2. Estudo comparativo de meios selectivos para o isolamento e quantificação de estreptococos fecais	144
2.1 Prova de crescimento qualitativo	144
2.2. Selectividade	144
2.3. Especificidade	147
2.4. Eficiência de detecção e recuperação de estreptococos fecais	149
2.5. Precisão	149
2.6. Exactidão	154
3. Sobrevivência de indicadores de contaminação fecal no meio ambiente aquático - estudo em laboratório	154
4. Poluição microbiológica em moluscos	162
4.1. Microrganismos indicadores	162
4.2. Microrganismos patogénicos	166
5. Monitorização	166
5.1. Qualidade microbiológica	166
5.1.1. Distribuições de frequências e parâmetros de qualidade microbiológica	166
5.1.2. Índice de contaminação acumulada	179
5.1.3. Classificação das zonas de estudo em conformidade com os critérios definidos pela Organização Mundial de Saúde e Comunidade Europeia	181

5.2. Percentagem de detecção de patogénicos	183
5.3. Percentagem de detecção de patogénicos relacionada com o intervalo de concentração de indicadores	184
5.4. Aplicação de índices	189
5.5. Moluscos bivalves como indicadores de contaminação	193
DISCUSSÃO	195
1. Qualidade microbiológica das águas da Ria Formosa na zona da cidade de Faro	195
1.1. Efeito da temperatura	197
1.2. Efeito da salinidade	198
1.3. Efeito da turbidez	201
1.4. Efeito do oxigénio dissolvido	202
1.5. Microrganismos e sua relação	203
1.6. Métodos de enumeração	217
2. Moluscos bivalves como indicadores de contaminação	220
3. Estudo comparativo de meios selectivos para o crescimento de estreptococos fecais	226
CONCLUSÕES	239
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	241

INTRODUÇÃO

1. POLUIÇÃO MICROBIOLÓGICA DO MEIO MARINHO

A poluição do meio ambiente tem contribuído para pôr em sério perigo o equilíbrio dos diversos ecossistemas e alguns deles de forma irreversível. No caso concreto da poluição hídrica, o maior problema reside na inexistência ou na ineficiência do tratamento dos efluentes, quer de origem doméstica quer industrial e agro-pecuária. O crescimento dos centros urbanos nas zonas litorais tem como principal inconveniente o aumento do volume de efluentes domésticos, com uma forte carga orgânica e microbiológica, que sistematicamente são despejados na costa, tornando-a pouco atractiva para as actividades recreativas e imprópria para a aquacultura.

Está comprovado que em águas contaminadas existe uma maior frequência de doenças entre a população animal residente, assim como um decréscimo do número de peixes e fauna bentónica (Clutter, 1972).

A prática de descargas de esgotos de origem doméstica, agro-pecuária e industrial, sem tratamento prévio, constitui um grave risco relativamente à saúde pública, particularmente no consumo de moluscos, que filtram e concentram no aparelho digestivo as bactérias e vírus presentes na água, entre os quais se encontram alguns patogénicos para o homem (Cabelli *et al.*, 1982; Gerba *et al.*, 1978). Este problema agrava-se com a progressiva incidência em ambientes aquáticos de bactérias resistentes a antibióticos e outros agentes quimioterápicos (Niemi *et al.*, 1983).

De acordo com a natureza dos contaminantes podem distinguir-se três tipos de poluição:

- poluição química;
- poluição física;
- poluição biológica.

O termo poluição é empregue desde há muito tempo, significando para uns sujidade, e para outros alterações da qualidade do meio ambiente produzidas pelo Homem. O termo poluição é, a partir de 1965, sinónimo de “despejo de resíduos” (Pipes, 1982a). Em sentido restricto, poluição marinha significa «alteração desfavorável do ambiente marinho, como resultado das acções do Homem» (Grindley, 1972). A Organização Mundial da Saúde (WHO, 1977a) define a poluição das águas marinhas como: «a introdução pela acção humana no meio marinho, incluindo os estuários, directa ou indirectamente, de substâncias ou energias que podem causar efeitos deletérios, nomeadamente danificar os recursos biológicos, pôr em risco a saúde humana, criar impedimentos às actividades marinhas, incluindo a pesca, diminuir a qualidade da água do mar sob o ponto de vista da sua utilização e da redução das possibilidades da sua utilização com fins recreativos».

De acordo com estas definições, a responsabilidade da poluição das águas é exclusivamente atribuída à acção humana.

O Conselho Internacional de Língua Francesa define poluição como a presença de qualquer substância ou factor que provoque alterações num determinado meio e o resultado da sua acção.

Através desta definição, os três tipos de poluição apresentados podem ter como origem a acção do homem ou de factores naturais.

A alteração do equilíbrio ecológico do meio ambiente e os riscos sanitários derivados da transmissão de microrganismos patogénicos através das águas poluídas, constituem os efeitos negativos da poluição nos ecossistemas aquáticos.

2. MICRORGANISMOS PATOGÉNICOS: Infecções transmitidas por via hídrica.

Os microrganismos telúricos são introduzidos no meio marinho, principalmente através de efluentes não depurados de águas residuais, constituindo estes a principal fonte de contaminação (Wallis, 1977).

O ar também pode servir de veículo de entrada ou disseminação de microrganismos no meio marinho (Baylor *et al.*, 1977). Os ventos que sopram dos continentes para o mar transportam os microrganismos e a chuva facilita a queda desses contaminantes nos rios e oceanos (Brisou, 1976).

Outra possível fonte de contaminação, mas em menor escala, são os banhistas. As águas recreativas que não recebem efluentes fecais podem estar contaminadas com enterovírus do serotipo que predomina nas infecções humanas (Shuval, 1986).

Vários estudos têm demonstrado que as águas residuais misturam-se muito mal com as águas do mar e podem manter-se individualizadas até longas distâncias do local de descarga (Ketchum *et al.*, 1981). Os microrganismos podem manter-se na água em estado livre e a sua dispersão é, neste caso, dependente das condições hidrológicas locais. Se o microrganismo se encontra adsorvido a partículas mais pesadas, vai-se depositando na superfície do sedimento. Dependendo da acção de forças naturais (ondas ou correntes), ou artificiais (dragagens e navegação), os microrganismos no sedimento podem ser ressuspensos e chegar a um hospedeiro humano, seja directamente ou através das cadeias alimentares (Gauthier *et al.*, 1991).

A quase totalidade dos microrganismos transportados até ao mar por águas residuais urbanas, são de origem humana (Gauthier, 1980). No entanto, a maioria das bactérias das águas residuais que têm como habitat o tubo digestivo humano, são, em condições normais, não patogénicas. Além do microbiota saprófita normal das águas

naturais, as águas contaminadas contêm sempre uma maior ou menor quantidade de microrganismos saprófitos e patogénicos, entre os quais se destacam os seguintes:

- **Bactérias:** *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Escherichia*, *Vibrio*, *Mycobacterium*, *Leptospira*, *Staphylococcus*, *Campylobacter*, *Pseudomonas* e *Clostridium*.
- **Vírus:** enterovírus (incluindo o vírus da hepatite), rotavírus, vírus Norwalk.
- **Fungos:** *Candida albicans* e fungos dermatófitos.
- **Ovos de Metazoários:** ténias, ascarídeos, tricocéfalos.
- **Protozoários:** *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Shistosoma sp.* e *Cryptosporidium sp.*

Estes organismos patogénicos podem originar infecções por contacto directo, durante a prática de actividades recreativas ou por consumo de organismos marinhos infectados (Gerba e Goyal, 1978; Volterra *et al.*, 1979; Cabelli *et al.*, 1979, 1982; Martinez-Manzanares *et al.*, 1991, 1992).

A transmissão de doenças por via hídrica está demonstrada em muitos casos, contudo, ainda não existe informação epidemiológica conclusiva, que relacione o agente causal com a poluição do meio aquático. Porém existem provas indirectas que indiciam que o aumento da poluição marinha aumenta a morbidade entre a população para determinadas infecções (Mosley, 1975).

A possibilidade de infecção da população através das águas recreativas, depende se um microrganismo patogénico se encontra nessas águas em algum momento, da sua concentração e capacidade de sobrevivência, da sua dose infecciosa e do seu grau de dispersão.

A ingestão de água ou produtos marinhos contaminados produzem, principalmente, sintomatologias intestinais (Shuval, 1975). Estudos de vários autores, permitiram concluir que o banho em águas poluídas, com resíduos de origem fecal, representam um risco real para a saúde pública, que se traduz em infecções

gastrointestinais, infecções da pele, olhos e ouvidos (Cabelli *et al.*, 1982; Mujeriego *et al.*, 1980a; Mariño *et al.*, 1986; Schirnding *et al.*, 1993). Cabelli (1983), em estudos realizados no Egito, associou o aparecimento de casos de febre tifóide ao banho em águas com contaminação fecal. Doenças da pele ou mucosas podem ser provocadas pelo contacto directo com a água contaminada por *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella sp.* e *Candida albicans*.

Por outro lado nos países subdesenvolvidos, onde não existem instalações adequadas para o tratamento de águas de bebida e usadas, verifica-se que as doenças entéricas transmitidas por via hídrica constituem uma causa importante de morbidade e mortalidade humana. Calcula-se que mais de 10 milhões de pessoas morrem anualmente devido a estas enfermidades (Esrey *et al.*, 1985). Nos países industrializados verifica-se a tendência para o aumento deste tipo de enfermidades (Craun, 1986).

A realização de estudos epidemiológicos são importantes para avaliar os riscos reais de contrair uma doença quando se contacta com águas poluídas. Contudo são de difícil realização e em conformidade com Jones e Watkins (1985), devido principalmente a:

- Falta de estudos retrospectivos para detectar ou relacionar surtos com uma causa comum;
- Ausência de resultados e análises provenientes de amostras representativas;
- Dificuldades em identificar a causa comum;
- Necessidade de considerar sempre um grande número de pessoas que reclamem em simultâneo;
- Períodos longos de incubação das viroses;
- Ocorrência de infecções sem sintomas clínicos observáveis.

Muitas vezes, as conclusões sobre a correlação positiva entre a doença e a poluição da água são duvidosas.

Os coliformes totais e a *Escherichia coli* não se relacionam significativamente com a ocorrência de gastroenterites associadas ao banho. Curiosamente, os enterococos correlacionam-se muito melhor com o grau da doença (Cabelli, 1983).

Apesar de existirem mais de cem tipos de vírus entéricos que podem ser transmitidos por águas contaminadas as evidências epidemiológicas de transmissão de enfermidades através da água estão limitadas ao vírus da hepatite A, vírus Norwalk, rotavírus e outros vírus causadores de gastroenterites (Craun, 1981; Hejkal *et al.*, 1982). Não existem evidências de surtos de doenças de origem vírica relacionadas com o uso de águas recreativas, embora os estudos epidemiológicos desenvolvidos por Cabelli (1983), nos Estados Unidos da América mostrem uma possível relação directa entre o grau de poluição fecal das águas recreativas e a presença de gastroenterites entre os banhistas.

3. INDICADORES MICROBIANOS DA QUALIDADE DA ÁGUA

A detecção de microrganismos patogénicos em águas naturais não é uma técnica de uso rotineiro e segundo Cabelli (1977), Geldreich (1978) e Bonde (1981), devido a:

1. Não existência de uma metodologia simples e padronizada;
2. Baixa concentração em que geralmente se encontram os microrganismos patogénicos;
3. Grande variedade de microrganismos patogénicos que se encontram nas águas poluídas;
4. Inexistência de informação credível relativamente às doses mínimas infecciosas.

Estes inconvenientes determinam que a avaliação da poluição por águas residuais se realize através de indicadores. De forma ideal, define-se como indicador de qualidade da água, o microrganismo ou substância cuja densidade na água se

possa relacionar de modo quantitativo com os riscos potenciais para a saúde humana durante o seu uso.

Os requisitos que deve reunir qualquer microrganismo indicador foram propostos por vários investigadores e instituições, nomeadamente Bonde (1962), WHO (1977a), Geldreich (1978), Metcalf (1978), Colwell (1978), Cabelli (1978; 1979; 1983), Borrego (1982), Olivieri (1982), Pipes (1982b), Goyal (1983), Gerba (1987). De acordo com estes autores os indicadores devem cumprir os seguintes critérios:

1. Estar presente, sempre que esteja o microrganismo patogénico ou a sua fonte e não detectar-se em águas livres de contaminação;
2. A sua concentração na água deve ser muito maior que a dos microrganismos patogénicos, devendo estabelecer-se uma relação directa entre as suas concentrações, assim como com o grau e extensão da poluição;
3. Devem ser mais resistentes às condições do meio ambiente natural e aos processos de desinfeção que os patogénicos;
4. A metodologia para a enumeração, isolamento e identificação deve ser simples, específica, rápida e económica;
5. Os indicadores não devem ser microrganismos patogénicos e devem poder aplicar-se a todo o tipo de amostras;
6. As suas características devem ser constantes;
7. Devem ser incapazes de crescer e multiplicar-se no meio aquático.

Classicamente, os principais grupos de microrganismos indicadores propostos são os coliformes totais, coliformes fecais, estreptococos fecais e os esporos de clostrídios sulfito redutores.

Ao longo destes anos têm sido propostos novos testes para vários grupos de microrganismos, mas ainda não foi definido nenhum grupo que reúna todos os requisitos, nem tão pouco que sirva como indicador da poluição viral. Por outro lado, o uso destes microrganismos como indicadores tem trazido alguns problemas, pois

foram detectados microrganismos patogénicos em águas que tinham sido consideradas previamente seguras com base em bactérias indicadoras (Dutka e Kwan, 1978; Lucena *et al.*, 1982; Moriñigo, 1987).

Mossel (1982), designou que um microrganismo modelo deve ter dois tipos de funções: a função «índice» e a função «indicadora». A função “índice” relaciona-se, tanto directa como indirectamente, com os riscos para a saúde ou com a presença de patogénicos. Assim, fala-se de índices de poluição fecal, contaminação por águas residuais, tipos de contaminação fecal, entre outros. A função “indicadora” relaciona-se somente com os efeitos de um processo de tratamento ou controlo da qualidade da água, no sentido geral.

Os critérios que deve cumprir um organismo “índice” ideal são os seguintes:

1. Ecologia similar aos patogénicos:

- Estar presente em fezes humanas e águas contaminadas por elas;
- Estar ausente em fezes de outros animais e em águas poluídas por este tipo de fezes.

2. Resistência similar aos patogénicos:

- Incapacidade de multiplicarem-se no meio ambiente;
- Apresentar características constantes;
- Apresentar resistência similar aos processos de desinfecção e de tratamento de águas residuais;
- Sobrevivência idêntica em águas doces e marinhas;
- Resistir de forma similar à luz solar;
- Efeitos similares na saúde;
- Similar persistência relacionada com vírus.

3. Metodologia laboratorial simples:

- Ser detectado por métodos simples que não exijam instalações especiais e que sejam económicos, rápidos, não perigosos e sem necessidade de processar grandes volumes.

Os indicadores, relacionam-se somente com os efeitos de um processo de tratamento ou controle da qualidade da água no sentido geral e não se exige ecologia similar aos patogênicos. Um indicador tem apenas que cumprir com os critérios definidos nas alíneas 2 e 3, acima referenciadas, para o organismo índice.

3.1. Coliformes totais

Os coliformes são os microrganismos indicadores mais amplamente utilizados para determinar a qualidade sanitária de águas para bebida e recreativas.

Os coliformes definem-se como bactérias com forma de bacilos, aeróbias e anaeróbias facultativas, gram-negativas, não esporuladas, que fermentam a lactose com produção de gás dentro de 48 h a 35° C (APHA, 1992).

Certos fenômenos tendem a limitar estas definições (Leclerc *et al.*, 1977) :

1- Ignora-se os biotipos lactose - ou lactose lentas (β -galactosidase +, lactato permease -), que têm o mesmo significado higiênico.

2- A produção de gás depende da formação de um enzima induzível, a hidrogeno-fórmico-liase, que é termodependente. Os métodos em meio líquido detectam os coliformes produtores de gás. Os que utilizam meios sólidos (ex: filtração por membrana), não serão capazes de evidenciar esta capacidade.

3- É fundamental conhecer as temperaturas ótimas, mínimas e máximas das diferentes estirpes de coliformes. Algumas são mesófilas, outras psicrófilas. A temperatura ótima de crescimento não é a mesma para as duas categorias.

4- A definição de coliformes, permite a inclusão de espécies saprófitas da água ou provenientes de animais poiquilotérmicos, como por exemplo *Aeromonas*. A possibilidade mais simples de os diferenciar é a prova da citocromo-oxidase.

A simplicidade desta definição permite a inclusão neste grupo de múltiplos géneros nomeadamente *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Citrobacter*, sendo o género *Escherichia* o mais estreitamente ligado à contaminação fecal (Evans *et al.*, 1981).

Apesar da maioria das bactérias pertencentes a este grupo se encontrarem em concentrações altas nas águas residuais (Miescier, 1977), somente umas poucas e, em particular a espécie *Escherichia coli*, se encontram exclusivamente nas fezes de animais homeotérmicos. *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Citrobacter*, também têm sido detectadas nesse habitat, mas não estão associadas especificamente à poluição fecal (Dutka, 1973; Leclerc *et al.*, 1977; Elliot e Colwell, 1985).

O facto de os coliformes totais também poderem proceder de fontes não fecais, diminui o seu valor como indicadores da poluição fecal. Diferentes autores (Colwell, 1978; Geldreich, 1981; Olivieri, 1982; Borrego, 1982; Cornax *et al.*, 1990a) apontaram uma série de inconvenientes dos coliformes totais como sistema indicador óptimo, entre os quais se destacam:

1- A inactivação das espécies pertencentes a este grupo difere acentuadamente dos microrganismos patogénicos. Por exemplo, os vírus entéricos, os quistos de protozoários e os patogénicos bacterianos persistem durante mais tempo no meio aquático.

2- A fraca relação com os patogénicos não bacterianos, quanto à resposta a processos de desinfecção. Os coliformes totais são muito mais sensíveis a estes processos.

3- Inibição pelo sobrecrecimento de outros grupos microbianos.

4- Crescimento no meio ambiente sobre determinadas condições.

3.2. Coliformes fecais

São aqueles coliformes que fermentam a lactose com produção de ácido e gás a 44,5° C, sendo específicos das fezes de animais homeotérmicos (Bonde, 1962; Geldreich, 1966).

Os coliformes fecais utilizam-se para determinar a contaminação fecal em águas superficiais e efluentes (Geldreich, 1978; Olivieri, 1982), sobretudo contaminação recente (Pipes, 1982b), assim como em moluscos e em águas onde estes se cultivam (Hood *et al.*, 1983).

O amplo uso que se faz dos coliformes fecais como indicadores de contaminação fecal, baseia-se fundamentalmente, na disponibilidade de um grande número de dados e porque os métodos utilizados para a sua detecção são amplamente aceites (Cabelli *et al.*, 1983).

No entanto, o seu emprego como indicador da poluição fecal tem sido posto em dúvida baseando-se nas dificuldades de isolamento, identificação e interpretação das suas análises (Kott, 1977), na fraca sobrevivência fora do tracto intestinal (Borrego *et al.*, 1983), pela frágil definição de grupo (Dufour, 1977; Barrow, 1977; White e Godfree, 1986) e porque algumas bactérias patogénicas não se correlacionam bem com os níveis de coliformes fecais (Colwell *et al.*, 1977; Gerba *et al.*, 1979; Goyal *et al.*, 1979; LaBelle *et al.*, 1980).

3.3. Estreptococos fecais

A sua utilidade como indicadores microbiológicos baseia-se no seguinte:

- incapacidade de multiplicação em efluentes domésticos (Slanetz e Bartley, 1965);
- não são tão ubíquos como os coliformes (Borrego *et al.*, 1982b);

- estarem sempre presentes nas fezes dos animais homeotérmicos (Volterra *et al.*, 1986);
- maior sobrevivência no meio marinho que os coliformes (Evison e Tosti, 1980; Borrego *et al.*, 1983; Bravo e Vicente, 1992);
- demonstrarem relação frequente com os riscos sanitários associados ao banho em águas marinhas e doces, sobretudo em sintomas gastrointestinais (Cabelli, 1982; Cabelli *et al.*, 1983; Dufour, 1984; USEPA, 1986);
- parecerem capazes de persistir no meio ambiente, durante períodos maiores que os microrganismos patogénicos (Sinton *et al.*, 1993b).

No entanto, a sua utilização como indicadores fiáveis de poluição fecal é limitada devido a :

- dificuldades na formulação de meios de cultivo selectivos e procedimentos para a seu isolamento (Dionisio e Borrego, 1995);
- são um grupo taxonomicamente e ecologicamente muito heterogéneo com diferentes significados sanitários (Geldreich e Kenner, 1969);
- são ubíquos em meios aquáticos e multiplicam-se em águas com baixas concentrações de nutrientes (Mundt e Graham, 1968).

O principal problema para a utilização mais ampla deste microrganismo, reside na falta de metodologia adequada para a sua enumeração, apesar de já terem sido propostos mais de setenta meios de cultura (Pavlova *et al.*, 1972; Yoshpe-Purer, 1989). O procedimento aplicado por vários investigadores tem sido o método do Número Mais Provável utilizando o meio de Rothe Azida Dextrose seguido pela confirmação em caldo Etilo Violeta Azida (EVA). A enumeração de estreptococos fecais pela técnica da filtração por membrana foi descrita por Slanetz e Bartley (1957) e posteriormente foram propostos vários meios , incluindo os agares Acetato de Tálío (Barnes, 1959), KF (Kenner *et al.*, 1961), PSE (Isenberg *et al.*, 1970), Kanamicina Esculina Azida (KEA) (Mossel *et al.*, 1973), mSD (Levin *et al.*, 1975) mE modificado (Dufour, A. P., Abstract Ann. Meet. A.S.M., Miami Beach, 1980). Para situações específicas, nomeadamente a recuperação de estreptococos fecais a partir de águas

com cloro foram propostos outros meios e o aumento do período de incubação de 48 para 72 h (Lin, 1974). Rutkowski e Sjogren (1987) formularam um meio designado M2 para estabelecer a distinção entre fontes de poluição animal e humana. Muito recentemente, Audicana *et al.* (1995) modificaram o agar Kanamicina Esculina Azida aumentando a concentração da azida de sódio e substituindo o sulfato de kanamicina por ácido oxolinico. Este meio modificado, denominado agar Ácido Oxolinico Esculina Azida (OAA), para além das vantagens encontradas quanto à especificidade, selectividade e eficiência de recuperação permite, segundo estes autores, um encurtamento do tempo de processamento das amostras. Por outro lado, Hernandez *et al.* (1991) e Pourcher *et al.* (1991) desenvolveram, para a enumeração de estreptococos fecais e enterococos, um sistema rápido através do emprego de um teste fluorogénico miniaturizado.

Estes métodos tem sido aplicados em diferentes amostras (fezes, esgotos, alimentos e águas doces), havendo no entanto muito poucos estudos em águas do mar (D'Aoust e Litsky, 1975; Brodsky e Schiemann, 1976; Pagel e Hardy, 1980; Volterra *et al.*, 1985).

Outro problema adicional relacionado com a enumeração deste grupo é a sua heterogeneidade taxonómica e ecológica.

A taxonomia do género *Streptococcus* foi extensivamente revista nos últimos anos (Schleifer e Kilpper-Balz, 1984; Collins *et al.*, 1984; 1986; 1989; Ruoff, 1990; Devriese *et al.*, 1992; Knudtson e Hartman, 1992).

Os termos estreptococos fecais, enterococos e estreptococos do grupo D têm sido utilizados de uma forma pouco clara, durante os últimos anos. Os estreptococos fecais, definem-se como aquelas espécies de estreptococos que se recuperam das fezes em quantidades significativas. Recentemente, os microrganismos do género *Streptococcus* foram reclassificados em dois géneros: *Streptococcus*, *Enterococcus*. O género *Enterococcus* inclui 14 espécies, distribuídas em três grupos:

1. Espécies frequentes e abundantes em fezes humanas e de animais: *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. avium*, *E. gallinarum*, *E. columbae* e *E. cecorum*.
2. Espécies que raramente se encontram no microbiota intestinal do homem e de animais domésticos, sendo a sua fonte principal de isolamento o solo e os vegetais: *E. casseliflavus* e *E. mundtii*.
3. Espécies nunca isoladas em fezes: *E. raffinosus*, *E. pseudoavium*, *E. solitarius* e *E. malodoratus*.

O termo Enterococo usa-se para descrever as espécies de estreptococos fecais que estão em conformidade com os critérios de Sherman, nomeadamente:

- a capacidade para crescer tanto a 10° como a 45° C;
- resistir a 60° C durante pelo menos 30 min;
- crescer a pH 9,6;
- crescer em presença de 6,5 % de NaCl;
- reduzir o azul de metileno a 0,1%, em leite.

Murray (1990), recomenda para a confirmação final dos enterococos, outras provas adicionais como:

- apresentar resistência ao antibiótico vancomicina;
- não produzir gás a partir da glucose;
- apresentar reacção positiva com o antisoro para estreptococos do grupo D;
- reacção positiva para a bÍlis-esculina;
- hidrolisar o PYR (pyrrolidonil- b-naphthilamida);

Em conformidade com o «Bergey's Manual of Determinative Bacteriology-9» (Holt *et al.*, 1993), o género *Enterococcus* é caracterizado como se descreve a seguir:

Células esféricas ou ovóides, 0,6-2,0 x 0,6-2,5 µm, que ocorrem aos pares ou cadeias pequenas em meios líquidos, não formadoras de esporos, gram positivas, anaeróbias facultativas, catalase negativas.

O grupo enterococo inclui *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. gallinarum* e biotopos relacionados (*E. avium*).

Este grupo tem valor indicador para determinar a extensão da contaminação fecal das águas superficiais recreativas. Estudos epidemiológicos realizados por Cabelli (1983) e Dufour (1984) para águas marinhas e doces, respectivamente, indicam que a gastroenterite associada ao banho estava directamente relacionada com a qualidade microbiológica das águas, e que os enterococos eram os indicadores mais eficientes para determinar a sua qualidade sanitária .

O género *Streptococcus* foi actualmente reestruturado, considerando três grupos:

1. Os estreptococos fecais que incluem : (a) *S. bovis* e *S. equinus*, frequentes em fezes de certos animais; (b) *S. alactolyticus*, habitante típico do intestino de porcos e aves de capoeira; (c) *S. intestinalis* e *S. hyointestinalis*, que são membros do microbiota intestinal do porco; e (d) *S. suis*, que além de se encontrar no intestino do porco, também se detecta noutros animais.
2. Os estreptococos raramente detectados no microbiota intestinal do homem e animais: *S. oralis*, *S. mitis*, *S. salivarius* e *S. sanguis*.
3. Diferentes espécies de *Streptococcus* de origem não-fecal, que têm uma grande importância patogénica na infecção do tracto rinofaríngeo, da pele e dos pulmões, entre outros.

A relação entre as concentrações de microrganismos indicadores tem sido empregue para fornecer alguma informação sobre a origem da contaminação microbiana. A razão CF/EF é utilizada para indicar se a poluição é de origem humana ou animal, já que os coliformes fecais se encontram em maior número em fezes humanas e os estreptococos fecais em fezes de animais (Geldreich e Kenner, 1969).

Um quociente maior que 4 é considerado indicativo de uma contaminação humana, enquanto que quocientes inferiores a 0,7 indicariam contaminação por fontes não humanas. O valor desta proporção tem sido questionada por vários autores, Gross *et al.* (1975), Hussong *et al.* (1979) e Pourcher *et al.* (1991) encontraram proporções CF/EF para fezes de galinhas similares às de fezes humanas, e Borrego *et al.* (1982b) verificaram que este índice dependia mais do grau de poluição e da distância da fonte de poluição. Para além disso, este índice pode também ser afectado pelos métodos de enumeração dos estreptococos fecais. Por estas razões, o índice CF/EF, não pode ser recomendado para diagnosticar a origem da poluição e diferenciar a fonte de poluição fecal (APHA, 1992).

3.4. Clostrídios sulfito - redutores

O género *Clostridium* é constituído por bacilos Gram-positivos, que se apresentam isolados, aos pares, em cadeias curtas ou longas, ou em alguns casos em espirais muito fechadas. Móveis ou imóveis. Algumas espécies (*C. perfringens*) produzem cápsulas, formam endósporos ovais ou esféricos.

Estes microrganismos formadores de esporos, são entre os anaeróbios, os mais amplamente utilizados como indicadores, sobretudo para casos de contaminação intermitente ou remota (Bonde, 1977; Egea, 1987).

A maior resistência aos factores ambientais apresentada pelos esporos deste microrganismo, comparativamente com os indicadores clássicos, encoraja a sua utilização, especialmente em condições nas quais estes últimos não sobrevivem (Mesquita, 1988). Cabelli (1977) propõe-os como indicadores de enterovírus. Não se

sugere a sua utilização como indicadores para moluscos, mas sim para os sedimentos marinhos (Bonde, 1977).

Os problemas mais importantes da sua utilização como indicadores da poluição, reside na escassa informação sobre os meios de cultura para a sua enumeração e a dificuldade de selecção de um meio que permita obter uma boa especificidade destes microrganismos, quer em moluscos quer em águas para criação de mariscos (Egea, 1987). Possivelmente, são estas dificuldades de metodologia, que fazem com que este microrganismo anaeróbio não constitua ainda um indicador típico para os critérios de qualidade europeus e americanos.

3.5. Outros indicadores bacterianos

Uma série de microrganismos, denominados «indicadores patogénicos», foram propostos para serem utilizados como indicadores. Dentro deste grupo incluem-se, entre outros, *Salmonella* (McCoy, 1971), *Pseudomonas aeruginosa* (Hoadley, 1977; Vicente, 1986), *Staphylococcus aureus* (Olivieri, 1982), *Aeromonas hydrophila* (Arcos *et al.*, 1986) e *Candida albicans* (Olivieri 1982; Pipes 1982b).

Salmonella - É o microrganismo patogénico mais frequentemente utilizado para avaliar a contaminação fecal originada pelo homem ou outros animais de sangue quente. *Salmonella* encontra-se amplamente distribuída no ambiente e inclui mais de 2.000 serotipos, que podem causar doenças, como por exemplo a febre tifóide, paratifóide e gastroenterite.

Todas as espécies de *Salmonella* são bacilos Gram-negativos não encapsulados e, em geral, são móveis, não fermentam a lactose nem produzem indol.

Pseudomonas aeruginosa - Em águas naturais, a principal fonte deste microrganismo são os efluentes domésticos, no entanto é ocasionalmente isolado em águas livres de poluição fecal, após as chuvas ou efluentes da agricultura (Hoadley, 1977; Dutka, 1981), ou pode estar associado a

banhistas (Cabelli, 1977). São bacilos Gram-negativos, móveis. A sua presença em águas deve ser observada, pois pode causar infecções na pele, ouvidos, olhos e outras membranas mucosas (Hoadley, 1977; Dutka, 1981). Assim, Hoadley (1977) verificou que quando o nível de *P. aeruginosa* é superior a 100 ufc/100ml, os banhistas estariam a ser expostos a doses infectivas para os ouvidos e olhos. Vicente *et al.* (1986) concluíram que o risco potencial de concentrações infectantes de *P. aeruginosa* é inferior a 15% em praias com os padrões sanitários seguintes:

CT50 < 1000 ufc/100ml, CF50 e EF50 < 100-200 ufc/100ml.

Candida albicans - É um componente do microbiota do intestino de animais mamíferos e aves, e a sua ocorrência em águas está associada à contaminação fecal (Buck e Bubucis, 1978). Apresenta fraca sobrevivência em águas com salinidades similares à do mar (Norkrans, 1966). *C. albicans* é responsável por provocar infecções micóticas.

3.6. Os bacteriófagos como indicadores de poluição fecal

Os bacteriófagos infectam quase todos os géneros bacterianos e encontram-se em ecossistemas naturais, nomeadamente em ambientes aquáticos.

Os colifagos são bacteriófagos que infectam e se replicam em células de *Escherichia coli*.

A presença de colifagos em águas naturais está relacionada com poluição fecal e a sua sobrevivência nestes ambientes depende do processo de inactivação, devido a factores ambientais e ao processo de diluição (Borrego e Romero, 1985).

A contaminação vírica constitui um problema importante da contaminação das águas. Os indicadores bacterianos da poluição fecal são inadequados para determinar o risco potencial dos vírus patogénicos entéricos.

O emprego dos coliformes e coliformes fecais como indicadores víricos tem sido questionado por diferentes autores. Detectaram-se vírus entéricos humanos em águas e em moluscos considerados seguros, usando os coliformes como indicadores (Fugate *et al.*, 1975). Portanto, torna-se necessário o emprego de indicadores mais relacionados com os vírus entéricos.

Os métodos de detecção de vírus nas águas constam geralmente de duas fases; concentração da amostra e ensaio em culturas celulares.

Há uma série de inconvenientes e problemas particulares associados à detecção de vírus de interesse para a saúde pública (Kott *et al.*, 1974; Grabow *et al.*, 1984; Grabow, 1986), nomeadamente:

- O tamanho pequeno dos vírus;
- As baixas concentrações dos vírus na água e a sua variabilidade;
- Interferência, nos procedimentos de detecção, dos materiais dissolvidos e em suspensão na água;
- Limitações nos métodos de identificação e na avaliação vírica:

A eficiência dos métodos de adsorção-eluição, utilizados para a recuperação dos vírus, na água é muito baixa e excede muito raramente 50% para alguns vírus.

Vírus como os da hepatite A, rotavírus, vírus Norwalk e alguns adenovírus não são detectados pelos métodos utilizados em análises de água.

O tempo de incubação considerado para obter as placas é muito curto para a detecção de vírus de crescimento lento.

- Necessidade de ensaiar grandes volumes de água para a sua detecção;
- Exigência de instalações e infra-estruturas complexas;
- Técnicas dispendiosas e delicadas;
- Longos períodos de tempo para a obtenção de resultados.

Atendendo a estes inconvenientes torna-se necessário o emprego de microrganismos indicadores para a avaliação da qualidade virológica das águas.

Os bacteriófagos, devido à sua morfologia, estrutura e composição, simulam melhor o comportamento das viroses na água, e podem então ser considerados indicadores fiáveis para este meio ambiente (Grabow, 1986). O uso dos bacteriófagos como indicadores da presença e comportamento de bactérias entéricas e de vírus animais tem sido muito atractivo devido à facilidade e ao baixo custo do ensaio de bacteriófagos.

Considera-se que os colifagos sobrevivem nos ambientes aquáticos de forma comparável às viroses entéricas e, normalmente, durante mais tempo que as bactérias indicadoras (Kennedy *et al.*, 1985). Os bacteriófagos de *E. coli* têm sido o grupo mais usado apesar de se ter também estudado a aplicação de outros bacteriófagos como indicadores da poluição fecal (Havelaar *et al.*, 1984; Tartera e Jofre, 1987).

Entre as estirpes de laboratório, *E. coli* C é a que dá contagens de placas de lise mais elevadas em relação às outras estirpes testadas (Ignazzito *et al.*, 1980; Havelaar e Hogeboom, 1983).

As principais razões para propôr os colifagos como indicadores de vírus entéricos foram detalhadas por Kott (1981):

1. Os colifagos encontram-se sempre em concentrações elevadas nas águas residuais e nas águas naturais contaminadas.
2. Os níveis de colifagos excedem sempre as concentrações de vírus entéricos.
3. Os colifagos são incapazes de se reproduzirem fora do organismo hospedeiro.
4. Os colifagos podem ser detectados e enumerados por técnicas simples, obtendo-se os resultados finais da análise num tempo muito menor que o necessário para a determinação dos vírus entéricos.

5. Alguns bacteriófagos são mais resistentes, à inactivação pelo meio ambiente e por processos de desinfecção, que os vírus entéricos.

Existem evidências que desaconselham o uso dos colifagos como indicadores de vírus entéricos:

- foram detectados vírus entéricos na ausência de colifagos, assim como o caso inverso (Vaughn e Metcalf, 1975; Deetz *et al.*, 1984);
- a sua multiplicação em meio ambiente não natural, que depende entre outros factores, da presença de nutrientes suficientes e temperatura adequada para suportar o crescimento e a multiplicação das células hospedeiras (Borrego *et al.*, 1990);
- a sua presença em águas não contaminadas (Seeley e Primrose, 1980).

Devido a esta série de inconvenientes, foram propostos os bacteriófagos fimbria específicos e os bacteriófagos de microrganismos anaeróbios.



Por apresentarem uma estrutura física e sobrevivência muito semelhantes aos vírus entéricos, os bacteriófagos F-específicos contendo RNA, são considerados por Havelaar (1987) os mais atractivos como microrganismos indicadores. Moriñigo *et al.* (1992) não encontraram relações directas entre os fagos F específicos RNA e a poluição fecal, assim como não detectaram este grupo em amostras com níveis baixos de enterovírus (1-10 ufp / 10 l) em amostras de água do mar, no Sul de Inglaterra. Por outro lado, a visualização das placas de lise, produzidas por estes fagos, não é fácil e requer prática (Kfir *et al.*, 1990). A utilização dos fagos F-específicos poderá ser mais apropriada para representar o comportamento dos vírus entéricos em águas e águas residuais tratadas do que como indicadores de poluição fecal em geral (Havelaar, 1987).

No entanto, os bacteriófagos específicos de *E.coli* C, atendendo às suas características especiais, constituem um indicador alternativo dos indicadores

bacterianos e, em especial, dos coliformes fecais (Cornax, 1991), pelas razões seguintes:

- técnicas de detecção e quantificação simples e económicas, obtendo-se os resultados num período de 12 a 18h;
- encontram-se constantemente e em concentrações elevadas nas fezes humanas de indivíduos sãos ou enfermos, estando o seu número relacionado com a concentração de coliformes fecais;
- as condições para a sua multiplicação verificam-se unicamente em águas residuais ou em águas naturais com um elevado grau de contaminação;
- do grupo de bacteriófagos são os que se apresentam em maior concentração em água residual, o que facilita a sua detecção.

3.7. Bactérias saprófitas

As bactérias saprófitas assim como os coliformes dão uma informação importante em relação à condição biológica e higiénica da água (Rheinheimer, 1977).

O termo é aplicado a todas as bactérias heterotróficas capazes de se desenvolverem em meios nutritivos com agar e que podem ser quantificadas por contagem em placa. Estudos desenvolvidos por Rheinheimer (1977), permitiram concluir que as bactérias saprófitas reagem mais rapidamente a mudanças no seu meio ambiente que as outras bactérias, e reflectem o conteúdo de matéria orgânica facilmente degradável. Desta forma, este grupo de bactérias são um bom indicador da carga poluidora orgânica nas massas de água num dado momento (Rheinheimer *et al.*, 1989), dado que dão uma resposta quase imediata ao aumento da produção primária e às descargas terrestres.

3.8. Número Total de Bactérias

A avaliação do número de bactérias e da sua biomassa constitui um instrumento importante para se compreender o papel desempenhado por estes

microrganismos em qualquer ambiente, nomeadamente o marinho (Kepner e Pratt, 1994).

A estimativa do número de bactérias numa determinada amostra pode ser efectuada por diversos métodos, nomeadamente por contagem directa ao microscópio, contagem em placas e determinação do número mais provável.

O método de contagem de microrganismos viáveis por sementeira em placa subestima significativamente o número de bactérias, numa determinada amostra, atendendo à existência de bactérias que embora metabolicamente activas não se desenvolvem em placa (viáveis mas não cultiváveis) (Daley, 1979; Kogure *et al.*, 1979; Byrd *et al.*, 1991).

Vários autores (Hoppe, 1976; Jannasch, 1979; Munro e Bianchi, 1986), ao compararem os resultados obtidos por contagem em placa, enumeração directa por observação ao microscópio, verificaram que o número de bactérias com capacidade de formar colónias em meios sólidos difere de várias ordens de magnitude em relação ao número obtido por contagem directa.

Os métodos de contagem directa têm como principal vantagem a rapidez pois não necessitam de período de incubação para que as células metabolizem e se multipliquem.

A contagem directa através da microscopia de epifluorescência e coloração por alaranjado de acridina tem vindo a ser amplamente utilizada e tem-se destacado como um método, rápido e eficiente para enumeração do número total de bactérias em amostras do ambiente (Zimmermann e Meyer-Reil, 1974; Hobbie *et al.* 1977; Daley, 1979; Pomroy, 1984; Herbert, 1990).

Os fluorocromos mais frequentemente utilizados nos métodos de contagem directa são o cloreto 3,6-bi (dimetilamino) *acridinium* (alaranjado de acridina) e o 4,6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) (Kepner e Pratt, 1994).

Revisões bibliográficas realizadas por Kepner e Pratt (1994) indicam que entre 1940 e 1980, aproximadamente 90% das enumerações bacterianas por contagens directas foram efectuadas aplicando como corante o alaranjado de acridina. Contudo, nesta última década a coloração por DAPI tem vindo a substituir rapidamente o alaranjado de acridina como corante de eleição.

Ao comparar resultados obtidos em preparações coradas com alaranjado de acridina e com DAPI, Suzuky *et al.* (1993) obtiveram valores mais baixos em estimativas da abundância bacteriana em preparações coradas pelo fluorocromo DAPI. Estes autores recomendam a realização de algumas contagens pelo método de coloração com alaranjado de acridina de forma a avaliar o grau de subestimação quando se aplica como rotina o DAPI como corante.

As diferenças verificadas entre os métodos de contagens directas através do microscópio de epifluorescência e os métodos de cultivo em placa, podem ser parcialmente atribuídas à agregação entre células bacterianas, microrganismos mortos e detritos (Kogure *et al.*, 1979) e células bacterianas fisiologicamente afectadas (Borrego, 1994).

A quantificação, com auxílio do microscópio óptico, de bactérias coradas em membrana filtrante pode conduzir a resultados duvidosos dado ser praticamente impossível a diferenciação entre bactérias muito pequenas e partículas não específicas de tamanho semelhante. Por outro lado a subjectividade inerente à identificação óptica das bactérias limita as possibilidades de comparação dos dados obtidos por diferentes autores (Zimmermann, 1977).

A utilização do microscópio electrónico de varrimento permite distinguir as bactérias dos detritos, através do critério da forma e da textura (Bowden, 1977).

Este autor encontrou resultados semelhantes ao comparar contagens de bactérias em preparações coradas com alaranjado de acridina e em preparações observadas através do microscópio de varrimento. Face a estes resultados este autor concluiu que o microscópio electrónico de varrimento poderá ser utilizado na

avaliação quantitativa, sendo no entanto preferível o emprego do microscópio de epifluorescência, para trabalhos de rotina. O microscópio electrónico é um instrumento de observação muito potente, no entanto a coloração com alaranjado de acridina permite processar mais amostras em menos tempo e com custos mais baixos.

Conhecem-se actualmente outros métodos que ainda não constituem uma alternativa para a avaliação rotineira da qualidade das águas, nomeadamente técnicas que envolvem provas genéticas e emprego de anticorpos fluorescentes.

4. Qualidade microbiológica de águas para uso recreativo. Regulamentação higiénico-sanitária.

Muitos dos critérios e regulamentos referentes à qualidade microbiológica de águas para fins recreativos, não se baseiam em estudos epidemiológicos, dado que estes são complexos e de difícil realização.

No estabelecimento da regulamentação para a protecção da saúde pública interveem, entre outros aspectos, a informação técnico-científica, os interesses económicos, as características sociais e culturais e o desenvolvimento tecnológico. Os critérios adoptados dependem do País e da Instituição que os emite. A maioria destes critérios baseiam-se nos limites para os coliformes. Estes não têm um valor absoluto e não podem ser estabelecidos de uma forma definitiva. Os critérios são continuamente revistos, à medida que novos dados, entre eles os epidemiológicos, vão sendo disponibilizados. Contudo há autores que recomendam a inclusão de limites para enterovírus, estreptococos fecais e colifagos (Grabow *et al.*, 1989).

A avaliação da qualidade microbiológica é uma tarefa complexa, com a agravante das limitações conhecidas sobre a utilização dos indicadores clássicos. Em casos mais complicados seria necessário monitorizar todos os agentes etiológicos, incluindo os vírus, em conjunto com estudos epidemiológicos detalhados (Lord *et al.*, 1989). O desenvolvimento de técnicas analíticas, assim como o melhor conhecimento da ecologia dos microrganismos fecais, demonstram o interesse em considerar outros

indicadores microbianos, entre eles alguns patogénicos, nomeadamente os estreptococos fecais, *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella*, e alguns vírus entéricos e bacteriófagos (McCoy, 1971; Hoadley, 1977; Borrego, 1982; Vicente, 1986; Cornax, 1991; Helmer *et al.*, 1991).

Apresentam-se a seguir objectivos de qualidade microbiológica de águas para uso recreativo descritos pela Comunidade Económica Europeia (76/160/CEE; CE, 1994), Organização Mundial da Saúde (WHO/UNEP, 1979) e Ministério do Planeamento e da Administração do Território (Decreto-Lei nº 74/90).

a - Directiva da Comunidade Económica Europeia (76/160/CEE).

A vigilância da qualidade das águas costeiras, a partir da promulgação desta directiva, é de cumprimento obrigatório para todos os países integrantes da Comunidade.

Esta norma toma em consideração os parâmetros microbiológicos e os físico-químicos, assim como as frequências de amostragem e as características das análises. Inclui os três indicadores microbiológicos mais comuns (CT, CF, e EF), assim como *Salmonella* e enterovírus, apesar destes últimos parâmetros só serem considerados quando se pressupõe a sua presença no meio. Os métodos recomendados são tanto a filtração por membrana, como os tubos múltiplos (NMP). Como recomendação encontram-se também os meios de cultura e períodos de incubação para cada grupo. Para os valores considerados guia, os limites fixam-se em 500 CT/100ml; 100 CF/100ml; 100 EF/100ml, em 80% das amostras. Por outro lado, os valores obrigatórios ou imperativos estabelecem-se em 10 000 CT/100ml e 2 000 CF/100ml, em 95% das amostras. A *Salmonella* e os enterovírus deverão estar ausentes em 1 l e 10 l, respectivamente, da amostra.

b - Proposta de Directiva do Conselho das Comunidades Europeias, relativa a águas balneares (CE, 94/C 112/03).

Em relação aos parâmetros microbiológicos, o documento acima referenciado propõe os estreptococos fecais como um parâmetro de valor obrigatório, elimina a pesquisa de *Salmonella* e considera os bacteriófagos como um novo parâmetro a introduzir, atendendo às seguintes vantagens:

- é um indicador de contaminação fecal;
- é um vírus e inactiva-se na água aproximadamente com a mesma cinética que os enterovírus, indicando assim a sua possível presença;
- a sua determinação não impõe equipamentos complexos.

Estudos epidemiológicos realizados pela WHO/UNEP em Málaga e Tarragona (Mujeriego *et al.*, 1980a) indicam o potencial interesse na inclusão dos estreptococos fecais como um indicador adicional da qualidade da água.

c - Organização Mundial da Saúde e Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (WHO/UNEP, 1979b).

Os critérios de qualidade em águas costeiras e de usos recreativos (WHO/UNEP, 1979b) determinam que uma zona de banho tem uma qualidade "satisfatória", quando a concentração de coliformes fecais é menor que 100 CF/100ml; e pode ser "aceitável", quando a água na zona não apresenta mais de 1000 CF/100ml. Nas normas de qualidade, que se aplicam às zonas recreativas e de banho do Mediterrâneo, consideram-se como zonas "satisfatórias" e seguras, aquelas em que, pelo menos, sobre 10 amostras representativas da água analisada durante o período balnear, com um intervalo não superior a 14 dias, as concentrações de coliformes fecais (CF) e estreptococos fecais (EF) não excedam as 100 ufc/100ml, em 50% das amostras e as 1000 ufc/100ml, em 90% das amostras.

d - Decreto-Lei nº. 74/90 sobre as normas de qualidade da água (Portugal - Ministério do Planeamento e da Administração do Território).

Na legislação portuguesa existe actualmente o decreto-lei nº. 74/90, relativo à qualidade da água, que transpõe para o direito nacional algumas Directivas Comunitárias em relação às características que uma água tem que possuir de acordo com a sua utilização. Os critérios e normas de qualidade para águas recreativas constituem uma transposição da directiva comunitária 76/160/CEE.

A Direcção-Geral da Saúde adoptou uma classificação qualitativa, tendo em consideração os parâmetros microbiológicos, coliformes totais (CT) e coliformes fecais (CF). De acordo com esta classificação uma água é:

- boa, quando pelo menos 80% dos resultados das análises efectuadas são inferiores ao valor máximo recomendável (VMR);
- aceitável, quando pelo menos 95% dos resultados são inferiores ao valor máximo admissível (VMA);
- má, quando mais de 5% dos resultados são superiores ao VMA.

Quando se detecta a presença de *Salmonella* apenas numa análise, que seria classificada como boa ou aceitável quanto aos parâmetros coliformes totais e coliformes fecais, a classificação passará a aceitável. Será considerada má quando a presença de *Salmonella* é positiva em mais de uma análise.

5. Sobrevivência microbiana no meio marinho.

A maioria dos coliformes e das bactérias entéricas, sendo habitantes do intestino dos animais homeotérmicos, encontram-se no meio aquático em trânsito, não sendo portanto ocupantes de longo termo nesse ecossistema.

Tratando-se de microrganismos alóctones, eles não se encontram bem adaptados às condições físico-químicas da água, que constitui para eles um ambiente hostil. Com efeito, a água do mar constitui um ambiente adverso para a maioria dos microrganismos que se descarregam através de águas residuais, dificultando o seu desenvolvimento e sobrevivência (Chamberlain e Mitchell, 1978; Grimes *et al.*, 1986), resultando numa diminuição da população (Colwell e Kaper, 1981).

As observações de outros autores (Dawe e Penrose, 1978), indicam que os danos causados pela água do mar são grandes, mas a sobrevivência é também grande. Assim, para o caso dos microrganismos patogénicos, estes podem sobreviver durante tempo suficiente e em concentrações susceptíveis de produzir doenças (Fattal *et al.*, 1983).

Não existe ainda um consenso sobre os factores responsáveis pela sobrevivência dos microrganismos telúricos no meio marinho, provavelmente pela complexidade do habitat marinho e da artificialidade dos métodos experimentais utilizados (Lessard e Sieburth, 1983).

É geralmente aceite que a sobrevivência dos microrganismos de origem não marinha, em água do mar, é afectada por diferentes mecanismos.

Existem muitos trabalhos científicos dedicados à análise da dispersão das bactérias telúricas no mar, os quais permitiram a elaboração de modelos matemáticos que continuam a ser melhorados.

A inactivação microbiana, no meio marinho, ocorre por dois processos distintos - diluição física por difusão e pela combinação de factores físicos, químicos e biológicos (Borrego *et al.*, 1983). Entre estes factores podem-se citar:

- **Exposição à luz** (Gameson e Gould, 1975; Mitchell e Chamberlain, 1975; Kapuscinski e Mitchell, 1981; Fujioka *et al.*, 1981; Fattal *et al.*, 1983; Comax *et al.*, 1990a). Atendendo ao fraco poder penetrante da luz ultravioleta na massa de água, reserva-se a maior importância para a luz visível. Gameson e Gould (1975), encontraram uma relação directa entre o

grau de insolação e a inactivação bacteriana, assim como uma actuação sinérgica da luz, com a temperatura ou a salinidade. Os valores mais elevados de inibição produzem-se a radiações solares fortes, temperaturas elevadas e salinidade alta. Curtis *et al.* (1992), concluíram que as substâncias húmicas, o pH e o oxigénio dissolvido são variáveis importantes no processo pelo qual a luz produz danos nos microrganismos.

- **Salinidade.** Estudos desenvolvidos por Pereira e Alcântara (1993) indicam que salinidades iguais ou superiores a 28 g/l exercem um forte efeito negativo em bactérias entéricas. Para os organismos alóctones no meio marinho, a salinidade óptima situa-se à volta de 0,9%, enquanto que no mar os valores deste parâmetro oscilam entre 3,3% e 3,8%. Esta situação pode provocar danos na célula microbiana, por choque osmótico ou por toxicidade específica do ião (Carlucci e Pramer, 1960a).

- **Temperatura.** A temperatura é um factor importante no tempo de vida dos microrganismos e o seu efeito depende do microrganismo que se estude (Nunes, 1990). Incrementando o metabolismo e estimulando a predação e a antibiose, a temperatura contribui para a inactivação dos microrganismos (Vasconcelos e Swartz, 1976).

- **pH.** O pH encontra-se entre os factores que influenciam a inactivação microbiana (Granai e Sjogren, 1981).

- **Oxigénio.** A concentração do oxigénio dissolvido afecta a sobrevivência dos microrganismos (Kuznetsov, 1977), podendo pequenas variações na sua concentração provocar alterações importantes na população bacteriana (Rheinheimer, 1992).

- **Iões metálicos.** Ao produzir inactivação dos sistemas enzimáticos, os iões metálicos contribuem para a destruição do microbiota marinho (Jones e Cobert, 1975).

- **Disponibilidade de nutrientes.** As substâncias, quer orgânicas quer inorgânicas, disponíveis no meio podem favorecer o inibir o desenvolvimento dos microrganismos (Rheinheimer, 1992; Sinclair e Alexander, 1984).

- **Depredação por bactérias, vírus e protozários.** Este factor biológico que também contribui para a redução dos microrganismos é referido por diversos autores (Carlucci e Pramer, 1960b; Enzinger e Cooper, 1976; Borrego, 1982).

- **Processos de adsorção e sedimentação** (Mitchell e Chamberlain, 1975; Geldreich, 1978; Gauthier, 1980). A dispersão dos microrganismos numa massa de água está dependente da forma como eles se apresentam. No estado livre, sem estarem adsorvidos em material particulado, os microrganismos deslocam-se na massa de água dependendo das condições hidrológicas locais. A maior parte das bactérias (98,5%) fixam-se a partículas de dimensões inferiores a 20 micra (Aubert, 1990). Outros microrganismos, desde que estejam adsorvidos a partículas de peso específico elevado, podem cair mais ou menos rapidamente, acumulando-se na superfície dos sedimentos.

- **Competição com o microbiota autóctone e antibiose.** Podem aparecer no meio marinho, efeitos antagónicos ou potenciadores, devidos a outros seres vivos (bactérias ou algas, por exemplo) que podem afectar o desenvolvimento da população alóctone (Enzinger e Cooper, 1976; Cachola e Sampayo, 1984; Sinclair e Alexander, 1984 ; Aubert, 1990).

Os mecanismos que podem intervir na evolução ou inactivação do microrganismo telúrico dependem da sua localização e podem ser diferentes se o microrganismo se encontra no sedimento ou no interior de algum animal (Huq *et al.*, 1983).

Os resultados obtidos por Lessard e Sieburth (1983) sugerem que a inactivação microbiana é provavelmente devida a interacções complexas entre vários factores que dependem de cada ambiente em particular.

Encontram-se, por exemplo, diferenças estatisticamente significativas entre os T90 (tempos estimados para que os microrganismos se reduzam a 10% do seu valor inicial) obtidos em zonas com características ecológicas similares.

Os microrganismos contidos em águas residuais, depois de descarregados no mar, podem morrer, adaptar-se ao novo meio ambiente, ou podem entrar num estado fisiológico no qual a célula microbiana não estando activa também não está morta (Stevenson, 1978). O dano fisiológico sofrido pelas células microbianas pode resultar na incapacidade de crescer em meios de cultura selectivos utilizados nas análises de controlo microbiológico convencionais (Bissonnette *et al.*, 1975; Hoadley, 1981). A enumeração de bactérias de ambientes aquáticos, cultivadas em placas, resulta em várias ordens de magnitude mais baixas, em relação aos dados obtidos por observações directas ao microscópio (Stevenson, 1978). No meio aquático, os microrganismos entéricos sofrem alterações em relação à sua resposta a provas bioquímicas, o que pode dificultar a sua quantificação e identificação (Nunes, 1990).

Os factores que afectam a sobrevivência das bactérias entéricas constituem uma importante preocupação, dado que estes microrganismos são utilizados como índices de poluição em águas .

Por outro lado, a sobrevivência dos microrganismos indicadores está relacionada com a sua qualidade de indicador. Detectaram-se microrganismos patogénicos em águas com concentrações de microrganismos indicadores baixas ou nulas (Dutka, 1973; Lucena *et al.*, 1982; Moriñigo, 1987). A credibilidade de um microrganismo indicador para avaliar a qualidade microbiológica de uma água depende da relação entre a sobrevivência do indicador e a dos microrganismos patogénicos (McCambridge e McMeekin, 1980).

Muitos microrganismos patogénicos apresentam tempos de sobrevivência maiores que os microrganismos indicadores, ao mesmo tempo que os efeitos da tensão (stress) ambiental são menores (Grimes e Colwell, 1986).

As taxas altas de inactivação verificadas para os coliformes totais e fecais no meio marinho, são uma limitação importante para a sua utilização como indicadores de poluição viral remota (Fattal *et al.*, 1983). Outros microrganismos, como os estreptococos fecais e vários grupos de bacteriófagos foram propostos como indicadores fecais alternativos devido à sua maior sobrevivência em águas marinhas (Cornax *et al.*, 1990b).

Foi estabelecido que a sobrevivência dos vírus entéricos em ambientes aquáticos é superior à das bactérias fecais. Vários trabalhos, relataram valores de 18 meses em sedimentos e em caranguejos azuis (Goyal, 1984; Goyal *et al.*, 1984).

Relativamente ao significado das bactérias em tensão (stress) no meio aquático McFeters e Singh (1991) concluíram que as bactérias entéricas danificadas, em meios aquáticos, têm o mesmo significado para efeitos de sanidade, que as células não afectadas.

6. Poluição microbiológica em moluscos.

A maior parte dos moluscos bivalves destinados ao consumo humano procedem de zonas, que se encontram frequentemente sujeitas a poluição fecal, o que torna imperiosa a necessidade do seu controlo sanitário.

A contaminação dos moluscos é influenciada pelo seu processo biológico. Um mexilhão, de sete a oito cm de comprimento, pode filtrar em média, 43 litros de água em 24 h, podendo chegar a um máximo de 110 litros (Santiago, 1986). A taxa de acumulação no organismo filtrador depende do microrganismo considerado, já que se trata de um processo fundamentalmente físico de selecção do tamanho de partículas (Martínez-Manzanares *et al.*, 1992).

Os processos fisiológicos de respiração e alimentação dos moluscos, mediante a filtração da água do mar, permite utilizá-los como indicadores do grau de contaminação microbiológica das águas. Cabelli e Heffernan (1970) sugeriram que a quantidade de bactérias acumuladas pelos moluscos filtradores é proporcional ao número de bactérias existentes no meio aquático envolvente.

Trabalhos desenvolvidos por Plusquellec *et al.* (1983) indicam que os mexilhões podem ser úteis na avaliação da qualidade de águas com baixos níveis de poluição, ao contrário de uma avaliação feita por análise directa da água.

Os sedimentos são também utilizados para avaliar a qualidade das águas atendendo à sua capacidade em reter partículas.

O risco potencial que representa para a saúde humana o consumo de moluscos contaminados, não pode ser deduzido pela análise indirecta da poluição da água de cultivo nem pelo estudo microbiológico do sedimento. Somente a análise directa do molusco proporciona um conhecimento adequado do seu perigo (Martinez-Manzanares, 1989).

Os moluscos contaminados podem tornar-se sanitariamente seguros e aceitáveis para o consumo humano, mediante um processo de depuração.

Contudo, há indicações que a depuração pode não ser um processo adequado para o tratamento de moluscos, pois não elimina todos os patogénicos, especialmente pequenas bactérias e vírus, como por exemplo o da hepatite A (Motes, 1982). O sucesso da depuração depende do grau de contaminação da carne do molusco ao iniciar-se o processo (Mesquita *et al.*, 1991).

Enumeram-se a seguir os principais grupos de microrganismos potencialmente patogénicos que se detectam em moluscos contaminados:

Salmonella - As febres tifóide e paratifóide são as enfermidades, que na Europa e na América do Norte, se encontram associadas ao consumo de mariscos (Wood, 1979). Para *S. typhi* e *S. paratyphi*, a dose mínima infectiva é de uns poucos microrganismos (Bonde, 1981). Estudos de laboratório, mostram que a taxa média de acumulação oscila entre três a oito vezes relativamente à concentração do microrganismo na água (Martínez-Manzanares, 1989).

Vibrio cholerae - Comprovou-se recentemente que os mariscos podem transmitir a cólera (Wood, 1979).

Vibrio parahaemolyticus - No Japão, onde há um alto consumo de pescado cru, incluindo moluscos, verifica-se também uma alta incidência de toxi-infecções produzidas por este microrganismo.

Aeromonas hydrophila - Este microrganismo tem sido isolado de ostras implicadas em toxi-infecções alimentares (Abeyta *et al.*, 1986).

Vírus - Existem provas várias que a hepatite viral de tipo A se transmite por intermédio dos moluscos contaminados (Mosley, 1964; Wood, 1979). Contudo não se conhecem provas conclusivas da transmissão de enterovírus pelos moluscos.

7. Critérios de qualidade microbiológica para moluscos

Vários países e alguns organismos internacionais estabeleceram critérios, baseados em microrganismos indicadores, para avaliar a qualidade dos moluscos destinados ao consumo humano.

a - Directiva da Comunidade Económica Europeia (79/923/CEE)

Nesta directiva referente à qualidade das águas para cultura de moluscos, admite-se como máximo 300 coliformes fecais por 100 gramas de músculo e líquido intervalvar.

b - Directiva da Comunidade Económica Europeia (91/492/CEE)

Nesta directiva encontram-se as normas sanitárias para a produção e colocação no mercado de moluscos bivalves vivos. Indica também, como valor máximo 300 coliformes fecais/100g de molusco e líquido intervalvar, quando o molusco se destina a consumo directo. *Salmonella* tem que estar ausente em 25 g de músculo e estabelece o valor limite de 6000 coliformes fecais/100 g para os moluscos admitidos à depuração. Quando os valores ultrapassam os 6000 coliformes fecais/100g os moluscos terão que passar por um período longo de transposição, acompanhados ou não de depuração.

c- Decreto-lei 74/90 (Portugal-Ministério do Planeamento e da Administração do Território)

A legislação portuguesa transcrita no decreto-lei nº 74/90 estabelece o mesmo valor da directiva da Comunidade Europeia (79/923/CEE).

OBJECTIVOS

O constante crescimento demográfico ao redor de zonas costeiras e estuarinas associado à falta de eficiência dos sistemas de tratamento de águas residuais traz como consequência alterações no ecossistema aquático, limitando a sua potencial utilização e provocando riscos sanitários devido à presença de microrganismos patogénicos.

O objectivo global do presente trabalho consistiu no estudo das variações espaço-temporais do microbiota autóctone marinho para determinar a potencial alteração microbiológica, do ponto de vista ecológico das águas da Ria Formosa considerando três estações de amostragem com graus de influência de descargas fecais distintos. Por outro lado, estudou-se o grau de poluição das águas, a fim de seleccionar qual seria o melhor indicador para determinar o risco sanitário para os banhistas expostos e de toxi-infecções alimentares devidas ao consumo de moluscos contaminados.

Para abordar este objectivo global foram colocados os seguintes objectivos parciais:

- 1 - Estudo da variação temporal e espacial da abundância de microrganismos no sistema lagunar da Ria Formosa e sua relação com determinados parâmetros ambientais, de forma a contribuir para um melhor conhecimento sobre o estado actual deste ecossistema.
- 2 - Estudo de indicadores da qualidade microbiológica de águas contaminadas.
- 3 - Estudo de métodos de enumeração de estreptococos fecais e enterococos.
- 4 - Sobrevivência dos indicadores de contaminação fecal no meio ambiente aquático.

CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

1. SITUAÇÃO GEOGRÁFICA

A sudeste da costa portuguesa, mais precisamente no litoral algarvio, situa-se uma importante formação lagunar, denominada «Ria Formosa» ou Ria de Faro/Olhão (Figura 1).

Este sistema lagunar, conjuntamente com a Ria de Aveiro e os Estuários do Tejo e do Sado, constituem a nível nacional, o grupo das zonas húmidas mais importantes.

O presente estudo foi efectuado na parte ocidental da Ria Formosa, nas proximidades da cidade de Faro.

A Ria Formosa estende-se por cerca de 55 km, desde o Ancão (37° 1' 30" N - 8° 2' 30" W) a Cacela (37° 9' N - 7° 32' W), sendo a largura variável, podendo atingir os 6 km, desde Faro ao Cabo de S. Maria. Apresenta uma forma triangular e uma área de cerca de 16 300 ha. Estima-se uma área submersa (preia-mar das marés vivas) em 11 800 ha. (Monteiro, 1989). A sua extensão abrange os concelhos de Faro, Olhão, Loulé, Tavira e Vila Real de Santo António.

Este sistema enquadra-se na definição de laguna intertidal, segundo Dronkers e Zimmerman (1982). Encontra-se protegido do Oceano Atlântico por um importante cordão dunar, de formação aluvionar, constituído por cinco ilhas barreira, que se encontra cortado por seis barras ou passes que estabelecem a ligação do mar com a área interior que engloba zonas de salinas, viveiros, ilhas de pequenas dimensões e um conjunto de canais fortemente ramificado.

Pera (1986) considera a Ria Formosa como pertencente ao domínio dos estuários, atendendo à ausência de gradientes de salinidade significativos, à elevada taxa de renovação das águas e à baixa concentração de nutrientes.

2. CONDIÇÕES CLIMATOGRÁFICAS

O clima do litoral algarvio é do tipo mediterrânico, atendendo aos seus verões quentes e secos, invernos amenos e precipitações fracas.

Dados obtidos pelo sector de Agrometeorologia da Direcção de Serviços de Experimentação e Fomento da Produção Agro-Pecuária (Direcção Regional de Agricultura do Algarve), na Estação do Patacão, que se encontra nas proximidades das zonas abrangidas por este estudo, permitiram retirar as informações, que a seguir se apresentam, referentes à temperatura do ar e precipitação nos anos de 1990 e 1991.

Nos meses de Junho, Julho e Agosto, observaram-se as temperaturas mais altas que se situaram entre os 37,5 e 38° C. As temperaturas mais baixas (18,5 °C) registaram-se em Dezembro e Janeiro em 1990 e em Janeiro e Fevereiro em 1991.

Em relação à precipitação, há a salientar que esta só atingiu valores superiores a 70 mm nos meses de Fevereiro, Março e Dezembro, em 1990 e Abril e Dezembro de 1991. Não se registou nenhuma precipitação no período que decorreu de Junho a Setembro de 1990 e, entre Abril a Setembro de 1991.

3. GEOMORFOLOGIA

O fundo da ria é constituído por um substrato arenoso e/ou vasoso onde se encontram areias, quer de grão grosseiro quer fino e argilas (lodos). As vasas apresentam materiais minerais de reduzidas dimensões e substâncias orgânicas, resultantes da decomposição da vegetação do sapal, não se verificando associações vegetais.

As ilhas existentes no interior deste sistema lagunar são de reduzidas dimensões e resultam de mecanismos naturais ou da acumulação de materiais das dragagens dos canais principais.

Os canais são de profundidade variável, sendo os mais profundos os que permitem o acesso às áreas urbanas. À exceção dos canais principais, todo o interior da Ria é constituído por zonas intertidais, separadas por canais estreitos.

4. CONDIÇÕES HIDROGRÁFICAS E QUÍMICAS

A amplitude de marés é de cerca de 1 m nas marés mortas e 3 m nas marés vivas.

A existência de várias barras, parece ser o resultado da troca dum grande volume de água, entre a laguna e o oceano (Phleger, 1969).

As trocas de água com o mar são muito grandes e dão-se ao longo de cada ciclo de marés.

De forma idêntica ao que se passa em lagunas de pequena profundidade, toda a coluna de água desloca-se no mesmo sentido, o qual se inverte com o ritmo das marés. A Ria Formosa não recebe qualquer entrada importante de água doce, visto afluírem simplesmente algumas ribeiras de pouco significado do ponto de vista hidráulico (Barceló e Magalhães, 1988) e o rio Gilão. Os rios que chegam à Ria só têm um caudal significativo em um ou dois meses por ano e durante um número limitado de dias. Na área de Faro, um rio pequeno, Rio Seco, transporta água somente em alturas em que chove torrencialmente.

Durante as enxurradas, há a considerar uma importante quantidade de material sedimentar que é transportado para a laguna. As situações hidrológicas, no Verão e no Inverno, são assim muito diferentes. A influência da água doce no Verão é mínima, no entanto, há a assinalar um aumento considerável do caudal dos esgotos (Lima e Vale, 1980). A dispersão dos produtos transportados pelos caudais efluentes está dependente das correntes de água e da turbulência que estas provocam, o que favorece a deposição dos materiais em suspensão (Muzavor, 1986). No interior da Ria, ao contrário do que

se passa nas barras, as velocidades das correntes são relativamente baixas, o que favorece a deposição dos materiais em suspensão. Cortez e Gonçalves (em publicação) e Sampayo (em publicação) têm vindo a notar a diminuição do fluxo de água na Ria, considerando como causa provável o assoreamento dos canais, que estabelecem ligações com o oceano. Este facto é evidenciado pelo aumento dos dinoflagelados que requerem águas calmas e uma certa estratificação na coluna de água (Sampayo, em publicação). A coluna de água pode-se considerar homogénea, visto existir uma mistura vertical das águas, que é devida às velocidades das correntes associadas à pouca profundidade e também ao fraco contributo fluvio-continental (Dronkers e Zimmerman, 1982). Pode-se, portanto, considerar este ecossistema nitidamente influenciado pelo oceano (Lima e Vale, 1977).

Os valores da salinidade mantem-se aproximadamente constantes ao longo do ano (Silva e Assis, 1970). Os valores ao longo do ano localizam-se à volta de 36‰, exceptuando durante períodos curtos e esporádicos, especialmente após chuvas fortes de inverno. Os valores observados variam entre 32,09 (Silva e Assis, 1970) e 38,10‰ (Monteiro, 1989). As temperaturas médias das águas variam entre os 12° C no Inverno e 26° C no Verão (INIP, 1979).

Durante o decorrer do dia, a temperatura das águas pode variar de alguns ° C. A temperatura máxima da água, na Ria Formosa, ocorre entre os meses de Julho e Setembro. Em relação às concentrações de oxigénio dissolvido, estas parecem variar com a maré, tendo sido registados valores superiores em preia-mar (Cunha e Massapina, 1984). Assis *et al.* (1984) e Cunha e Massapina (1984) observaram que a percentagem de saturação em zonas do interior da Ria é inferior em relação às zonas mais próximas das barras.

No que respeita aos nutrientes, as suas concentrações na coluna de água dependem das trocas com o oceano e com os sedimentos dos diversos efluentes (domésticos, agrícolas e industriais), materiais carreados pelos rios e ribeiros e da presença de organismos bentónicos.

Na zona de Faro / Olhão, segundo Cortez e Gonçalves (em publicação) e Falcão e Vale (1990), os teores de amónio, nitrito e sílica decrescem desde o interior da ria até às barras. Observam-se para estes nutrientes, com excepção para o nitrito, que se encontra em concentrações muito baixas, valores mais elevados na situação de vazante. Trata-se, portanto, de nutrientes que são exportados da ria para o oceano. Pelo contrário, as concentrações observadas para os nitratos e fosfatos, decrescem das barras para o interior da ria, sendo as suas concentrações na enchente maiores que na vazante, pelo que se deduz que devem ser importados do mar. Nos teores de amónia tem-se verificado uma tendência para o aumento, sendo, provavelmente, devido ao aumento da poluição urbana. No inverno e em situações de muita pluviosidade, observa-se um acréscimo elevado nas concentrações dos nitratos. Sendo os nutrientes utilizados pela vegetação, verifica-se um decréscimo considerável, principalmente na Primavera. Esta situação não é tão clara para as zonas onde se verifica contaminação de origem antropogénica.

Estimativas feitas para cidade de Faro em termos de caudais domésticos, indicam débitos, na época alta à volta de 15.000 m³ / dia e 10.000 m³ / dia na época baixa (Consultores de Engenharia Civil, 1986).

Os valores normais encontrados para os nutrientes analisados por vários autores reflectem a capacidade de autodepuração deste sistema lagunar, atribuída à renovação das massas de água, à grande área de sapal (que absorve as concentrações excessivas) e à elevada percentagem de dias com elevada luminosidade (Lima e Vale, 1977; Ataíde e Benoliel, 1979; Pera, 1986; Falcão e Vale, 1990)

5. FLORA E FAUNA

As comunidades vegetais são variadas e encontram-se desde algas (*Ulva*, *Enteromorpha*, *Fucus*) até às fanerogâmicas, entre as quais se encontram plantas que vivem permanentemente imersas, como por exemplo a *Zostera* e outras que vivem quase sempre emersas, tal como algumas gramíneas e quenopodiáceas.

As comunidades dos sapais são formadas principalmente por gramíneas halófilas. O fitoplâncton existente nas águas varia em termos de composição e quantidade, ao longo da laguna e do ano, dependendo da influência oceânica, dos níveis de poluição, dos nutrientes, entre outros (Silva e Assis, 1970; Assis *et al.*, 1984).

O zooplâncton parece encontrar-se representado, numa forma dominante, por copépodes e por meroplâncton (Massapina, 1982). A fauna ictiológica, bentónica e ornitológica, está representada numa forma abundante e variada (Muzavor, 1986).

O substrato é povoado por moluscos, crustáceos, equinodermes, vermes, celenterados, entre outros. Em relação aos peixes, importa salientar a existência de várias espécies de elevado valor comercial e que se encontram dependentes da Ria (Muzavor *et al.*, 1993). Entre essas espécies destacam-se o sargo (*Diplodus sargus*), a dourada ou safata (*Sparus aurata*), a enguia (*Anguilla anguilla*), o linguado (*Solea senegalensis*), o robalo legítimo (*Dicentrarchus labrax*) e o salmonete legítimo (*Mullus surmuletus*).

Sob o ponto de vista ecológico, há a considerar uma zona delimitada, de água doce e salobra, o Ludo que alberga para nidificação um número importante de aves, sendo a maior parte delas migradoras.

A Ria Formosa constitui um lugar de abrigo, alimentação e nidificação importante para um grande número de aves. Estima-se que a Ria acolhe, durante o Inverno, cerca de 80 000 aves aquáticas (V. Encarnação, 1995, com. verbal).

6. POLUIÇÃO

Nos últimos anos, o crescimento dos centros urbanos e o desenvolvimento das técnicas de agricultura intensiva tem vindo a aumentar, o que poderá constituir um perigo para a estabilidade deste ecossistema.

Comparando com as zonas húmidas mais importantes, nomeadamente a Ria de Aveiro, os Estuários do Tejo e do Sado, a Ria Formosa, ainda não foi muito afectada por agentes poluidores. A Ria de Aveiro e o Estuário do Tejo foram já gravemente prejudicados pelos efluentes industriais. No Estuário do Sado, os efeitos negativos da produção de adubos e das actividades do Estaleiro da Setenave, já se fizeram reflectir nos bancos de ostras e nos tanques destinados ao cultivo de peixes (INIP, 1979).

Em termos de formações estuarinas e lagunares, localizadas na costa algarvia, há ainda a considerar os estuários do Rio Arade e do Rio Guadiana e a Ria do Alvor.

Trabalhos desenvolvidos por Coelho e Hall (1988), sobre a qualidade da água e moluscos bivalves da Ria do Alvor, sugeriram que este ecossistema se encontrava relativamente poluído sob o ponto de vista microbiológico; os valores imperativos estabelecidos pelas normas europeias para os indicadores de poluição fecal nunca foram excedidos, no entanto os valores guia foram muitas vezes ultrapassados.

Amostragens mensais realizadas pelo Centro de Investigação Marítima do Sul - Instituto Português de Investigação Marítima e considerando os últimos cinco anos (dados ainda não publicados) indicam que mais de 80% das amostras de moluscos bivalves da Ria de Alvor e mais de 95% das amostras colhidas no Rio Arade apresentam valores superiores ao limite recomendado pela Comunidade Europeia e estabelecido na legislação portuguesa.

Relativamente ao Rio Guadiana, estudos realizados no âmbito do projecto MEDSPA/COVERPLAM e relacionados com a qualidade da água na parte portuguesa da bacia do Guadiana, indicam que o nível de poluição neste rio é ainda reduzido sobretudo passada a influência de Badajoz (Costa *et al.*, 1992).

Estudos, sobre a qualidade microbiológica das águas e moluscos bivalves da Ria Formosa, consideram o grau de poluição considerável e carente de medidas correctivas (Cachola e Nunes, 1974, 1985 e 1986; Lima e Vale, 1980; Cachola e Sampayo, 1984; Nunes, 1984 a, b; Cachola, 1990; Baptista, 1990, 1993).

Segundo Serafim e Bebiano (em publicação) os níveis de metais e organoclorados, encontrados em sedimentos e em amêijoas da Ria Formosa, foram baixos e apresentam variações estacionais muito acentuadas, particularmente nas proximidades de fontes de poluição. No entanto, o aumento das concentrações de cádmio e cobre nas águas da Ria Formosa, poderão pôr em risco a qualidade do recurso de amêijoa *Ruditapes decussatus*, por exemplo.

7. ECONOMIA

A orla terrestre deste sistema lagunar é caracterizada por uma elevada densidade populacional 184 hab./ km². Estima-se para o concelho de Faro (Instituto Nacional de Estatística Censo, 1991), uma população residente de 50.761 habitantes. Dados constantes no Projecto de Execução do Sistema Interceptor e Estação de Tratamento das Águas Residuais da Cidade de Faro (Consultores de Engenharia Civil, 1986) referem-se a estimativas na época baixa, de cerca de 50.000 habitantes e em época alta, cerca de 65.000 habitantes.

As principais actividades com interesse económico existentes na área da Ria Formosa dependem da exploração dos recursos deste sistema lagunar: pesca, moluscicultura, piscicultura, extracção de sal, areias e turismo. A indústria transformadora, a agricultura e a sivicultura não são significativas. Atendendo à elevada produtividade, observada neste tipo de ecossistemas, a aquacultura é uma das actividades que muito beneficiam destes sistemas lagunares.

As salinas da Ria Formosa contribuíam com cerca de metade da produção do país.

Na zona intertidal vaso-arenosa, de cerca de 50 km² desenvolve-se um importante cultivo de moluscos bivalves.

A Ria Formosa é a principal zona produtora de moluscos bivalves, dado que contribui com cerca de 95% da produção nacional (Cachola, 1990). O número de viveiros legalizados é de 1.516, que ocupam uma área de 400 hectares. Esta actividade envolve 8.000 pessoas (R. Cachola, 1995, com. verbal).

Tem-se verificado, nos últimos anos, um decréscimo na produção de amêijoa, que agravado com o surto de mortalidade, reduziu a produção para valores da ordem das 3200 ton/ano (R. Cachola, 1995, com. verbal).

Por outro lado, várias espécies de peixes, de grande valor comercial e de interesse para a piscicultura, dependem da ria, pois aí vivem temporariamente, sob a forma de subadultos ou juvenis.

Para que se possa continuar a explorar estes valiosos recursos, é indispensável que as águas residuais sejam tratadas de uma forma eficiente e que existam centros de depuração de moluscos bivalves (Conclusões e Recomendações do "1º Encontro sobre a Ria Formosa", Nov. 1992; em publicação).

Quanto a actividades lúdicas, há a considerar os 55 km de praias, que se estendem pelo cordão dunar assim como uma capacidade de alojamento importante .

Embora tenha já sido afectada por alguma intervenção de origem antropogénica, a Ria Formosa preserva ainda grande parte das suas características naturais e do seu valor ecológico e paisagístico, contrastando com o avançado estado de degradação que caracteriza a generalidade dos sistemas de barreira do litoral mediterrânico europeu (Andrade, 1990).

A zona que inclui a Ria Formosa foi classificada como Reserva Natural, desde 1978 pelo Decreto nº 45 de 2 de Maio do mesmo ano (Portugal - Ministério da Habitação e das Obras Públicas). Existe um plano de ordenamento para a Reserva Natural, que data de Outubro de 1985. Através do Decreto Lei nº 373/87 (Portugal - Ministério do Planeamento e da Administração do Território) o estatuto de Reserva foi alterado para o de Parque Natural, tendo sido elaborado um novo plano de ordenamento, que data de Junho de 1986. A preservação, conservação e defesa deste importante sistema lagunar, que é a Ria Formosa, constitui um dos objectivos do Parque Natural da Ria Formosa.

MATERIAL E MÉTODOS

1. MATERIAL

1.1. Zonas de amostragem e colheita de amostras

Antes de se estabelecer o plano de amostragem definitivo, foram efectuados trabalhos de pré-amostragem que permitiram seleccionar os locais, hora e periodicidade.

As estações de colheita de amostras para avaliação da qualidade microbiológica das águas da Ria Formosa foram escolhidas de forma a obter ambientes aquáticos, que à partida, se esperava apresentarem graus de contaminação distintos, atendendo ao seu posicionamento em relação a fontes poluentes (Figura 2).

Para a selecção dos locais de colheita, também se tomou em consideração o acesso, de forma a não torná-lo dependente de outro tipo de transporte para além do rodovário, tentando desta forma assegurar que as amostras fossem sempre recolhidas nas datas e horas previstas.

Desta forma a estação denominada Portas do Mar (PM), é a que se encontra mais próxima dos principais efluentes domésticos, industriais e agrícolas não tratados, da cidade de Faro. Nas proximidades desta estação localiza-se uma área importante de viveiros de moluscos bivalves. É também um local de acostagem de barcos de transporte de veraneantes. A profundidade neste local de amostragem é, em maré cheia de aproximadamente 2 metros. Nas proximidades desta estação é frequente observar-se a prática de desportos náuticos, principalmente canoagem, remo e vela.

A estação Ponte Cais (PC) embora mais afastada, ainda se pode considerar sob influência de esgotos domésticos. Esporadicamente esta zona é também afectada pelos resíduos emitidos pelos navios acostados ao Porto de Faro, para efeitos de docagem.



Figura 2. Desenho esquemático com localização das zonas de amostragem

A estação Ilha (I) constitui o local de amostragem mais distanciado das fontes poluidoras. Nas suas redondezas também se encontram viveiros de bivalves. Durante o Verão esta zona é utilizada para fins recreativos, com contacto directo com a água.

A colheita das amostras de água foi sempre efectuada entre as 9 e as 11 h da manhã, utilizando frascos esterilizados de vidro com um litro de capacidade.

As amostras foram colhidas a aproximadamente 30 cm da superfície da água. Para atingir a profundidade desejada os frascos de vidro eram colocados numa armação de metal lastrada e munida de cabo para abertura controlada.

Para assegurar um transporte em condições adequadas de temperatura, os frascos contendo as amostras, eram colocados em mala térmica portátil com acumuladores de frio. As análises foram sempre efectuadas dentro de um período que nunca ultrapassou as 4 horas que se seguiram à colheita da amostra.

Para o estudo de meios selectivos de estreptococos fecais foram colhidas, amostras de água doce em poços situados nos concelhos de Faro e Loulé. A contaminação destas águas é esporádica e tem como origem principal fezes de animais domésticos. As amostras representativas do ambiente aquático marinho foram colhidas na estação Portas do Mar.

Foram também colhidas amostras de moluscos bivalves da espécie *Mytilus edulis*, nas estações Ponte Cais e Ilha aquando das colheitas de água, o que permitiu estabelecer comparações entre os resultados de ambas as análises.

1.2. Periodicidade e número de amostras

1.2.1. Estudo sobre a variação espaço-temporal de microrganismos indicadores e patogénicos em águas da Ria Formosa

Durante o período que decorreu entre Março de 1990 a Março de 1992 foram colhidas mensalmente amostras de água nas estações referenciadas como Portas do Mar, Ponte Cais e Ilha. Recolheram-se um total de 25 amostras para cada estação.

Para obtenção de condições de amostragem similares nas diferentes colheitas, estas foram sempre efectuadas 2 horas antes da baixa-mar e aproximadamente à mesma hora do dia.

1.2.2. Moluscos bivalves

Foram colhidas um total de 10 amostras, ao longo das diferentes estações do ano.

1.2.3. Estudo sobre meios selectivos para estreptococos fecais

Para a realização deste estudo foram colhidas 13 amostras de água da Ria Formosa na estação Portas do Mar, durante o período que decorreu de Março a Dezembro de 1992. De Maio a Junho de 1993, colheram-se 6 amostras de águas de poços de água doce situados nos Concelhos de Faro e Loulé.

1.3. Microrganismos

Foram utilizadas as estirpes bacterianas apresentadas na tabela 1 para a quantificação de colifagos, para o teste de crescimento qualitativo de estreptococos fecais e para o estudo de sobrevivência em laboratório.

Para a conservação das estirpes utilizaram-se culturas de 18 h em tubos com caldo triptona de soja, aos quais se adicionou glicerol a 20%, esterilizado, de forma a obter uma concentração final de aproximadamente 3%. As culturas assim preparadas, foram conservadas a temperaturas de aproximadamente -20° C, em tubos de Eppendorf (0,5 - 1 ml).

1.4. Meios de cultura

Para a aplicação dos diferentes testes que compozeram o presente estudo, foram utilizados vários meios de cultura e soluções que se descrevem a seguir. A reconstituição dos meios de cultura disponíveis no circuito comercial, foi efectuada de acordo com as instruções do fabricante.

Tabela 1. Listagem dos microrganismos utilizados no presente estudo

Microrganismo	Origem	Aplicação
<i>Bacteroides fragilis</i> HSP40	Univ. Málaga- dep. de Microbiologia	Enumeração de bacteriófagos somáticos de <i>B. fragilis</i>
<i>Escherichia coli</i> C	ATCC 13706	Enumeração de colifagos somáticos
<i>E. coli</i> C	CECT 381	Enumeração de colifagos somáticos
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 8213	Crescimento em meios selectivos para estreptococos fecais (EF)
<i>E. faecalis</i>	ATCC 19433	Cres. em meios selectivos para EF
<i>E. faecium</i>	ATCC 10541	Cres. em meios selectivos para EF
<i>Salmonella typhimurium</i> WG49 (F+)	Univ. Málaga- Dep. de Microbiologia	Enumeração de bacteriófagos F-específicos
<i>Salmonella typhimurium</i> WG45 (F-)	Univ. Málaga- Dep. de Microbiologia	Enumeração de bacteriófagos somáticos de <i>Salmonella</i>
<i>Streptococcus equinus</i>	CECT 973	Cres. em meios selectivos para EF
<i>S. mitis</i>	CECT 804	Cres. em meios selectivos para EF
<i>Staphylococcus aureus</i>	NCTC 8532	Cres. em meios selectivos para EF
<i>S. epidermidis</i>	NCTC 4276	Cres. em meios selectivos para EF
<i>E. coli</i>	NCTC 9001	Cres. em meios selectivos para EF
<i>Klebsiella aerogenes</i>	NCTC 418	Cres. em meios selectivos para EF
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC 13883	Cres. em meios selectivos para EF
<i>Proteus vulgaris</i>	CECT 484	Cres. em meios selectivos para EF
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 13311	Cres. em meios selectivos para EF
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 10145	Cres. em meios selectivos para EF
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	NCTC 10003	Cres. em meios selectivos para EF
<i>Candida albicans</i>	INSA 969	Cres. em meios selectivos para EF

ATCC, American Type Culture Collection; CECT, Colección Española de Cultivos Tipo; NCTC, National Collection of Type Cultures; INSA, Instituto Nacional de Saúde (Portugal).

1.4.1. Meios de inóculo e pré- enriquecimento

1.4.1.1. Água de peptona tamponada

Meio proposto por Edel e Kampelmacher (1969), para o pré-enriquecimento de *Salmonella*.

Composição:

Peptona de carne (Difco)	10 g
Cloreto de sódio (Oxoid)	5 g
Fosfato dissódico.12 H ₂ O (Merck)	9 g
Fosfato monopotássico (Merck)	1,5 g
pH: 7,2	

Após dissolução dos componentes, esteriliza-se a 121° C durante 15 min.

1.4.1.2. Caldo triptona de soja (Oxoid)

Meio de cultura, muito nutritivo, que permite o crescimento de microrganismos fastidiosos. Foi utilizado no presente trabalho para cultura de *Escherichia coli* C e K12.

1.4.1.3. Caldo triptona-extracto de levedura-glucose (TYG)

Empregou-se este caldo para a cultura de *Salmonella typhimurium* WG45 e WG49. Para a enumeração dos seus bacteriófagos este caldo foi suplementado com agar (1,4%).

Composição:

Trypticase peptona (Difco)	10 g
Extracto de levedura	1 g
Cloreto de sódio	8 g
Água destilada	1000 ml
pH: 7,2	

Este meio é esterilizado em autoclave a 121° C. Após o seu arrefecimento junta-se-lhe uma solução estéril de glucose (Analema) (1 g/ l) e de cloreto de cálcio 2 H₂O (0,3 g / l).

1.4.1. 4. Caldo Brucella Modificado (Tartera e Jofre, 1987)

Este caldo foi utilizado para a cultura de *Bacteroides fragilis* HSP40.

Composição:

Caldo Brucella (Difco)	28 g
L-cisteína clorídrico (Merck)	10 g
Sulfato de magnésio. 7 H ₂ O	0,12 g
Cloreto de cálcio	0,05 g
Água destilada	1000 ml

pH: 7,2

O meio de cultura é distribuído em frascos de vidro de 50-100 ml, e borbulha-se com CO₂ (80%) e N₂ (20%) até se obter uma atmosfera anaeróbia. Posteriormente os frascos são selados com uma tampa de borracha e uma chapa metálica e esterilizados em autoclave a 120° C.

1.4.1. 5. Caldo de infusão de cérebro e coração (BHIB) (Difco)

Utilizou-se este caldo no estudo de enumeração de estreptococos fecais como meio base ao qual se adicionaram substâncias inibitórias.

1.4.1 6. Agar Columbia (Oxoid)

Utilizou-se para o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*, com incubação a 42° C ± 0,5° C.

1.4.1 7. Agar de infusão de cérebro e coração (BHI) (Difco)

Este meio foi utilizado no presente estudo para subcultivar colônias de estreptococos.

1.4.2. Meios de enriquecimento

1.4.2.1. Caldo MacConkey (Oxoid)

Meio utilizado para a detecção e quantificação de coliformes, através da técnica dos tubos múltiplos, quer para o teste presumptivo, quer para o confirmativo. Para inocular volumes de 10 ml de amostra, emprega-se em concentração dupla.

1.4.2.2. Caldo azida dextrose (Meio de Rothe) (Difco)

Meio selectivo para a detecção de estreptococos em amostras de água e esgotos. Foi empregue como prova presumptiva na técnica dos tubos múltiplos. Usaram-se concentrações duplas, para inóculos de 10 ml.

1.4.2.3. Caldo etilo violeta azida (EVA; Meio de Litsky) (Difco)

Este caldo constitui um meio selectivo para a detecção e confirmação de estreptococos fecais, pela técnica dos tubos múltiplos.

1.4.2.4. Caldo Rappaport-Vassiliadis (bioMérieux) modificado

Usado para o enriquecimento selectivo de *Salmonella*, em amostras de água e moluscos, empregando a técnica dos tubos múltiplos.

A modificação proposta por Moriñigo *et al.*(1986) consiste na adição de 10 µg/ml de novobiocina sódica (Sigma) ao caldo Rappaport-Vassiliadis (bioMérieux).

1.4.3. Meios de enumeração pela técnica da membrana filtrante

1.4.3.1. Agar mEndo LES (Difco)

Meio selectivo e diferencial usado para o isolamento e enumeração de coliformes totais.

1.4.3.2. Agar mFC (Difco)

Meio selectivo utilizado para quantificação de coliformes fecais.

1.4.3.3. Agar mEnterococcus (Difco)

Meio selectivo usado para o isolamento e enumeração de enterococos.

1.4.3.4. Agar KF (Difco)

Meio selectivo aplicado para o isolamento e enumeração de estreptococos fecais. Este meio é suplementado, previamente à sua utilização, com 1 ml / l de uma solução a 1% de cloreto de trifetil *tetrazolium*.

1.4.3.5. Agar Bile Esculina (Difco)

É um meio diferencial utilizado para o isolamento e identificação presumptiva de estreptococos do grupo D de Lancefield.

1.4.3.6. Agar Bile Esculina Azida (Agar Pfizer) (Difco)

Meio selectivo empregue para o isolamento e identificação presumptiva de estreptococos do Grupo D de Lancefield.

1.4.3.7. Meio basal de Barne (Agar de acetato de tálio) (Biolife)

Este meio foi usado para a detecção de enterococos em fontes de contaminação heterogénea. É suplementado com uma solução de cloreto 2-3-5 *tetrazolium* a uma concentração final de 0,01%.

1.4.3.8. Agar Kanamicina Esculina Azida (KEA) (Oxoid)

Neste meio de cultura utilizado para o isolamento de estreptococos do grupo D de Lancefield, os sais biliares que actuam como agente inibidor, são substituídos por kanamicina.

1.4.3.9. Agar Mitis Salivarius (MS) (Difco)

Este meio de cultura suplementado com uma solução de telurito a 1%, foi empregue para o isolamento e identificação de estreptococos fecais, especialmente do grupo viridans (*S. mitis* e *S. salivarius*).

1.4.3.10. Agar selectivo para *Pseudomonas aeruginosa* (Diagnostics Pasteur)

Meio selectivo para a contagem de bacilo piociânico.

1.4.3.11. Agar BiGGY (Oxoid)

Este meio foi usado para a enumeração de *Candida albicans*.

1.4.3.12. Agar dextrose Sabouraud (Difco)

Meio usado para a contagem de *Candida albicans*. Para aumentar a sua selectividade suplementa-se com cloranfenicol (Sigma) na proporção de 1 mg / ml de meio.

1.4.4. Meios para contagem directa

1.4.4.1. Agar para contagem em placa (PCA) (Oxoid)

Utilizado para a contagem de microrganismos heterotróficos totais e como meio de referência nos estudos para o crescimento qualitativo, selectividade e exactidão.

1.4.4.2. Agar brando

Empregou-se na detecção e quantificação de colifagos, como meio para verter em placa.

Composição (g/l):

Triptona	10 g
Cloreto de sódio	10 g
Agar	7 g
Água deionizada	1000 ml
pH: 7,2	

Esteriliza-se a 121° C, durante 15min.

1.4.4.3. Agar triptona de soja (TSA) (Oxoid)

Utilizado como meio de isolamento e obtenção de massa, assim como meio de referência nos testes de crescimento qualitativo, selectividade e exactidão.

1.4.4.4. Agar de ZoBell a 35‰ (Rheinheimer, 1977)

Este meio foi usado para contagem de microrganismos saprófitos que crescem em meios com salinidades na ordem de 35‰

Composição:

Peptona (Difco)	5 g
Extracto de levedura (Difco)	1 g
Agar (Difco)	15 g
Água do mar filtrada e envelhecida	1000 ml
pH: 7,6	

Esteriliza-se a 120° C, durante 15 min.

1.4.4.5. Agar de ZoBell a 17,5‰ (Rheinheimer, 1977)

Meio usado para a contagem de microrganismos saprófitos que crescem em meios com salinidades na ordem de 17,5‰

Composição:

Peptona (Difco)	5 g
Extracto de levedura (Difco)	1 g
Agar (Difco)	15 g
Água do mar filtrada e envelhecida	500 ml
Água destilada	500 ml
pH: 7,6	

Esteriliza-se a 120° C, durante 15 min.

1.4.4.6. Agar Scholten modificado (MSA) (Havelaar e Hogeboom, 1983)

Meio não selectivo utilizado para a detecção e contagem de bacteriófagos de *Escherichia coli*.

Composição:

Extracto de carne	12 g
Extracto de levedura	3 g
Peptona	10 g
Cloreto de sódio	3 g
Carbonato de sódio	0,72 g
Sulfato de magnésio .7H ₂ O	0,12 g
Agar	12 g
Água destilada	1000 ml

pH: 7,2

Esterilizar a 121° C durante 15 min. Deixar arrefecer até atingir uma temperatura entre 45-50° C, e antes de se proceder à distribuição do meio em placas adiciona-se uma solução de cloreto de cálcio 2 H₂O a 3%, esterilizada por filtração.

1.4.4.7. Agar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) (Oxoid)

Meio selectivo e diferencial, para a confirmação e isolamento de *Salmonella*.

1.4.4.8. Agar Base Sangue Modificado (Tartera e Jofre, 1987)

Meio utilizado para a enumeração de bacteriófagos do género *Bacteroides*.

Composição:

Agar Base Sangue N° 2	40 g
L-cisteína clorídrica	0,05 g
Sulfato de magnésio 7 H ₂ O	0,12 g
Água destilada	1000 ml

pH: 7,2

O meio Agar Base Sangue Modificado é esterilizado em autoclave a 121° C durante 15 min e suplementado com uma solução estéril de cloreto de cálcio (0,05 g/ l).

1.4.5. Meios para provas bioquímicas

1.4.5.1. Agar com ferro de Kligler (Oxoid)

Utilizou-se para testar a capacidade dos microrganismos fermentarem a glucose e a lactose, assim como a produção de ácido sulfídrico e gases.

1.4.5.2. Agar esculina (Difco)

Através da utilização deste meio comprova-se a capacidade dos microrganismos hidrolizarem a esculina.

1.4.5.3. Agar A de King (bioMérieux)

Empregou-se para verificar a presença de pigmentos na identificação de *Pseudomonas aeruginosa*. Este meio favorece a produção de piocianina e outros pigmentos fenacínicos.

1.4.5.4. Agar B de King (bioMérieux)

Utilizou-se para confirmação de *Pseudomonas aeruginosa*.

1.4.5.5. Caldo de ureia-indol (bioMérieux)

Utilizado para o estudo de bactérias produtoras de enzimas urease e triptofanase.

1.4.5.6. Discos de ONPG (Difco)

Empregues para detectar a existência nos microrganismos da enzima β -galactosidase.

1.4.5.7. Galerias do sistema API (bioMérieux)

Utilizaram-se para identificação das estirpes isoladas. A sua aplicação depende, do grupo ou género a que o microrganismo em estudo pertence (API STAPH; API 20 NE; API 20 E; API 20 STREP).

1.5. Soluções

1.5.1. Sêro fisiológico a 0,85%

Utilizou-se para preparação de suspensões de culturas puras de estreptococos fecais.

1.5.2. Água do mar envelhecida (ZoBell e Grant, 1943)

Empregue em estudos de sobrevivência e na preparação de meios de cultura. A água foi colhida no Oceano Atlântico, em mar alto, encontrando-se assim, relativamente livre de contaminação antropogénica. Após filtração, procedeu-se ao seu envelhecimento em recipientes de vidro e ao abrigo da luz durante um período de vários meses (superior a três).

1.5.3. Solução tampão fosfato (APHA, 1985)

Usou-se como solução diluente e para lavagem dos copos de filtração utilizados na técnica de filtração por membrana.

Composição:

Solução-mãe ("stock"):

Fosfato monopotássico	34 g
Água destilada	1000 ml
pH: 7,2	

Juntam-se 1,25 ml da solução-mãe e 5 ml de uma solução de cloreto de magnésio (81,1 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ / litro de água destilada). Esteriliza-se em autoclave a 121° C, durante 15 min.

1.5.4. Água de peptona salina (ICMSF, 1978)

Empregou-se como diluente nas homogeneizações e para efectuar diluições decimais de amostras de moluscos.

Composição:

Peptona	1 g
Cloreto de sódio	8,5 g
Água destilada	1000 ml
pH: 7	

Após a dissolução dos componentes, esterilizar a 121° C, durante 15 min.

1.5.5. Formalina (37%-39%)

Empregou-se para fixar amostras e na preparação do corante alaranjado de acridina.

1.5.6. Solução de Lugol

Foi empregue no método de coloração de Gram, como fixador do primeiro corante.

1.5.7. Solução de amido

Dissolver 1 g de amido solúvel em 100 ml de água destilada. Ferver durante alguns minutos. Esta solução não deve ser mantida por períodos superiores a uma semana, podendo ser estabilizada com 1ml de fenol.

Este indicador foi utilizado na determinação do oxigénio dissolvido, tendo-se aplicado o método de Winkler modificado por Grasshoff (1976).

1.6. Reagentes

1.6.1. Reagente para a prova da catalase (Smibert e Krieg, 1981)

Utiliza-se o peróxido de hidrogénio a 3% como reagente para esta prova.

1.6.2. Reagente para testar a citocromo-oxidase

Podem ser utilizados para este teste discos já preparados (bioMérieux), ou preparar a solução.

1.6.3. Telurito de potássio a 1% (Difco)

Este reagente é utilizado na preparação do Agar Mitis Salivarius.

1.6.4. Cloreto de trifetil 2- 3-5 *tetrazolium* a 1% (Difco)

Para adicionar ao meio de Agar KF.

1.6.5. Hidróxido de potássio (KOH) a 3%

Foi utilizado para estudar o comportamento microbiano em relação à reacção ao Gram.

1.6.6. Reagentes para a determinação do oxigénio dissolvido (Winkler, com modificações descritas por Grasshoff, 1976)

a - Solução de manganês (Winkler 1)

Dissolver 40 g de $MnCl_2 \cdot 5H_2O$ em água destilada e perfazer o volume a 100 ml.

b - Solução alcalina de iodeto (Winkler 2)

Dissolver numa quantidade mínima de água destilada e em separado 60 g de KI e 30 g KOH. Juntar as duas soluções e perfazer a 100 ml. Esta solução deve ser guardada em frasco de vidro escuro.

c - Ácido sulfúrico

Adicionar cuidadosamente 50 ml de ácido sulfúrico a 50 ml de água destilada.

d - Solução de tiosulfato de sódio

Dissolver 49,5 g de $Na_2 S_2 O_3 \cdot 5 H_2O$ em água destilada e perfazer a 1000 ml. Para uso, esta solução é diluída com água destilada na proporção 1:10. A solução é conservada em frasco de vidro escuro.

e - Solução padrão de iodato de potássio

Dissolver, exactamente, 325 mg de $KH(IO_3)_2$ ou 356,7 mg de KIO_3 em água destilada e perfazer exactamente a 1000 ml. Esta solução é estável por dois meses.

1.7. Corantes

1.7.1. Solução de alaranjado de acridina

Este corante é aplicado na determinação do número total de bactérias por contagem directa em microscópio de epifluorescência.

Composição:

Alaranjado de acridina (Merck)	0,3 g
Formalina a 37-39%	10 g
Água destilada	290 ml

1.7.2. Solução de violeta de metilo (modificação de Jensen, descrita por Cruickshank *et al.*, 1975)

Composição:

Violeta de metilo	5 g
Água destilada	1000 ml

Este corante foi empregue na coloração diferencial de Gram.

1.7.3. Solução de vermelho neutro (modificação de Jensen, descrita por Cruickshank *et al.*, 1975)

Composição:

Vermelho neutro	1 g
Ácido acético a 1%	2 ml
Água destilada	1000 ml

Utilizado na coloração diferencial de Gram.

1.8. Soros

1.8.1. Soros polivalentes, anti-*Salmonella*

Foram utilizados para efectuar a confirmação serológica:

- Soro anti-grupos somáticos-0. Grupo D₁, factores 1, 9, 12 (Difco).
- Soro anti-grupos somáticos-0. poli A-I e Vi (Difco).

1.8.2. Soro humano

O soro humano foi empregue para observação de tubos germinativos, na identificação de *Candida albicans*.

2. MÉTODOS

Neste trabalho foram analisadas amostras de água provenientes da Ria Formosa, nas quais foram determinados parâmetros físico-químicos e microbiológicos, e, unicamente parâmetros bacteriológicos em moluscos bivalves provenientes das mesmas estações de amostragem.

Foram considerados os seguintes parâmetros:

a. Físico-químicos:

- Temperatura
- Transparência
- Salinidade
- Oxigénio dissolvido

b. Microbiológicos:

- Microrganismos mesófilos que crescem a temperaturas de 22° C e a 37° C

- Microrganismos saprófitos que crescem a 35‰ e a 17,5‰ de salinidade
- Coliformes totais
- Coliformes fecais
- Estreptococos fecais
- *Salmonella*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Candida albicans*
- Bacteriófagos somáticos de *Escherichia coli* C

No âmbito deste trabalho foram feitos estudos sobre meios selectivos para estreptococos fecais onde foram utilizados os seguintes agares, na técnica de filtração por membrana:

- m Enterococcus;
- KF;
- Bilis Esculina Azida;
- Kanamicina Esculina Azida (KEA);
- Meio basal de Barne;
- Mitis Salivarius (MS);

e os seguintes caldos na técnica dos tubos múltiplos:

- Azida Dextrose;
- Etilo Violeta Azida.

Ainda neste trabalho foi elaborado um estudo da sobrevivência de indicadores fecais na água do mar, nomeadamente:

- Coliformes fecais;
- Coliformes totais;
- Estreptococos fecais;
- Bacteriófagos somáticos de *Escherichia coli* C e *Escherichia coli* K12;
- Bacteriófagos Fimbria específicos e somáticos de *Salmonella*;
- Bacteriófagos somáticos de *Bacteroides fragilis*.

2.1. Processamento das amostras

2.1.1. Amostras de água

Para a determinação do número total de bactérias foram utilizadas sub-amostras de 20 ml fixadas a 2%, imediatamente após a colheita da amostra, com uma solução de formol (37%-39%) esterilizada por filtração.

Para a determinação dos restantes parâmetros microbiológicos as amostras não sofreram tratamento prévio, tendo sido feitas diluições decimais seriadas, utilizando solução tampão fosfato (1.5.3.) e imediatamente semeadas em meios adequados a cada pesquisa.

2.1.2. Moluscos

Eliminaram-se os mexilhões que apresentavam as valvas permanentemente abertas ou danificadas, assim como os indivíduos mortos. As conchas foram cuidadosamente lavadas em água da torneira corrente, usando uma escova e uma faca de extremidades rombas para remover a lama, a fauna e flora epífitas. Em seguida, foram secos com papel absorvente e as conchas limpas com algodão embebido em álcool etílico. As valvas foram abertas, após o corte do músculo adutor, utilizando um bisturi esterilizado. Quer o líquido intervalvar, quer a parte edível foram depositados numa caixa de Petri, estéril e tarada, para fins de pesagem.

Para a pesquisa de coliformes totais, coliformes fecais e estreptococos fecais, foram pesados 30 g de músculo e líquido intervalvar, que se diluíram 10 vezes em água de peptona salina (1.5.4).

Para a pesquisa de *Salmonella*, pesaram-se 25 g de músculo e líquido intervalvar, aos quais foi adicionado 225 ml de água de peptona tamponada (1.4.1.1.).

As suspensões foram colocadas em sacos estéreis e homogeneizados durante 90 s, em homogeneizador «Stomacher 400» (Seward Laboratory, London). Para a pesquisa dos microrganismos indicadores de contaminação fecal (coliformes totais, coliformes fecais, estreptococos fecais), efectuaram-se imediatamente diluições decimais seriadas.

2.2. Parâmetros físico-químicos

2.2.1. Transparência

A transparência da água está dependente da matéria orgânica que nela se encontra em suspensão e da quantidade de fitoplâncton. A determinação da transparência da água, através da utilização do disco de Secchi, permite estimar a diminuição de intensidade da luz na água. A profundidade abaixo da qual se deixa de ver o disco, profundidade de visibilidade, é uma medida da transparência da água.

Determinou-se a transparência da água por medição com o disco de Secchi de 30 cm de diâmetro, com sectores alternados preto e branco, munido de um cabo marcado de centímetro em centímetro.

2.2.2. Temperatura

A temperatura foi determinada usando o termómetro de mercúrio instalado na garrafa de Nansen e graduado ao décimo de grau centígrado.

2.2.3. Concentração de oxigénio dissolvido

Aplicou-se o método de Winkler com as modificações descritas por Grasshoff (1976).

Trata-se de um método iodométrico e baseia-se na adição à amostra, de hidróxido de manganês II, seguida duma solução fortemente alcalina de iodeto. A

oxidação do hidróxido de manganês pelo oxigénio dissolvido origina um precipitado de hidróxido de manganês de valência elevada. Na presença de iões de iodo e subsequente acidificação, o hidróxido de manganês passa a um estado bivalente, com libertação de iodo equivalente ao conteúdo de oxigénio dissolvido na amostra. Utilizando uma solução padrão de tiosulfato de sódio titula-se o iodo libertado.

Para recolha das amostras de água, utilizou-se uma garrafa de Nansen de 2 litros de capacidade, a partir da qual se transferiu cuidadosamente a água para frascos de vidro calibrados. Ainda no local de amostragem, juntou-se a cada um dos frascos, os reagentes de Winkler 1 e 2. A recolha das amostras para cada estação foi feita em duplicado.

2.2.4. Salinidade

A salinidade foi registada, através de medição directa, utilizando uma multisonda, CTD 100 plus, da empresa alemã SIS, seguindo as instruções do equipamento.

Para cada amostra foram efectuadas três determinações.

2.3. Parâmetros microbiológicos

As análises microbiológicas feitas através do emprego da técnica da filtração por membrana foram efectuadas considerando 5 replicados. Os resultados apresentados referem-se a médias destes replicados.

A técnica dos tubos múltiplos foi realizada utilizando séries de três tubos. A interpretação dos resultados dos tubos de fermentação é feita através do cálculo do Número Mais Provável usando as tabelas de McCrady descritas por Rodier (1984).

2.3.1. Contagem por incorporação em agar (APHA, 1985)

É um método simples e padronizado para determinar o número de microrganismos numa amostra líquida. Baseia-se na hipótese de que as células microbianas contidas na amostra originam cada uma delas colónias visíveis e individualizadas, após um determinado período de incubação a temperatura adequada.

Caixas de Petri esterilizadas de 100 x 15 mm são semeadas por inoculação de volumes 1 e 0,1 ml da amostra não diluída e de 1ml das diluições decimais seguintes.

Após a sementeira, verte-se em cada caixa aproximadamente 12 a 15 ml do meio de cultura que se encontra em sobrefusão a $45 \pm 0,5^\circ \text{C}$. A amostra é bem distribuída no agar mediante movimentos giratórios da placa, alternando num e noutro sentido. Após solidificação do meio de cultura, as placas são invertidas e incubadas em aerobiose.

Decorrido o período de incubação, procede-se à contagem do número total de colónias desenvolvidas utilizando um contador de colónias Quebec. Para efectuar os cálculos consideram-se somente as contagens compreendidas entre 30 e 300 colónias, que são expressas em unidades formadoras de colónias por 100 ml (ufc / 100 ml). A expressão dos resultados é feita de acordo com a fórmula que se segue:

$$\text{ufc} / 100\text{ml} = N / (V \times D) \times 100$$

sendo N a média dos replicados

V o volume inoculado

D a diluição semeada.

2.3.1.1. Microrganismos mesófilos a 37°C e a 22°C

Para a realização desta pesquisa empregou-se como meio de cultura, agar para contagem em placa (PCA, Difco).

Em relação a estes microrganismos foram feitas determinações para os que crescem a $37 \pm 1^\circ \text{C}$ e a $22 \pm 1^\circ \text{C}$. O período de incubação para o primeiro caso foi de 48 h e para o segundo 72 h.

2.3.1.2. Microrganismos saprófitos que crescem em meios com salinidades de 37‰ e 17,5‰

Como meios de cultura, foram empregues os agares de Zobell descritos em 1.4.4.4 e 1.4.4.5. A incubação foi feita em condições de aerobiose, à temperatura de $37 \pm 1^\circ \text{C}$, durante 5 dias.

2.3.2. Técnica dos tubos múltiplos e quantificação dos microrganismos pelo método do Número Mais Provável (NMP)

2.3.2.1. Detecção e quantificação de *Salmonella* (Moriñigo *et al.*, 1986)

Para esta pesquisa emprega-se uma adaptação da técnica dos tubos múltiplos.

Aliquotas de 100 ml da amostra filtram-se através de membranas com diâmetro de poro de $0,45 \mu\text{m}$. Após filtração, dobram-se as membranas sobre si próprias e introduzem-se em tubos com 10 ml de água de peptona tamponada (1.4.1.1.). Volumes de 1 e 0,1 ml inoculam-se directamente nos tubos. Quando se trata de amostras de moluscos, os homogeneizados são inoculados directamente nos tubos. Para cada amostra foram inoculados tubos (séries de três) contendo meio de pré-enriquecimento, que são incubados a $36 \pm 1^\circ \text{C}$, durante 24 h. Decorrido o período de incubação, repica-se 0,1 ml de cultura de cada tubo de água de peptona tamponada para tubos com 10 ml de caldo de Rappaport e Vassiliadis, aos quais se adicionou Novobiocina ($10 \mu\text{g/ml}$). Os tubos são incubados a $43 \pm 0,5^\circ \text{C}$, durante 48-72 h. Após o tempo de incubação, de cada tubo que apresente turvação, faz-se um isolamento por estria em placas de agar xilose-lisina-desoxicolato (1.4.4.7.), que se incubam a $36 \pm 1^\circ \text{C}$, durante 18 a 24h. As colónias vermelhas com centro negro são submetidas à prova de Kligler (Smibert e Krieg, 1981). Esta prova serve para determinar a fermentação da glucose e da lactose,

assim como a produção de gás e ácido sulfídrico. É feita em tubos inclinados, de agar com ferro de Kligler (1.4.5.1.). A sementeira é feita por picada, no fundo, e estria na parte inclinada. Incuba-se a $36 \pm 1^\circ\text{C}$, durante 18 a 24 h. A viragem do indicador para amarelo, em toda a extensão do tubo, indica que houve fermentação quer da glucose quer da lactose. Se a mudança do indicador só se verifica no fundo do tubo, houve somente fermentação da glucose. O aparecimento de um precipitado negro no fundo do tubo indica a produção de ácido sulfídrico. A presença de bolhas de ar no seio do agar é sinónimo da produção de gás. As salmonelas são glucose positiva, lactose negativa (excepto alguns casos) e a maioria produz ácido sulfídrico e gás. Após esta confirmação bioquímica, passa-se à identificação serológica, utilizando-se anti-soros comerciais (Difco).

A quantificação das salmonelas existentes na amostra de água foi calculada por interpretação dos resultados dos tubos de fermentação utilizando tabelas de probabilidades de McCrady descritas por Rodier (1984). Os resultados são expressos em NMP/ 100 ml de amostra.

A identificação a nível da espécie, foi realizada no Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Instituição de referência para a identificação de *Salmonella*.

2.3.2.2. Detecção e quantificação de estreptococos fecais

A técnica de fermentação em tubos múltiplos foi também empregue no estudo dos meios selectivos para estreptococos fecais e em testes de crescimento qualitativo de diferentes microrganismos (Tabela 1).

Para a prova presumptiva, empregou-se o caldo de azida e dextrose, e para a prova confirmativa o caldo EVA (Caldo Litsky).

a - Caldo de azida dextrose (Rothe)

A série de tubos após inoculação é incubada a $37 \pm 1^\circ \text{C}$ durante 48 h. São considerados positivos os tubos que apresentarem crescimento microbiano, o que se traduz pela turvação do caldo de cultura.

b - Caldo Etilo Violeta Azida (EVA) (Litsky)

Transfere-se 1 ml dos tubos que apresentam crescimento no caldo de azida dextrose para tubos com caldo EVA. Após a sementeira, os tubos são incubados a $37 \pm 1^\circ \text{C}$, durante 48 h. A turvação do meio, acompanhada ou não de um depósito de cor violácea, constitui indicação de um teste positivo.

2.3.3. Método de filtração por membrana

A aplicação deste método foi feita de acordo com as recomendações da APHA (1985). O objectivo principal consiste na concentração dos microrganismos existentes na amostra, através da passagem desta por um filtro de membrana cujo tamanho dos poros é inferior ao diâmetro do microrganismo em estudo. Posteriormente, a membrana é colocada em meios de cultura apropriados para o isolamento e quantificação dos microrganismos a estudar. As condições de incubação dependem do microrganismo em causa, assim como do meio de cultura utilizado.

Foram empregues membranas celulósicas de $0,45 \mu\text{m}$ de diâmetro de poro (Millipore, tipo HA), excepto para as pesquisas de *Pseudomonas aeruginosa*, nas quais se utilizaram membranas de diâmetro $0,22 \mu\text{m}$ (Millipore, tipo GS), e para *Candida albicans* onde as membranas usadas foram de $1,2 \mu\text{m}$ de diâmetro (Nucleopore).

Para efectuar o cálculo do número de microrganismos isolados, a contagem deve em princípio, ser realizada em membranas que contenham entre 20-80 colónias. Sempre que as contagens forem superiores ao número máximo de colónias, do intervalo acima referido, utiliza-se para o cálculo o menor valor obtido. Quando as contagens

forem inferiores ao limite mínimo, escolhe-se o maior valor obtido. Os valores são expressos em ufc / 100 ml.

Este foi o método aplicado para a enumeração dos microrganismos abaixo discriminados.

2.3.3.1 . Coliformes totais

Após a filtração da amostra as membranas foram cultivadas em placas com agar mEndo Les (1.4.3.1.). A incubação foi feita em aerobiose a $36 \pm 1^\circ \text{C}$, durante 24 h. Consideram-se típicas as colónias desenvolvidas neste meio que apresentem cor rosa escuro ou vermelha, com brilho verde metálico.

2.3.3.2. Coliformes fecais

O meio de cultura utilizado foi o agar mFC (1.4.3.2.). A incubação decorre durante um período de 24 h à temperatura de $44 \pm 1^\circ \text{C}$. Consideram-se coliformes fecais todas as colónias que se desenvolvem neste meio apresentando coloração azul.

2.3.3.3. Estreptococos fecais

Para o isolamento e enumeração de estreptococos fecais utilizaram-se os meios de cultura e procedimentos que a seguir se descrevem:

a - Agar mEnterococos

Após a filtração da amostra, as membranas foram cultivadas em placas com agar mEnterococcus e incubadas a $37 \pm 1^\circ \text{C}$, durante 48 h. Os estreptococos fecais aparecem nas membranas como colónias de cor rosa a castanho escuro de 0,5 - 3 mm de diâmetro.

b - Agar KF

As placas são incubadas durante 48 h a $37 \pm 1^\circ \text{C}$. Todas as colónias vermelhas ou rosas foram consideradas como sendo estreptococos fecais.

A redução dos agentes selectivos azida de sódio e cloreto de trifetil *tetrazolium* traduz-se pelo aparecimento de uma coloração vermelha nas colónias que crescem na sua presença.

c - Agar Bile Esculina e Agar Bile Esculina Azida

Estes dois meios utilizam como princípio o facto dos estreptococos do grupo D de Lancefield hidrolizarem a esculina formando esculetina e dextrose. A esculetina combina-se com o citrato férrico do meio, formando um complexo castanho escuro ou negro, que é a indicação de um resultado positivo. Os sais biliares inibem o crescimento das bactérias gram-positivas, exceptuando os estreptococos do grupo D. As bactérias gram-negativas são inibidas pela azida de sódio.

d - Meio basal de Barne

Após a inoculação as placas são incubadas a $37 \pm 1^\circ \text{C}$, durante 48 h. São consideradas típicas todas as colónias com centro vermelho (*S. faecalis*), vermelho forte (*S. lactis*), brancas ou rosa.

e - Meio de Kanamicina esculina azida

As placas inoculadas são incubadas a $37 \pm 1^\circ \text{C}$, durante 24 h. Considera-se um resultado positivo para a pesquisa de estreptococos do grupo D de Lancefield, quando se observa um halo negro à volta das colónias.

f - Agar Mitis Salivarius

As placas são incubadas durante 24 h a $37 \pm 1^\circ \text{C}$. Neste meio as colónias típicas apresentam-se como se descreve a seguir:

S. mitis - forma colónias pequenas de aproximadamente 0,2 mm de cor azul;

S. salivarius - colónias de 1-5 mm de diâmetro, lisas ou rugosas, do tipo gota de resina ("gum drop");

Enterococos - colónias azuis escuras, brilhantes e ligeiramente elevadas, de 1-2 mm de diâmetro. Os coliformes crescem raramente e formam colónias acastanhadas.

2.3.3.4. *Pseudomonas aeruginosa* (P.a.)

Para a detecção e quantificação deste microrganismo foi empregue o agar selectivo para *Pseudomonas aeruginosa* (1.4.3.10). Utilizam-se membranas com diâmetro de poro de 0,22 µm (Millipore, tipo GS). A temperatura de incubação é de 36 ± 1° C, durante 48 h. São consideradas suspeitas todas as colónias que apresentem cor esverdeada. A confirmação é feita através da observação do crescimento em 3 meios: agar A de King (1.4.5.3.), agar B de King (1.4.5.4.) e agar Columbia (1.4.1.6.). A temperatura de incubação para os 2 primeiros meios é de 36 ± 1° C e para o último é de 42 ± 1° C.

2.3.3.5. *Candida albicans* (C.a.)

Para a pesquisa deste microrganismo, utilizam-se membranas com diâmetro de poro de 1,2 µm (Nucleopore).

Foram empregues dois meios para o isolamento e quantificação desta levedura, agar BiGGY (1.4.3.11.) e agar Sabouraud com cloranfenicol (1.4.3.12.).

A temperatura de incubação é de 37 ± 1° C, sendo as placas examinadas diariamente até um máximo de 3 dias. Em agar BiGGY as colónias de *Candida albicans* são de cor castanha a preta. Em agar Sabouraud as colónias típicas deste microrganismo são despigmentadas ou rosa muito pálido. As colónias suspeitas foram inoculadas em soro humano e incubadas a 36 ± 1° C, durante 3 horas para observação da produção de tubos germinativos (Cruickshank *et al.*, 1973; APHA, 1985).

2.3.4. Método de dispersão usando ansa de Drigalski e Conradi

No presente estudo, este método foi utilizado para a determinação da exactidão dos diversos meios selectivos para estreptococos fecais. Consiste em semear em placas de Petri com meio de cultura apropriado, um inóculo inferior a 0,5 ml, e assegurar uma distribuição homogénea com auxílio de uma ansa de Drigalski e Conradi esterilizada.

2.3.5. Métodos de contagem directa para a enumeração de bacteriófagos

2.3.5.1. Bacteriófagos de *Escherichia coli* C (Borrego e Romero,1985)

Emprega-se esta técnica para amostras com mais de 10 bacteriófagos por 100 ml.

Adicionou-se 1 ml da amostra ou 1 ml de uma diluição da mesma, a tubos contendo 3 ml de agar brando (1.4.4.2.) à temperatura de sobrefusão, mais 0,2 ml de uma cultura em fase logarítmica de *Escherichia coli* C. Agita-se suavemente entre as mãos e verte-se sobre uma placa de Agar Scholten modificado (MSA). Depois da solidificação, as placas incubam-se invertidas a $36 \pm 1^\circ \text{C}$, durante 12 a 16 h. Os resultados são referidos como placas de lise, partindo do princípio que cada placa de lise é produzida por uma partícula fágica. Para a expressão dos resultados aplica-se a fórmula referida em 2.3.1.

2.3.5.2. Bacteriófagos Fimbria-específicos e somáticos de *Salmonella*

A enumeração de fagos ARN F-específicos foi executada em conformidade com a técnica descrita por Havelaar e Hogeboom (1984).

Adicionou-se 1 ml da amostra de água a tubos com caldo triptona-extracto de levedura-glucose (TYG) e 1 ml de cultura de *Salmonella typhimurium* WG49 em fase exponencial. Após homogeneização, o conteúdo dos tubos é vertido sobre placas de agar TYG. As placas são incubadas a $36 \pm 1^\circ \text{C}$, durante 12 a 16 h.

Foram realizadas contagens paralelas de bacteriófagos utilizando como bactéria hospedeira *S. typhimurium* WG45 com o objectivo de avaliar possíveis interferências por fagos somáticos de *Salmonella* e por fagos ADN F-específicos.

2.3.5.3. Bacteriófagos de *Bacteroides fragilis* (Cornax et al., 1990c)

Para a enumeração de bacteriófagos de *Bacteroides fragilis* HSP40 foi utilizada a técnica descrita por Tartera e Jofre (1987) e modificada por Cornax et al. (1990).

As amostras de água foram descontaminadas através de filtros de 0,45 µm (Millipore HA), previamente tratados com 10 ml de uma solução estéril de extracto de carne a 3% (pH: 9,5).

Tubos contendo 3 ml de caldo Brucella modificado (1.4.1.4.), suplementado com 0,7% de agar e mantidos a 45° C foram inoculados com 1 ml de amostra de água e 1 ml de uma cultura de *Bacteroides fragilis* em fase exponencial. Após agitação, o conteúdo dos tubos é vertido em placas de agar base sangue modificado (1.4.4.8.). As placas são incubadas a 36° C durante 18 - 24 h no interior de uma jarra de anaerobiose (Gas Pak, BBL) com atmosfera de H₂ e CO₂.

2.3.6. Identificação das bactérias desenvolvidas em meios selectivos para estreptococos fecais

As colónias desenvolvidas sobre a membrana filtrante, nos diferentes meios selectivos, foram isoladas em placas de agar tripton de soja (TSA), incubadas a 37 ± 1° C, durante 24 h.

a - Obtenção de massa

As colónias após isolamento, são semeadas em tubos com agar inclinado tripton de soja e incubadas a 37 ± 1° C, durante 24 h.

b - Técnica de diferenciação de bactérias gram-positivas e gram-negativas sem coloração - Prova do KOH (Fluharty e Packard, 1967; Buck, 1982)

As bactérias foram classificadas em gram-positivas e gram-negativas, utilizando uma solução do KOH a 3%, previamente colocada numa lâmina porta-objectos com auxílio da ansa, agita-se continuamente a suspensão, durante 60 s. Com este tratamento as paredes das células gram-negativas rompem-se, deixando escapar o material celular, transformando a suspensão numa massa espessa e viscosa.

No presente trabalho aplicou-se também a técnica de coloração modificada por Jensen e descrita por Cruickshank *et al.*, 1975).

c - Prova de catalase (Smibert e Krieg, 1981)

Este teste realiza-se em colónias que cresceram num meio de agar triptona soja, juntando algumas gotas de peróxido de hidrogénio a 3%. A produção imediata de bolhas é indicativo de resultado positivo.

d - Prova de oxidase (Smibert e Krieg, 1981)

O teste efectua-se quer utilizando o reagente descrito em 1.6.2. e preparado no mesmo dia a ser utilizado, ou através de discos preparados (bioMérieux). No primeiro caso utiliza-se a solução impregnada em disco de papel de filtro Whatman de cerca de 5 cm² colocado numa caixa de Petri vazia. Coloca-se no centro do papel 3 gotas de reagente. Com auxílio de uma pipeta Pasteur de ponta fechada retira-se uma porção da cultura desenvolvida em agar Triptona de Soja (TSA) e estende-se sobre o papel impregnado de reagente numa zona de 4,5 mm. A prova é positiva se ao fim de 10 segundos se desenvolver uma coloração violeta na zona do papel onde se estendeu a cultura. Para o caso de se utilizar disco já preparado seguem-se as instruções do fabricante.

e - Teste de crescimento de culturas puras

Utilizaram-se culturas axénicas de 15 microrganismos conforme a tabela 1.

As culturas foram obtidas semeando as estirpes em caldo Triptona de Soja (TSB), incubando a $37 \pm 1^\circ \text{C}$ durante 18 h. Utilizando uma ansa calibrada, procedeu-se à sementeira em 5 meios sólidos selectivos (m Enterococcus, KF, BEA, KEA e meio basal de Barne) um meio de controlo (PCA), fazendo em cada um deles uma estria de aproximadamente 3 cm. Foram também semeados 2 meios líquidos (caldo Azida Dextrose e caldo Etilo Violeta Azida). As placas e os tubos inoculados foram incubados à temperatura de $37 \pm 1^\circ \text{C}$.

O crescimento foi observado e registado decorridas 24, 48 e 72 horas após a sementeira. Para cada meio de cultura e estirpe efectuaram-se 3 replicados.

f - Especificidade dos métodos (meios de cultura e procedimento utilizados)

Considerando as colónias desenvolvidas nos diferentes meios de cultura, isolaram-se de cada filtro onde se obteve um intervalo óptimo de colónias (entre 20 a 80 colónias), aproximadamente a raiz quadrada do número de colónias quer típicas quer não típicas. Posteriormente procedeu-se à verificação, confirmação e identificação. As colónias isoladas em placas de agar de triptona de soja (incubação a $36 \pm 1^\circ \text{C}$, durante 24-36 h) foram testadas quanto às reacções de gram e da catalase. Os cocos gram-positivos em cadeias e catalase negativos foram subcultivados em agar infusão de cérebro e coração (BHI) (Difco), sendo após incubação a 36°C durante 24 h, conservados a 4°C . As culturas de reserva foram congeladas em glicerol a 10% e mantidas a -20°C . As colónias seleccionadas como sendo estreptococos ou enterococos foram posteriormente submetidas ao sistema de testes especificados por Facklam e co-autores (1989, 1991). Foram aplicados os testes propostos por Devriese *et al.* (1991) com o objectivo de diferenciar os enterococos de outros estreptococos fecais. Dentro destes testes incluíram-se o crescimento em caldo de infusão de cérebro e coração ao qual se suplementou NaCl a 6,5%, hidrólise da esculina, resistência à azida de sódio e redução do cloreto de trifetil 2-3-5 *tetrazolium*. A confirmação final foi acompanhada com galerias do sistema API 20 STREP (bioMérieux).

g - Selectividade

O critério de selectividade dos meios de cultura, baseia-se no principio que os agentes inibidores presentes na sua composição, devem reduzir a flora acompanhante do microrganismo em estudo, pelo menos 1000 vezes (Levin e Cabelli, 1972). O número médio de colónias encontrado nos meios de controlo (PCA) é considerado como o número total de microrganismos heterotróficos viáveis presentes em cada amostra. Os factores de redução são obtidos calculando a razão entre o número médio de colónias por 100 ml, detectado nos meios de controlo (PCA) e o número total de colónias por 100 ml detectado nos diferentes meios selectivos para estreptococos fecais.

h - Eficiência relativa de recuperação

Foram analisadas amostras de diferentes fontes, empregando o método de filtração por membrana e dos tubos múltiplos, tendo como objectivo a avaliação da eficiência relativa de recuperação dos meios de cultura testados. Para o procedimento do NMP, utilizou-se a associação dos meios Rothe e Litsky e para a membrana filtrante os agares mEnterococcus, KF, Bilis Esculina Azida, Kanamicina Esculina Azida e meio basal de Barne. Os critérios aplicados são os descritos por El Shaarawi e Pipes (1982).

A eficiência de recuperação de cada meio é calculada, relativamente à contagem máxima obtida para um meio e amostra, aplicando a seguinte equação:

$$\text{Percentagem relativa de recuperação (meio A)} = \left\{ \frac{\text{contagem no meio A}}{\text{contagem máxima num meio}} \right\} \times 100$$

Para estabelecer a ordenação dos diferentes meios testados, aplica-se a prova não paramétrica de concordância, analisando o coeficiente de Kendall (Kendall e Stuart, 1963; Sokal e Rohlf, 1981).

i - Exactidão

Culturas de 4 estirpes de estreptococos fecais (*Enterococcus faecium* ATCC 10541, *E. faecalis* ATCC 19433, *Streptococcus equinus* CECT 973 e *S.mitis* CECT 804), com densidades celulares entre 10^8 e 10^9 ufc por ml em caldo triptona de soja, foram suspensas em água do mar filtrada, solução salina a 0,85% e em água doce filtrada. Foram utilizados volumes apropriados de inóculo, de forma a obter uma concentração de cerca de 10^7 células por ml e foram mantidas à temperatura de 4° C. Os testes de exactidão para as suspensões microbianas acima referidas, foram realizados às 0, 6, e 24 horas, aplicando o método de disseminação em placa, usando uma ansa de Drigalsky. Os ensaios foram feitos em quintuplicado, em 4 meios de cultura selectivos (mEnterococcus, KF, BÍlis Esculina Azida, Kanamicina Esculina Azida) e em 2 meios de referência (agar para contagem em placa «PCA» e agar triptona soja «TSA»). Calcula-se a média aritmética para cada condição experimental. Determina-se a exactidão, comparando as contagens obtidas para cada estirpe em cada meio de cultura, com as obtidas nos meios de referência, aplicando a equação seguinte:

$$\Sigma | (\text{ufc para cada meio} / \text{média ufc para os meios de referência}) \times 100 | / n^\circ \text{ de amostras.}$$

j - Precisão

Para determinar a precisão dos agares mEnterococcus, KF, Kanamicina Esculina Azida, BÍlis Esculina Azida, Mitis - Salivarius, meio basal de Barne, seleccionaram-se um total de 21 amostras de água (13 de água do mar e 8 de água doce). Foram feitas filtrações em quintuplicado para cada alíquota ou da sua diluição. A precisão é determinada graficamente a partir dos valores do índice de dispersão de Fisher (D^2), que dá indicações sobre a variabilidade dos ensaios. O cálculo é feito aplicando a fórmula proposta por Eisenhart e Wilson (1943), expressa como:

$$D^2 = [N \Sigma xi^2 - (\Sigma xi)^2] / \Sigma xi$$

xi = número de bactérias obtido em cada placa da mesma alíquota e amostra

N = número de replicados (5 para cada volume ensaiado)

2.3.7. Estudo em laboratório sobre a sobrevivência de microrganismos indicadores, em águas marinhas

Para realizar o estudo comparativo da sobrevivência de coliformes totais, coliformes fecais, estreptococos fecais e fagos, inoculou-se um balão Erlenmeyer contendo 900ml de água do mar não poluída com 100ml de água residual. Esta mistura foi incubada, na obscuridade, a 18° C durante 15 d. A partir do início do estudo, e após 3, 7, 10, e 15 d, foram efectuadas sementeiras para a contagem de bactérias e colifagos sobreviventes. Utilizou-se, para a enumeração de bactérias, o método de dispersão com ansa (2.3.4.). A partir do momento em que a concentração bacteriana baixou, passou-se a utilizar o método de filtração por membrana (2.3.3.). Para a contagem de bacteriófagos procedeu-se conforme descrito em 2.3.5.

Para avaliar a inactivação e diluição sofrida pelos microrganismos estudados aplicou-se o modelo matemático do decréscimo exponencial descrito por Borrego *et al.* (1983) que é frequentemente utilizado em estudos biológicos e que se expressa da forma seguinte:

$$C_t = C_0 \times 10^{-kt}$$

Por transformação logarítmica esta função transforma-se em função linear:

$$\log C_t = \log C_0 - kt$$

sendo :

C_t = Concentração microbiana no momento t

C_0 = Concentração microbiana inicial

t = Tempo em horas

k = Constante de decréscimo da concentração microbiana ($k = 1/T_{90}$)

T_{90} = Tempo necessário para que desapareça 90% da população microbiana estudada

2.3.8. Contagens directas por microscopia em epifluorescência

O método é descrito por Hobbie *et al.* (1977). Um determinado volume de amostra, fixada por formalina (10%), é filtrado, após homogeneização (Vortex), através de membrana de policarbonato de 0,2 μm de poro, 25 mm de diâmetro e coradas com negro de irgalão (Nucleopore). Para uma melhor distribuição das células na membrana, utiliza-se como suporte uma membrana de celulose, de diâmetro de poro de 0,45 μm e 25 mm de diâmetro (Nucleopore). A filtração é feita, utilizando valores de vácuo inferiores a 100 mm de Hg. A coloração das bactérias é feita utilizando uma solução de alaranjado de acridina (AO) a 0,5 mmol (0,3 g de alaranjado de acridina, 10 ml de formalina a 37-39% e 290 ml de água desionizada). A solução de alaranjado de acridina é de preparação recente e esterilizada por filtração (Acrodisc 0,2 μm seringe filters, Gelman Sciences), previamente a cada utilização. A montagem da membrana é feita sobre uma lâmina de vidro, onde se colocou, previamente, uma gota de óleo de imersão, Cargille do tipo A.

A contagem do número de células é feita, através de um microscópio Leitz de epifluorescência, equipado com luz azul e filtros. Instalou-se na ocular, um graticulo GF 12,5 x / 18 MF (Leitz Periplan). Para efeitos de contagem, foram consideradas as células que se encontravam no lado esquerdo da grelha, que se encontra dividida em seis filas verticais, com seis quadrados iguais. O número de células fluorescentes, contadas num mínimo de 20 campos ou num total de pelo menos 200 células, é então utilizado para determinar o número total de bactérias na amostra. Para estimar, o erro, foram feitas cinco réplicas, em amostras escolhidas aleatoriamente.

2.3.9. Preparação de amostras para a observação em microscópio electrónico de varrimento

As amostras previamente conservadas, com formalina (10%), foram filtradas através de filtros de policarbonato, de 13 mm de diâmetro e de porosidade 0,2 μm (Nucleopore). Posteriormente os filtros foram desidratados gradualmente, passando através de uma série de etanol a diferentes graus alcoólicos (30, 50, 70, 90, e 100%),

permanecendo 5 m em cada etapa do processo, exceptuando a última, na qual o filtro permanece durante 15 m em álcool absoluto. Em seguida os filtros foram secos ao ponto crítico em etanol absoluto com anidrido carbónico líquido, através da utilização de equipamento adequado, do modelo CPD 010 Balzer. Os filtros são montados em suportes de alumínio, com cimento de carbono condutor (Leit C, Neubauer Chemikalien). Finalmente, os suportes são revestidos com ouro (Au) e paládio (Pd), sob vácuo, utilizando um dispositivo para cobertura do modelo SCD 004 Balzer (Sputter Coating Device).

2.3.10. Técnicas de microscopia electrónica de transmissão

Para a observação da morfologia dos fagos ao microscópio electrónico de transmissão, seguiu-se o método descrito por Lembke *et al.* (1980) e modificações especificadas por Gliesche *et al.* (1988). Foi utilizado um microscópio electrónico Philips EM-300 da Universidade de Kiel. As imagens foram obtidas em filme Kodac 4489.

2.3.11. Tratamento estatístico e informático dos dados

2.3.11.1. Tratamento estatístico dos dados

Foram calculadas médias e desvios padrões para os parâmetros físico-químicos e microbiológicos.

Para que a distribuição dos dados se comporte como uma distribuição normal a série de dados, referentes às concentrações microbianas, foram transformados logaritmicamente (logaritmo decimal).

De forma a avaliar, interpretar, os dados microbiológicos das águas utilizadas para fins recreativos e conquícolas, aplicou-se um modelo estatístico de distribuição de frequências lognormal. A diversidade e a variabilidade dos factores que influenciam a

qualidade microbiológica das águas constituem dificuldades importantes para o estabelecimento de um modelo predictivo, pelo que se recorre aos modelos estatísticos.

A aplicação duma distribuição estatística conhecida, como a distribuição normal, simplifica grandemente a interpretação dos dados obtidos experimentalmente, durante um programa de monitorização da qualidade das águas e especificamente durante a vigilância sanitária das épocas balneares. Por outro lado, é conveniente, que o ajuste da distribuição aos dados experimentais se possa fazer ou directamente, ou por transformação simples, como por exemplo a logarítmica. Em conformidade com estes critérios, o modelo estatístico utilizado foi a distribuição de frequências lognormal descrito pela WHO (1994); Mujeriego *et al.* (1980a; b). A utilização de papel de probabilidade logarítmico e ou normal facilita a aplicação e o ajuste do modelo, que se traduz basicamente na aplicação de uma recta de regressão a partir dos pontos obtidos. Como solução alternativa à utilização de papel de probalidades e de forma a beneficiar do tratamento informático disponível substituiu-se o cálculo das frequências acumuladas, pelos «rankits» (valores no eixo das ordenadas), em conformidade com Sokal e Rohlf (1981). A aplicação gráfica do modelo permite obter para além da recta representativa da distribuição lognormal, o intervalo de confiança e o valor numérico de todos os parâmetros estatísticos utilizados para caracterizar a qualidade microbiológica de águas litorais.

Consideraram-se os seguintes parâmetros:

1. Concentração microbiana não ultrapassada em 50% das amostras, que se representa por CT50, CF50, EF50, respectivamente para o caso de coliformes totais, coliformes fecais e estreptococos fecais.
2. Concentração microbiana não ultrapassada em 80% das amostras, que se representa por CT80, CF80, EF80.
3. Concentração microbiana não ultrapassada em 90% das amostras, representada por CT90, CF90, EF90.
4. Concentração microbiana não ultrapassada em 95% das amostras, que se representa por CT95, CF95, EF95.
5. O desvio padrão (s) dos microrganismos considerados. Este valor obtem-se como correspondendo a 84% (ou 16%) da distribuição normal acumulada.

Ainda com o mesmo objectivo, foram aplicados os critérios e normas de qualidade microbiológica elaborados por organismos oficiais; Comunidade Europeia, Ministério do Planeamento e da Administração do Território (Portugal).

Aplicou-se também o Índice de Contaminação Acumulada (I.C.A.), descrito por Borrego e Mariño (1995).

Para interpretar as possíveis relações entre duas variáveis, foram feitas análises de correlação linear para cada par de valores. Para os resultados obtidos em amostras de água (n=25) foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson. A significância dos índices foi testada comparando os valores obtidos com os valores críticos obtidos através de consulta das tabelas correspondentes (Sokal e Rohlf, 1981).

Foi utilizado o coeficiente de concordância de Kendall (Kendall e Stuart, 1963; Sokal e Rohlf, 1980), para comparar os diferentes meios de cultura utilizados no estudo sobre o crescimento de estreptococos fecais. Este teste permitiu classificar os meios de cultura estabelecendo uma ordenação («ranking») com base nas características de eficiência estudadas (crescimento qualitativo, selectividade, especificidade, recuperação relativa, precisão e exactidão).

Foi também aplicada a técnica estatística de análise de variâncias (ANOVA) para comparar médias entre determinadas populações bacterianas.

2.3.11.2. Tratamento informático.

Para o processamento dos dados utilizaram-se os seguintes meios informáticos:

- Computador Apple Macintosh IIsi da Universidade de Málaga (departamento de Microbiologia) e um computador pessoal MS-DOS 486;
- Os programas informáticos mais utilizados foram o StatView 512 Plus e Excel versão 5.0 e SPSS.

A figura 2 (localização das zonas de amostragem) foi realizada na Comissão Coordenadora da Região do Algarve, através do Sistema de Informação Geográfica Intergraph, «software» IRAS 32, linguagem Unix.

RESULTADOS

A avaliação dos níveis de qualidade das águas da Ria Formosa, em zonas próximas à cidade de Faro visou fundamentalmente aspectos de carácter microbiológico, tendo também sido estudadas algumas características físico-químicas dessas águas.

Foi dada atenção especial à aplicação de um modelo de probabilidade que permitisse ajustar os resultados obtidos a diferentes critérios de qualidade microbiológica de águas costeiras, quer nacionais quer internacionais.

Foram analisadas as variações apresentadas pelos parâmetros estudados a nível espacial e temporal.

1. ESTUDO DA VARIAÇÃO ESPAÇO-TEMPORAL DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E MICROBIOLÓGICOS DE ÁGUAS SUPERFICIAIS DA RIA-FORMOSA

1.1. Parâmetros físico-químicos

1.1.1. Temperatura

Os valores registados, geralmente entre as 8,00 e as 10,00 h, para a temperatura da água à superfície, nas três estações Ilha (I), Portas do Mar (PM), Ponte Cais (PC) encontram-se representados na Tabela 2. O valor mais elevado foi obtido em Junho (26° C), tendo-se verificado um decréscimo gradual até Janeiro, altura em que foi registado o valor mais baixo (11° C).

A Figura 3, refere-se à variação temporal dos valores de temperatura registados para as três estações em estudo.

Tabela 2. Temperatura (° C) em águas superficiais, nas estações Ilha, Portas do Mar e Ponte de Cais.

ANO	ESTAÇÃO	ILHA			PORTAS DO MAR			PONTE CAIS		
		$\chi \pm s$	Máximo	Mínimo	$\chi \pm s$	Máximo	Mínimo	$\chi \pm s$	Máximo	Mínimo
1990	PRIMAVERA	17,7 ± 2,1	20,0	16,0	17,7 ± 2,1	20,0	16,0	16,8 ± 1,4	18,5	16,0
	VERÃO	24,2 ± 0,8	25,0	23,5	24,2 ± 1,8	26,0	22,5	23,0 ± 2,3	25,0	20,5
	OUTONO	18,8 ± 3,8	23,0	15,8	19,0 ± 3,6	23,0	16,0	18,5 ± 3,5	22,5	16,0
	INVERNO	11,8 ± 0,8	12,5	11,0	12,3 ± 0,6	13,0	11,8	12,9 ± 0,1	13,0	12,8
1991	PRIMAVERA	16,0 ± 1,9	18,2	14,6	15,9 ± 1,8	18,0	14,8	15,1 ± 1,0	16,2	14,5
	VERÃO	25,0 ± 1,0	26,0	24,0	24,3 ± 0,6	25,0	23,9	22,7 ± 1,1	24,0	22,0
	OUTONO	17,4 ± 2,7	20,1	14,8	17,3 ± 2,8	20,2	14,7	17,4 ± 2,4	19,9	15,2
	INVERNO	12,6 ± 1,1	13,8	11,6	12,9 ± 1,0	13,9	11,9	14,1 ± 0,5	14,6	13,6

χ - média
s - desvio-padrão

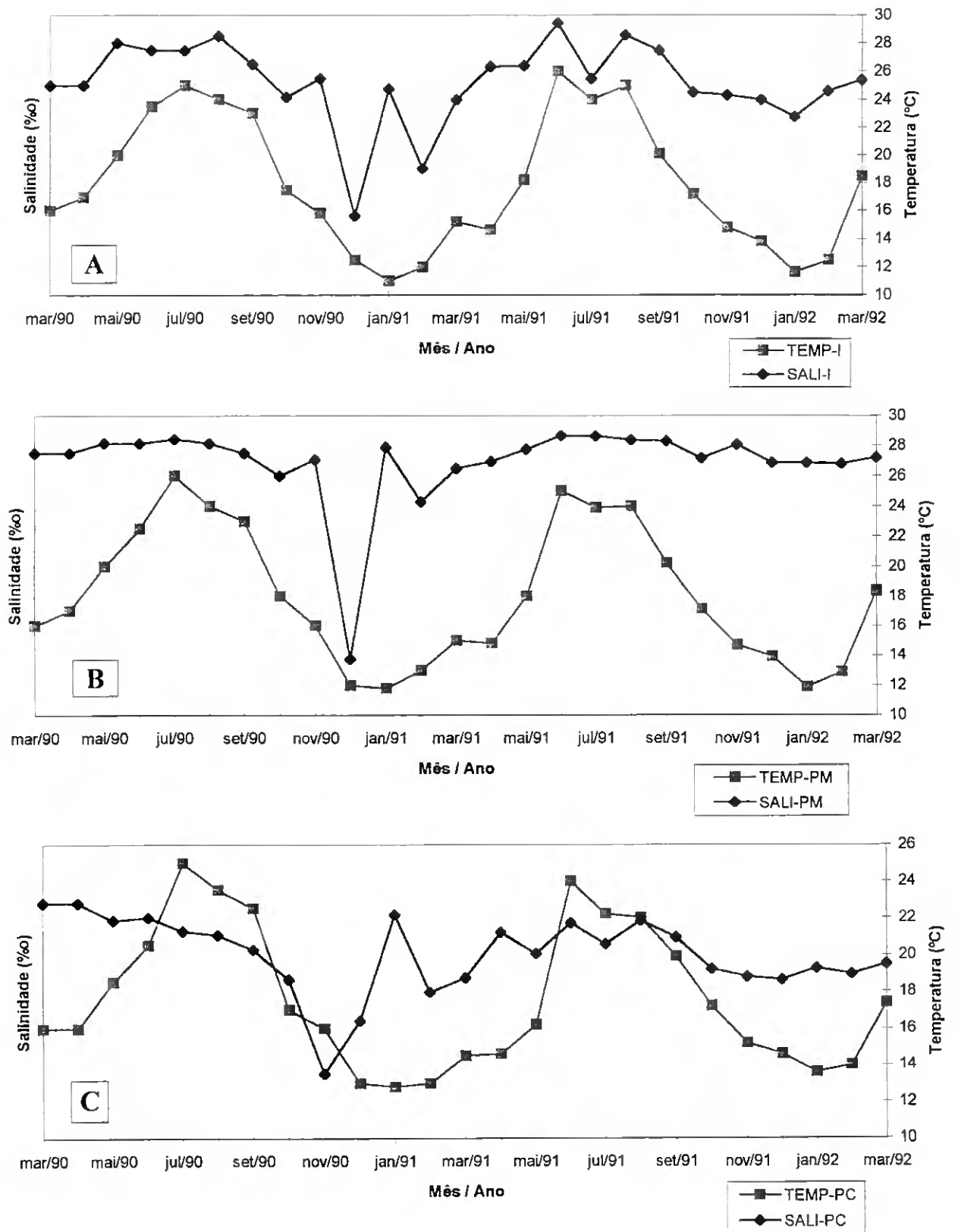


Figura 3. Variação temporal da temperatura e salinidade nas estações Ilha (I), Portas do Mar (PM) e Ponte de Cais (PC)

Comparando, os registos para as três estações, constata-se que na estação Ponte Cais, onde a profundidade é muito maior, as temperaturas da água são iguais ou ligeiramente inferiores às obtidas para as outras duas estações, exceptuando para os meses mais frios (Novembro a Fevereiro) onde se observaram valores mais elevados. No entanto, poder-se-á afirmar que não existem variações espaciais significativas da temperatura das águas superficiais nas três estações de amostragem. As variações temporais estão relacionadas com as variações sazonais da temperatura atmosférica.

1.1.2. Salinidade

Os valores médios de salinidade registados para as três estações encontram-se na Tabela 3. Os teores salinos situaram-se entre 32,25 e 37,77 ‰ na Ilha, 25,00 e 36,94 ‰ em Portas do Mar e 34,10 e 37 ‰ para a estação Ponte Cais.

Os valores mínimos foram sempre observados em dias em que ocorreram chuvas no dia da amostragem, ou no anterior (Novembro e Dezembro). Os valores máximos ocorreram nos meses de Março, Abril e Junho.

A variação temporal, dos dados obtidos, para o parâmetro salinidade encontra-se registada na Figura 3, conjuntamente com os valores da temperatura.

1.1.3. Concentração de oxigénio dissolvido

Os resultados obtidos na determinação deste parâmetro encontram-se expressos em mg de O₂/l (Tabela 4a) e em % de saturação (Tabela 4b), atendendo a que os critérios estabelecidos na legislação portuguesa (Decreto-Lei nº 74/90) consideram as duas formas de expressão dos resultados, consoante se trate de águas para recreio com contacto indirecto ou directo.

Os cálculos para obtenção da percentagem de saturação foram efectuados aplicando a equação de Weiss descrita por Grasshoff (1976).

Tabela 3. Salinidade (‰) em águas superficiais, nas estações Ilha, Portas do Mar e Ponte Cais.

ANO	ESTAÇÃO	ILHA			PORTAS DO MAR			PONTE CAIS		
		$\chi \pm s$	Máximo	Mínimo	$\chi \pm s$	Máximo	Mínimo	$\chi \pm s$	Máximo	Mínimo
1990	PRIMAVERA	36,40 ± 0,69	37,20	36,00	36,18 ± 0,32	36,55	36,00	36,90 ± 0,17	37,00	36,70
	VERÃO	37,13 ± 0,23	37,40	37,00	36,58 ± 0,14	36,75	36,50	36,57 ± 0,16	36,75	36,45
	OUTONO	36,16 ± 0,47	36,60	35,67	35,48 ± 0,62	36,00	34,80	35,33 ± 1,10	36,20	34,10
	INVERNO	33,92 ± 1,84	35,90	32,25	31,58 ± 5,87	36,30	25,00	35,76 ± 0,93	36,80	35,00
1991	PRIMAVERA	36,23 ± 0,55	36,56	35,60	35,64 ± 0,52	36,21	35,18	36,12 ± 0,39	36,50	35,73
	VERÃO	37,13 ± 0,82	37,77	36,20	36,85 ± 0,13	36,94	36,70	36,55 ± 0,22	36,70	36,30
	OUTONO	36,17 ± 0,72	37,00	35,72	36,28 ± 0,47	36,64	35,74	36,02 ± 0,36	36,42	35,75
	INVERNO	35,52 ± 0,38	35,85	35,10	35,48 ± 0,03	35,50	35,45	35,80 ± 0,10	35,90	35,70

χ - média
s - desvio-padrão

Tabela 4a. Oxigénio dissolvido (mg/l) em águas superficiais, nas estações Ilha, Portas do Mar e Ponte de Cais.

ANO	ESTAÇÃO	ILHA			P. MAR			P. CAIS		
		$\chi \pm s$	Máximo	Mínimo	$\chi \pm s$	Máximo	Mínimo	$\chi \pm s$	Máximo	Mínimo
1990	PRIMAVERA	5,44 ± 1,43	6,51	3,82	5,69 ± 1,09	6,75	4,58	6,76 ± 1,57	7,93	4,97
	VERÃO	5,46 ± 0,68	5,95	4,68	3,74 ± 0,91	4,76	3,02	5,76 ± 0,99	6,84	4,89
	OUTONO	5,82 ± 0,34	6,17	5,49	3,74 ± 0,85	4,59	2,89	6,11 ± 0,70	6,65	5,32
	INVERNO	8,12 ± 1,43	9,28	6,53	6,31 ± 1,58	7,95	4,80	7,67 ± 2,07	9,51	5,43
1991	PRIMAVERA	9,31 ± 5,09	15,17	5,97	7,18 ± 3,57	11,30	4,93	10,69 ± 6,98	18,75	6,56
	VERÃO	4,78 ± 1,63	6,62	3,50	2,47 ± 0,43	2,90	2,05	5,86 ± 1,18	7,07	4,72
	OUTONO	5,46 ± 0,85	6,26	4,56	3,75 ± 0,51	4,28	3,27	5,98 ± 0,72	6,80	5,47
	INVERNO	5,75 ± 0,13	5,84	5,60	4,50 ± 0,51	4,86	3,92	5,31 ± 0,64	5,70	4,57

χ - média
s - desvio-padrão

Tabela 4b. Oxigénio dissolvido (% de saturação) em águas superficiais, nas estações Ilha, Portas do Mar e Ponte de Cais.

ANO	ESTAÇÃO	ILHA			P. MAR			P. CAIS		
		$\chi \pm s$	Máximo	Mínimo	$\chi \pm s$	Máximo	Mínimo	$\chi \pm s$	Máximo	Mínimo
1990	PRIMAVERA	70,97 ± 19,02	82,04	49,08	74,18 ± 11,28	85,04	62,49	87,00 ± 18,23	100,51	65,99
	VERÃO	80,47 ± 10,00	86,67	68,92	55,03 ± 11,63	67,93	45,85	82,91 ± 11,65	94,29	71,00
	OUTONO	77,40 ± 2,01	79,09	75,09	49,79 ± 8,09	57,65	41,49	80,47 ± 11,36	90,60	68,23
	INVERNO	92,74 ± 16,04	105,37	74,68	71,69 ± 15,07	86,13	56,00	90,62 ± 24,62	112,82	64,16
1991	PRIMAVERA	117,41 ± 70,35	200,12	73,37	90,14 ± 49,32	148,19	60,47	132,38 ± 89,95	237,35	80,61
	VERÃO	71,55 ± 25,79	101,08	52,44	36,45 ± 5,95	42,51	30,63	84,05 ± 18,50	103,68	66,84
	OUTONO	70,68 ± 9,29	80,64	62,50	48,61 ± 5,66	55,01	44,80	77,44 ± 9,15	87,64	70,07
	INVERNO	67,48 ± 0,93	68,44	66,61	53,02 ± 4,99	56,12	47,19	64,27 ± 7,22	68,41	55,88

Nas amostras de água da estação Ponte Cais, verificaram-se sempre valores superiores aos obtidos para a estação Portas do Mar. Também se verificaram valores superiores à estação Ilha, em 64 % das amostras.

Os valores máximos foram observados, para as três estações, em amostras referentes ao mês de Maio de 1991.

Os valores mínimos, quer para a estação Ilha quer para a Portas do Mar, foram registados em meses de Verão (Junho e Agosto). O mínimo para a estação Ponte Cais, verificou-se em Março.

A variação temporal, dos dados obtidos, para o parâmetro oxigénio dissolvido encontra-se registada na Figura 4.

As estações de amostragem correspondem a zonas que são utilizadas para fins conquícolas e recreativos. A estação Ilha representa uma área utilizada para banho e nas outras duas, Portas do Mar e Ponte Cais, o contacto com a água é do tipo indirecto.

De acordo com o Decreto-Lei nº 74/90 (Portugal-Ministério do Planeamento e da Administração do Território), que aprova as normas de qualidade da água, os valores guia de percentagem de saturação do oxigénio dissolvido para fins conquícolas devem ser iguais ou superiores a 80, para águas recreativas com contacto directo este valor deve estar compreendido entre 80 e 120. As mesmas normas estabelecem para águas de recreio com contacto indirecto o valor máximo admissível de 4 mg/l de O₂.

Tabela 5. Percentagem de observações que não cumprem o estabelecido na norma portuguesa, relativamente ao parâmetro oxigénio dissolvido.

Estação	Fins conquícolas	Fins recreativos
	n (%)	n (%)
Ilha	14 (56)	15 (60)
PM	22 (88)	10 (40)
PC	11 (44)	0

1.1.4. Transparência

Os valores extremos, expressos em metros, encontram-se registados na Tabela 6, onde se pode também constatar que estes ocorreram, em momentos diferentes para as três estações. A Figura 4, traduz a variação temporal deste parâmetro.

As normas portuguesas para a qualidade da água para fins recreativos com contacto directo, estabelecem para a transparência 2 metros como valor máximo recomendável (VMR) e 1 metro para o máximo admissível (VMA). Para as águas com contacto indirecto, o valor máximo admissível é fixado em 2 metros.

Na Tabela 7, encontram-se registadas as percentagens de amostras que não estão em conformidade com o critério legislado.

Tabela 7. Percentagem de observações que não cumprem o estabelecido pela legislação portuguesa, relativamente ao parâmetro transparência.

Estação	VMR	VMA
	n (%)	n (%)
Ilha	5 (20)	22 (88)
PM	-	25 (100)
PC	4 (16)	21 (84)

1.1.5. Relações entre os parâmetros físico-químicos estudados.

Foi elaborada uma matriz de correlação global com todos os parâmetros estudados, em cada estação de amostragem. Foi feita também uma análise global, ou seja considerando todos os dados obtidos como se pertencessem a um só tipo de amostra (n=75). Por questões práticas, diferenciou-se em várias submatrizes que se irão apresentando à medida que se forem apresentando os resultados.

Nas Tabelas 8, 9 e 10 incluem-se os coeficientes de correlação obtidos para os parâmetros físico-químicos determinados nas amostras de água estudadas.

Tabela 6. Transparência (metros) em águas superficiais, nas estações Ilha, Portas do Mar e Ponte de Cais.

ANO	ESTAÇÃO	ILHA			PORTAS DO MAR			PONTE CAIS		
		$\chi \pm s$	Máximo	Mínimo	$\chi \pm s$	Máximo	Mínimo	$\chi \pm s$	Máximo	Mínimo
1990	PRIMAVERA	0,83 ± 0,06	0,88	0,76	0,70 ± 0,24	0,97	0,53	1,04 ± 0,17	1,14	0,84
	VERÃO	1,10 ± 0,39	1,52	0,76	1,07 ± 0,09	1,17	1,00	1,34 ± 0,14	1,47	1,20
	OUTONO	1,60 ± 0,05	1,65	1,55	1,43 ± 0,09	1,52	1,35	1,62 ± 0,06	1,68	1,57
	INVERNO	0,81 ± 0,26	0,99	0,62	0,88 ± 0,58	1,55	0,55	1,25 ± 0,39	1,70	0,99
1991	PRIMAVERA	1,28 ± 0,21	1,46	1,05	1,36 ± 0,27	1,54	1,05	1,61 ± 0,11	1,74	1,54
	VERÃO	1,35 ± 0,01	1,35	1,34	0,83 ± 0,28	1,00	0,50	1,22 ± 0,28	1,54	1,00
	OUTONO	1,58 ± 0,28	1,90	1,35	1,23 ± 0,21	1,40	1,00	1,90 ± 0,40	2,30	1,50
	INVERNO	1,37 ± 0,50	1,90	0,90	1,03 ± 0,06	1,10	1,00	1,70 ± 0,53	2,30	1,30

χ - média
s - desvio-padrão

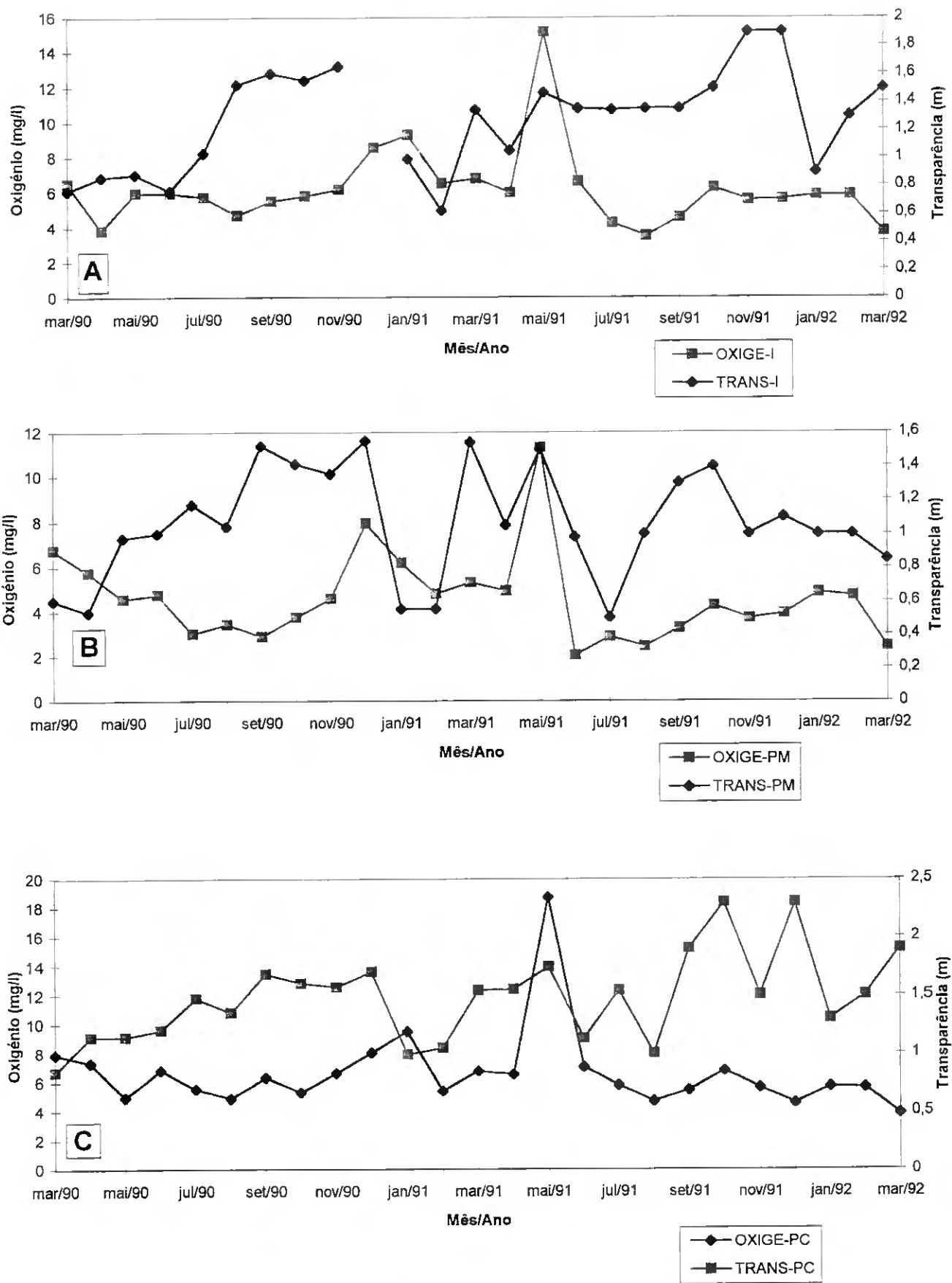


Figura 4. Variação temporal do oxigénio e transparência nas estações Ilha (I), Portas do Mar (PM) e Ponte de Cais (PC)

Tabela 8. Matriz de correlação entre os parâmetros físico-químicos em amostras de água da estação Ilha.

Parâmetros	Temperatura	Oxigênio	Salinidade	Transparência
Temperatura	1			
Oxigênio	-0,284	1		
Salinidade	0,726**	-0,205	1	
Transparência	0,104	-0,029	0,150	1

** significante para $p=0,01$
 $n=25$

Tabela 9. Matriz de correlação entre os parâmetros físico-químicos em amostras de água da estação Portas do Mar.

Parâmetros	Temperatura	Oxigênio	Salinidade	Transparência
Temperatura	1			
Oxigênio	-0,498**	1		
Salinidade	0,465*	-0,389	1	
Transparência	0,040	0,156	-0,299	1

* significante para $p=0,05$
 ** significante para $p=0,01$
 $n=25$

Tabela 10. Matriz de correlação entre os parâmetros físico-químicos em amostras de água da estação Ponte Cais.

Parâmetros	Temperatura	Oxigênio	Salinidade	Transparência
Temperatura	1			
Oxigênio	-0,198	1		
Salinidade	0,414*	0,055	1	
Transparência	-0,071	-0,013	-0,450*	1

* significante para $p=0,05$
 $n=25$

Tabela 11. Matriz de correlação entre os parâmetros físico-químicos em amostras de água das estações Ilha, Portas do Mar e Ponte Cais.

Parâmetros	Temperatura	Oxigénio	Salinidade	Transparência
Temperatura	1			
Oxigénio	-0,299**	1		
Salinidade	0,478**	-0,123	1	
Transparência	-0,008	0,172	-0,092	1

** significativa para $p=0,01$
 $n=75$

Através das Tabelas 8 a 11, constata-se a existência de boas correlações entre a temperatura e a salinidade quer para as três estações em separado, quer quando se consideram os dados na globalidade. Verificou-se, na estação Portas do Mar e para a totalidade dos resultados, que a temperatura e o oxigénio dissolvido se encontram correlacionados negativamente.

1.2. Parâmetros microbiológicos

1.2.1. Microrganismos heterotróficos totais

a - Contagens em placa

Foram feitas contagens de microrganismos mesófilos e saprófitos, utilizando os meios de cultura e temperaturas de incubação conforme descrito no ponto 2.3.1 de Material e Métodos, do presente trabalho. As sementeiras foram efectuadas a partir das 25 amostras de água de superfície colhidas para cada uma das três estações em estudo.

Nas Tabelas 12 a 15, apresentam-se os valores médios e os extremos expressos em unidade formadoras de colónias por 100 ml (ufc/100 ml), para as pesquisas de microrganismos mesófilos que crescem a temperaturas de 37° e 22°C e saprófitos que crescem em meios com salinidades de 35,0 ‰ e 17,5 ‰.

Tabela 12. Microrganismos mesófilos (37°C) em águas superficiais, nas estações Ilha, Portas do Mar e Ponte de Cais (ufc/100 ml).

ANO	ESTAÇÃO	ILHA (x10 ³)			PORTAS DO MAR (x10 ⁵)			PONTE CAIS (x10 ⁴)		
		$\chi \pm s$ (n=3)	Máximo	Mínimo	$\chi \pm s$ (n=3)	Máximo	Mínimo	$\chi \pm s$ (n=3)	Máximo	Mínimo
1990	PRIMAVERA	3,97 ± 1,36	5,40	2,70	8,27 ± 4,97	14,00	5,10	3,47 ± 1,97	5,70	2,00
	VERÃO	5,70 ± 4,10	9,80	1,60	8,90 ± 4,53	12,00	3,70	3,34 ± 3,24	7,00	0,83
	OUTONO	5,23 ± 5,92	12,00	1,00	36,00 ± 19,52	56,00	17,00	3,14 ± 2,27	4,60	0,52
	INVERNO	14,47 ± 9,64	21,00	3,40	21,83 ± 13,36	31,00	6,50	7,50 ± 7,47	16,00	2,00
1991	PRIMAVERA	21,33 ± 19,22	42,00	4,00	481,57 ± 795,65	1400,00	1,70	1373,30 ± 2361,40	4100,00	1,90
	VERÃO	21,93 ± 28,92	55,00	1,40	12,83 ± 14,15	29,00	2,70	1038,67 ± 1698,61	3000,00	45,00
	OUTONO	28,80 ± 44,35	80,00	2,20	211,93 ± 336,26	600,00	6,80	3,53 ± 1,19	4,90	2,70
	INVERNO	58,93 ± 96,20	170,00	2,00	7,03 ± 1,84	8,60	5,00	4,23 ± 1,44	5,30	2,60

χ - média

s - desvio-padrão

Tabela 13. Microrganismos mesófilos (22°C) em águas superficiais, nas estações Ilha, Portas do Mar e Ponte de Cais (ufc/100 ml).

ANO	ESTAÇÃO	ILHA (x10 ³)			PORTAS DO MAR (x10 ⁵)			PONTE CAIS (x10 ⁴)		
		$\chi \pm s$ (n=3)	Máximo	Mínimo	$\chi \pm s$ (n=3)	Máximo	Mínimo	$\chi \pm s$ (n=3)	Máximo	Mínimo
1990	PRIMAVERA	7,87 ± 1,47	9,00	6,20	12,10 ± 7,41	20,00	5,30	3,17 ± 1,86	5,30	1,90
	VERÃO	14,50 ± 10,83	26,00	4,50	10,43 ± 3,11	14,00	8,30	2,33 ± 1,53	4,10	1,40
	OUTONO	12,63 ± 12,44	27,00	5,40	42,33 ± 28,57	75,00	22,00	3,15 ± 2,61	5,50	0,34
	INVERNO	47,00 ± 33,60	79,00	12,00	24,60 ± 15,15	39,00	8,80	12,23 ± 12,59	26,00	1,30
1991	PRIMAVERA	40,37 ± 40,46	85,00	6,10	455,37 ± 732,13	1300,00	2,10	1039,10 ± 1784,80	3100,00	2,30
	VERÃO	92,27 ± 145,37	260,00	2,80	12,73 ± 10,51	24,00	3,20	1083,67 ± 1661,74	3000,00	41,00
	OUTONO	32,50 ± 46,33	86,00	5,40	77,97 ± 123,07	220,00	2,90	6,27 ± 0,46	6,80	6,00
	INVERNO	43,17 ± 66,54	120,00	4,50	8,07 ± 4,56	13,00	0,04	5,47 ± 2,66	7,10	2,40

χ - média

s - desvio-padrão

Tabela 14. Microrganismos saprófitos que crescem em salinidades de 3,5% em águas superficiais nas estações Ilha, Portas do Mar e Ponte de Cais (ufc/100 ml)

ANO	ESTAÇÃO	ILHA (x10 ⁴)			PORTAS DO MAR (x10 ⁶)			PONTE CAIS (x10 ⁵)		
		$\chi \pm s$ (n=3)	Máximo	Mínimo	$\chi \pm s$ (n=3)	Máximo	Mínimo	$\chi \pm s$ (n=3)	Máximo	Mínimo
1990	PRIMAVERA	13,93 ± 9,10	23,00	4,80	4,03 ± 4,17	8,40	0,10	5,04 ± 4,93	10,00	0,13
	VERÃO	41,67 ± 34,08	77,00	9,00	5,15 ± 3,94	8,60	0,86	10,41 ± 10,91	22,00	0,33
	OUTONO	29,00 ± 17,35	49,00	18,00	18,60 ± 13,50	34,00	8,80	12,77 ± 14,43	29,00	1,40
	INVERNO	45,00 ± 23,52	61,00	18,00	2,93 ± 1,62	4,80	2,00	2,05 ± 1,32	3,00	0,54
1991	PRIMAVERA	21,00 ± 12,29	30,00	7,00	19,18 ± 27,73	51,00	0,14	117,10 ± 176,30	320,00	1,30
	VERÃO	30,43 ± 34,30	70,00	9,30	72,67 ± 6,96	14,00	0,10	108,00 ± 80,30	200,00	52,00
	OUTONO	26,67 ± 35,93	68,00	2,90	74,42 ± 126,08	220,00	0,56	5,94 ± 8,72	16,00	0,53
	INVERNO	37,87 ± 33,00	68,00	2,60	8,93 ± 13,92	25,00	0,40	39,67 ± 33,62	62,00	1,00

χ - média

s - desvio-padrão

Tabela 15. Microrganismos saprófitos que crescem a salinidades de 1,75% em águas superficiais, nas estações Ilha, Portas do Mar e Ponte de Cais (ufc/100 ml).

ANO	ESTAÇÃO	ILHA (x10 ⁴)			PORTAS DO MAR (x10 ⁶)			PONTE CAIS (x10 ⁵)		
		$\chi \pm s$ (n=3)	Máximo	Mínimo	$\chi \pm s$ (n=3)	Máximo	Mínimo	$\chi \pm s$ (n=3)	Máximo	Mínimo
1990	PRIMAVERA	12,55 ± 11,95	21,00	4,10	3,25 ± 0,21	3,40	3,10	0,91 ± 1,11	1,70	0,13
	VERÃO	9,03 ± 7,77	18,00	4,20	4,27 ± 2,06	5,70	1,90	6,49 ± 4,98	9,90	0,77
	OUTONO	9,43 ± 7,06	14,00	1,30	30,43 ± 35,27	70,00	2,30	3,83 ± 3,12	7,40	1,60
	INVERNO	16,97 ± 18,26	38,00	5,20	6,80 ± 3,72	9,00	2,50	1,31 ± 1,67	3,20	0,04
1991	PRIMAVERA	46,60 ± 55,24	110,00	8,80	122,55 ± 205,66	360,00	0,65	236,82 ± 384,09	680,00	0,45
	VERÃO	18,80 ± 17,31	38,00	4,40	10,97 ± 5,58	17,00	6,00	151,67 ± 189,23	370,00	36,00
	OUTONO	6,37 ± 4,09	9,70	1,80	113,10 ± 187,87	330,00	0,91	2,59 ± 3,47	6,60	0,50
	INVERNO	102,33 ± 162,70	290,00	1,00	0,72 ± 0,37	1,00	0,30	35,70 ± 55,70	100,00	2,10

χ - média
s - desvio-padrão

As variações espaço-temporais encontram-se reflectidas nas Figuras 5 e 6. Em relação a estes parâmetros, não se encontraram variações cíclicas, tendo-se observado flutuações grandes na abundância.

Comparando os valores obtidos para as três estações de amostragem, pode-se concluir que as amostras colhidas na estação Portas do Mar, apresentaram para os quatro parâmetros, valores muito superiores em relação aos obtidos para as outras duas estações. A estação Ilha é a estação que apresenta contagens consideravelmente inferiores.

Confrontando os dois grupos de microrganismos (mesófilos vs saprófitos), verifica-se que de uma forma geral os saprófitos se encontram em número mais elevado (Figuras 7 a 9). Para a estação Ilha, registou-se uma amostra com um valor de saprófitos inferior ao de mesófilos. Relativamente às estações Portas do Mar e Ponte Cais, 28 e 4% das amostras respectivamente apresentaram um valor de saprófitos, inferior ao obtido para os microrganismos mesófilos.

Ao comparar os resultados obtidos nas contagens em placa de microrganismos saprófitos verificou-se que em 75 % de amostras da estação Ilha se registaram valores de saprófitos que cresceram em meios com salinidade de 35 ‰ superiores aos dos que cresceram em meios com 17,5 ‰. Na estação Ponte Cais esta situação é válida para 67% das amostras. Na estação Portas do Mar 63 % das amostras apresentaram uma maior predominância de microrganismos que cresceram em meios com salinidade de 17,5 ‰.

Tomando em consideração os valores médios obtidos para o conjunto das 25 amostras (Tabelas 12 a 15) poder-se-á estabelecer, para a estação Ilha, a seguinte ordem de abundância: Sap. 35‰ > Sap. 17,5‰ > Mes. 22° > Mes. 37°. Para as outras duas estações os valores registados não permitem estabelecer uma hierarquização.

Comparando os valores médios obtidos para cada estação do ano constata-se que no decorrer do período de 1991/1992 se registaram valores superiores aos do

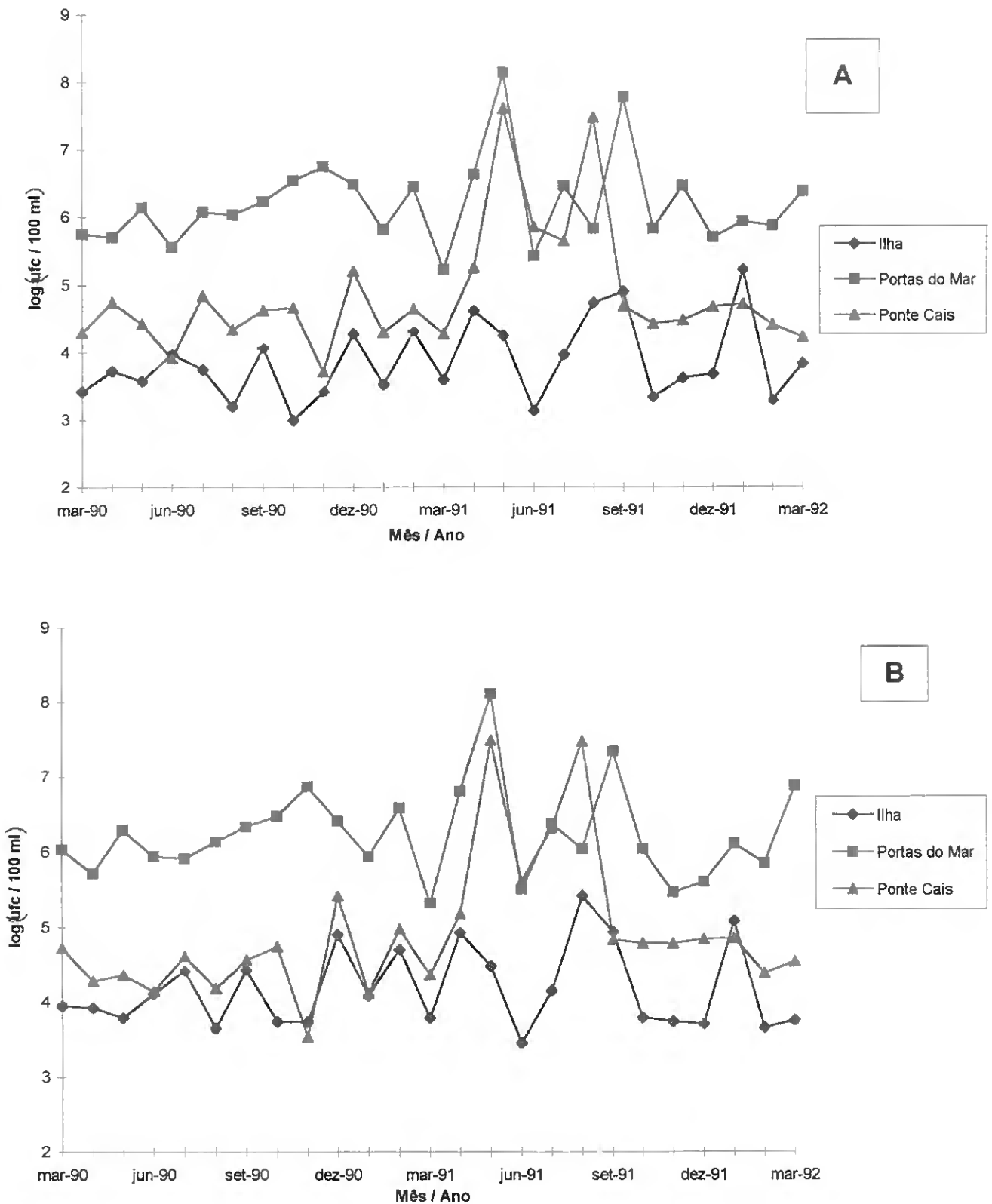


Figura 5. Variação espaço-temporal de microrganismos mesófilos que crescem a temperaturas de 37° C (A) e 22°C (B).

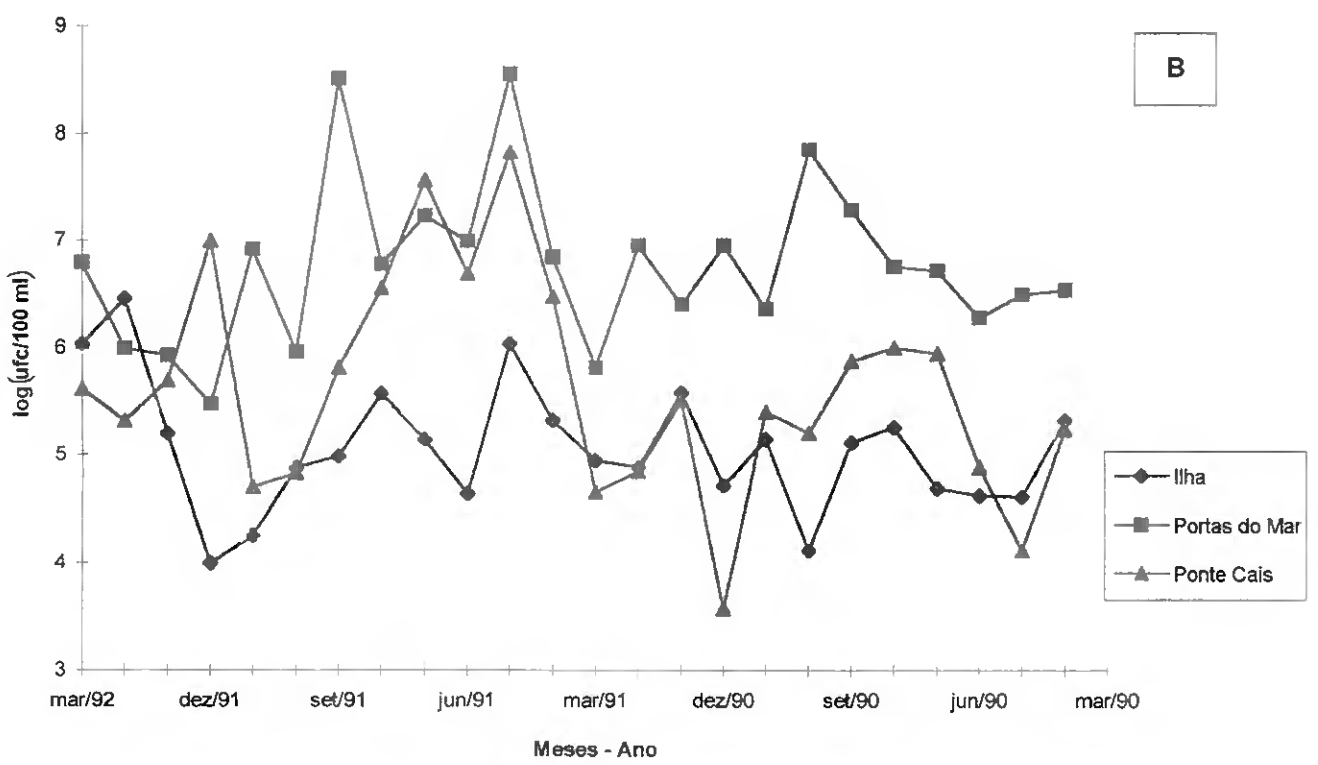
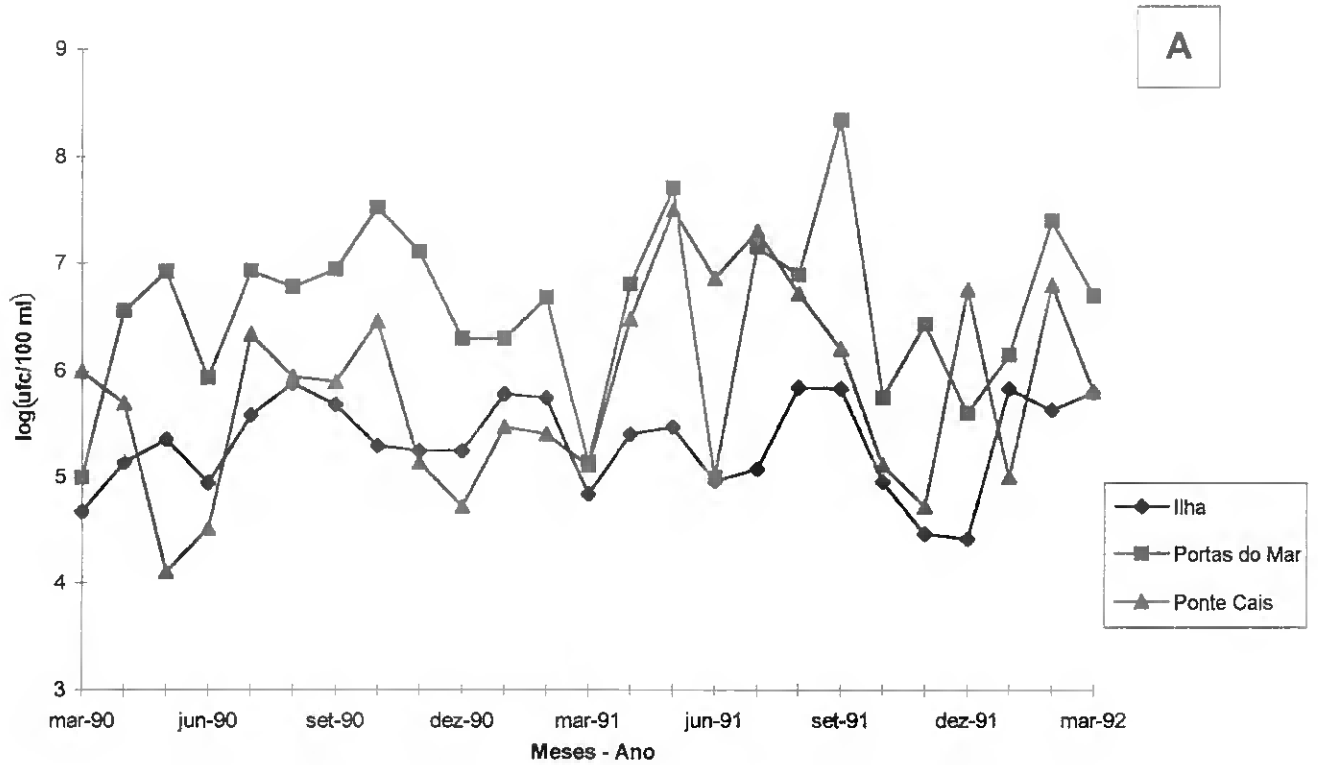


Figura 6. Variação espaço-temporal dos microrganismos saprófitos cultivados a salinidades de 35 ‰ (A) e 17,5 ‰ (B)

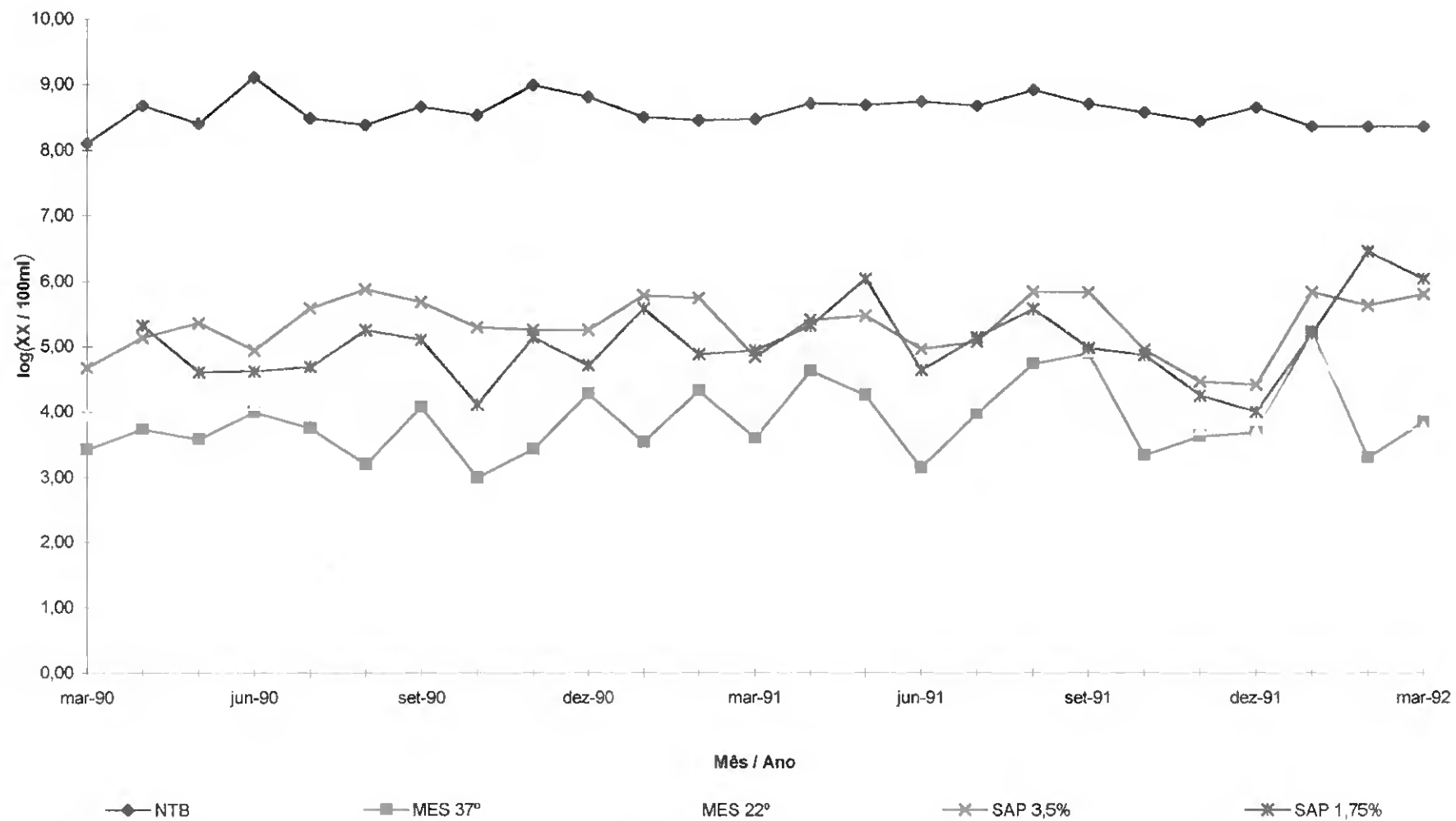


Figura 7. Variação temporal do Número Total de Bactérias e Microrganismos Mesófilos e Saprófitos. Estação Ilha.

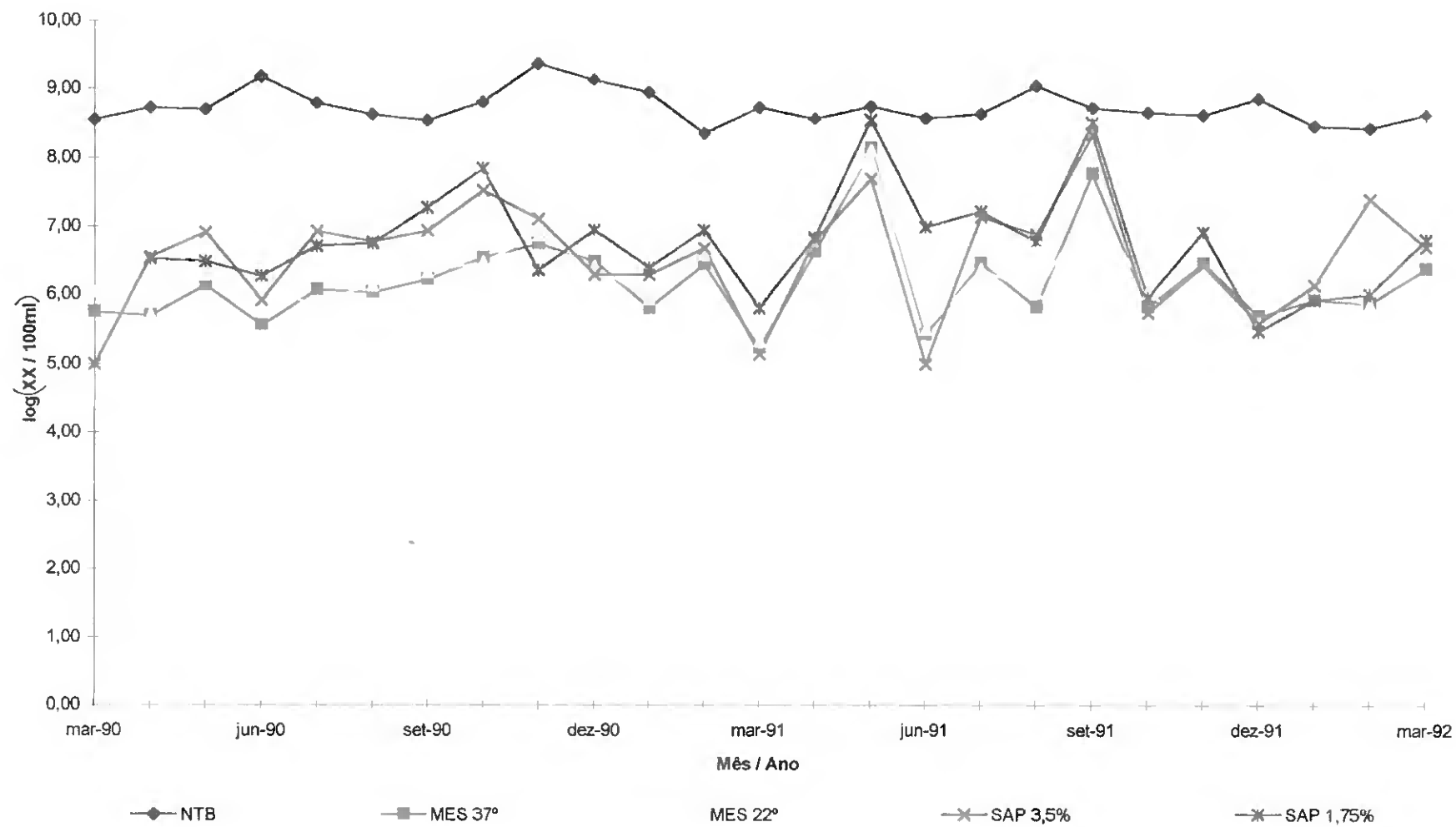


Figura 8. Variação temporal do Número Total de Bactérias, Microrganismos Mesófilos e Saprófitos. Estação Portas do Mar.

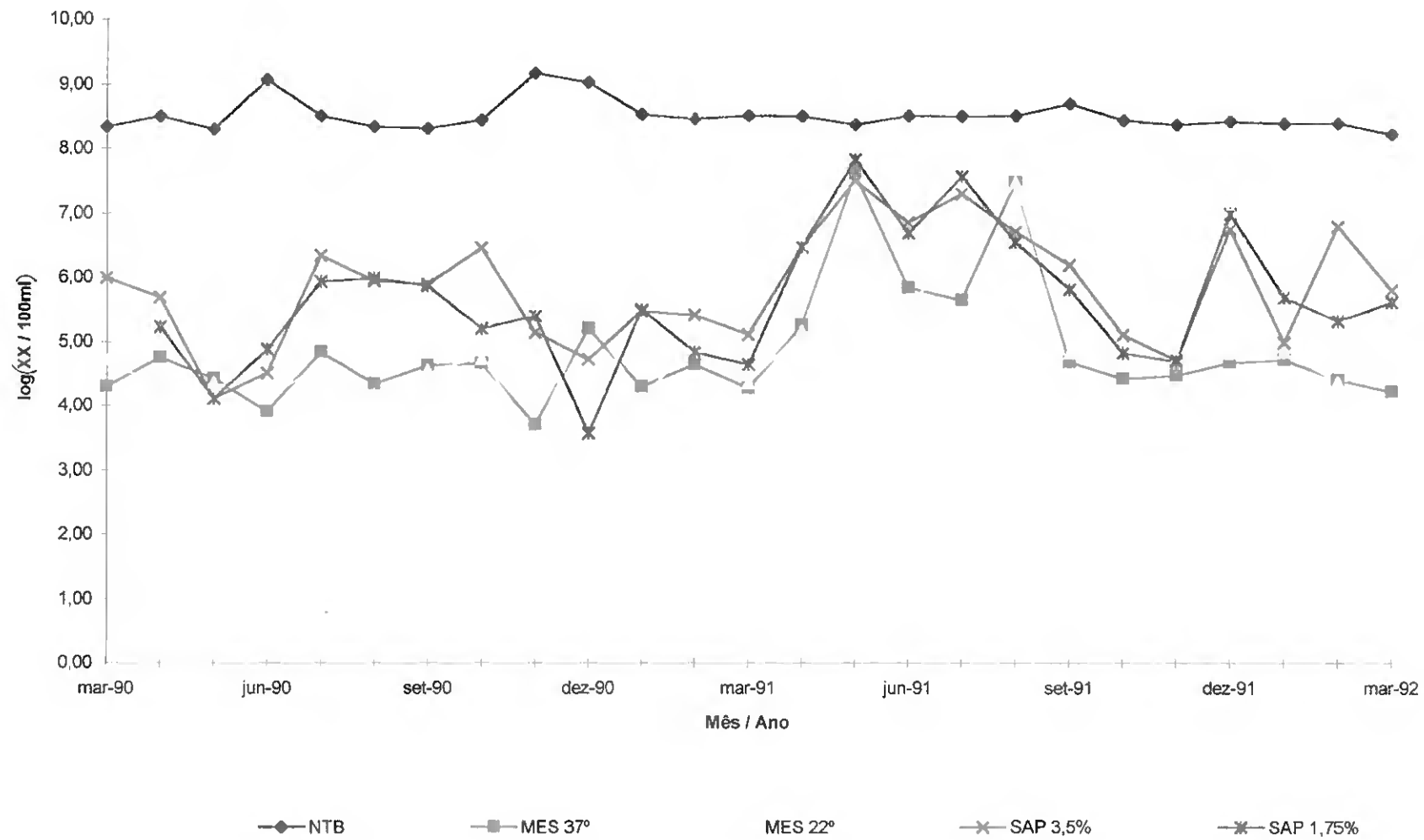


Figura 9. Variação temporal do Número Total de Bactérias, Microrganismos Mesófilos e Saprófitos. Estação Ponte Cais.

período 1990/1991. Assim, para a estação Ilha, 68,75% das contagens de 1991/92 corresponderam a valores superiores aos obtidos para 1990/1991. A percentagem calculada para a estação Portas do Mar foi de 81,25% e 75% para a estação Ponte Cais.

De forma a estudar as relações existentes entre os parâmetros microbiológicos obtidos através de contagens em placas, apresentam-se a seguir submatrizes de correlação (Tabela 16 a 19), onde se encontram registados os coeficientes de correlação entre os microrganismos heterotróficos. As concentrações dos microrganismos pesquisados foram transformadas logaritmicamente para assegurar a normalidade da distribuição.

Tabela 16. Matriz de correlação de microrganismos heterotróficos em amostras de água da estação Ilha.

Parâmetros	Mes.37° C	Mes.22° C	Sap.35 ‰	Sap.17,5 ‰
Mes.37° C	1			
Mes. 22° C	0,911**	1		
Sap.35 ‰	0,410*	0,493**	1	
Sap. 17,5 ‰	0,189	0,167	0,606**	1

* significante para $p=0,05$

** significante para $p=0,01$

n=25

Tabela 17. Matriz de correlação de microrganismos heterotróficos em amostras de água da estação Portas do Mar.

Parâmetros	Mes.37° C	Mes.22° C	Sap.35 ‰	Sap.17,5 ‰
Mes.37° C	1			
Mes. 22° C	0,903**	1		
Sap.35 ‰	0,763**	0,681**	1	
Sap. 17,5 ‰	0,812**	0,712**	0,682**	1

** significante para $p=0,01$

n=25

Tabela 18. Matriz de correlação de microrganismos heterotróficos em amostras de água da estação Ponte Cais.

	Mes.37° C	Mes.22° C	Sap.35 ‰	Sap.17,5 ‰
Mes. 37° C.	1			
Mes. 22° C	0,963**	1		
Sap.35 ‰	0,611**	0,583**	1	
Sap. 17,5 ‰	0,605**	0,580**	0,861**	1

** significante para $p=0,01$
 $n=25$

Tabela 19. Matriz de correlação de microrganismos heterotróficos em amostras de água das estações Ilha, Portas do Mar e Ponte Cais.

	Mes.37° C	Mes.22° C	Sap.35 ‰	Sap.17,5 ‰
Mes. 37° C	1			
Mes. 22° C	0,973**	1		
Sap.35 ‰	0,760**	0,746**	1	
Sap. 17,5 ‰	0,790**	0,767**	0,849**	1

** significante para $p=0,01$
 $n=75$

Através da análise da informação contida nas tabelas acima representadas, constata-se que os microrganismos que se descrevem a seguir se encontram significativamente correlacionados entre si em todas as amostras:

- Mesófilos a 37° C e Mesófilos a 22° C;
- Mesófilos a 37° C e Saprófitos a 35 ‰;
- Mesófilos a 22° C e Saprófitos a 35 ‰;
- Saprófitos a 35 ‰ e Saprófitos a 17,5 ‰.

Por outro lado, há uma relação significativa em todas as amostras excepto na estação Ilha para:

- Mesófilos a 37° C e Saprófitos a 17,5 ‰;
- Mesófilos a 22° C e Saprófitos a 17,5 ‰.

b - Contagens directas ao microscópio de epifluorescência.

Os resultados encontram-se expressos em Número Total de Bactérias (NTB) por 100 ml de amostra de água. A Tabela 20 contém um resumo dos dados obtidos por contagem directa em microscópio de epifluorescência de preparações coradas com alaranjado de acridina.

Pela Figura 10 pode-se verificar que em 80 % das amostras o número de bactérias totais calculado foi superior para a estação Portas do Mar. Na estação Ilha observaram-se valores mais elevados que na estação Ponte Cais em 68% das amostras.

Na estação Ilha, o valor máximo ($13,20 \times 10^6$ /ml) foi obtido no verão. Os valores máximos registados nas outras duas estações verificaram-se no outono, tendo sido o NTB de $23,20$ e $14,90 \times 10^6$ /ml respectivamente para a estação Portas do Mar e Ponte Cais.

A variação espaço-temporal do Número Total de Bactérias (NTB) nas diferentes estações representa-se na Figura 10. Observam-se para cada ano dois picos na abundância bacteriana, sendo um no verão e outro no outono/inverno.

As Figuras 7 a 9, permitem comparar as variações das concentrações dos microrganismos heterotróficos pesquisados e o NTB.

c - Observação de microrganismos heterotróficos totais ao microscópio electrónico de varrimento

As observações efectuadas com o microscópio electrónico de varrimento e registadas através das microfotografias (Figuras 11A a 11C), que a seguir se apresentam, permitem confirmar as observações sobre a diferença existente entre as três estações, no que respeita à abundância dos microrganismos pesquisados.

As Figuras 12A a 12C ilustram os vários tipos morfológicos (morfotipos) presentes nas amostras estudadas, podendo-se observar cocos, bacilos, muitos víbrios e espirilos. As Figuras 12B e 12C reflectem também a presença de material particulado

Tabela 20. Bactérias totais, por epifluorescência com alaranjado de acridina laranja, em águas superficiais nas estações Ilha, Portas do Mar e Ponte de Cais ($\times 10^6/100$ ml).

ANO	ESTAÇÃO	ILHA			PORTAS DO MAR			PONTE CAIS		
		$\chi \pm s$ (n=3)	Máximo	Mínimo	$\chi \pm s$ (n=3)	Máximo	Mínimo	$\chi \pm s$ (n=3)	Máximo	Mínimo
1990	PRIMAVERA	293,33 \pm 182,30	490,00	130,00	466,67 \pm 92,92	530,00	360,00	246,67 \pm 64,29	320,00	200,00
	VERÃO	626,67 \pm 601,19	1320,00	250,00	860,00 \pm 580,26	1520,00	430,00	580,00 \pm 531,13	1190,00	220,00
	OUTONO	603,33 \pm 340,20	990,00	350,00	1106,67 \pm 1061,43	2320,00	350,00	660,00 \pm 719,65	1490,00	210,00
	INVERNO	420,00 \pm 199,75	650,00	290,00	823,33 \pm 558,96	1340,00	230,00	566,67 \pm 436,62	1070,00	290,00
1991	PRIMAVERA	440,00 \pm 121,66	520,00	300,00	490,00 \pm 104,40	560,00	370,00	296,67 \pm 49,33	330,00	240,00
	VERÃO	620,00 \pm 185,20	830,00	480,00	650,00 \pm 416,77	1130,00	380,00	326,67 \pm 5,77	330,00	320,00
	OUTONO	390,00 \pm 115,33	510,00	280,00	470,00 \pm 55,68	530,00	420,00	340,00 \pm 140,00	500,00	240,00
	INVERNO	303,33 \pm 127,02	450,00	230,00	426,67 \pm 254,23	720,00	270,00	256,67 \pm 11,55	270,00	250,00

χ - média
s - desvio-padrão

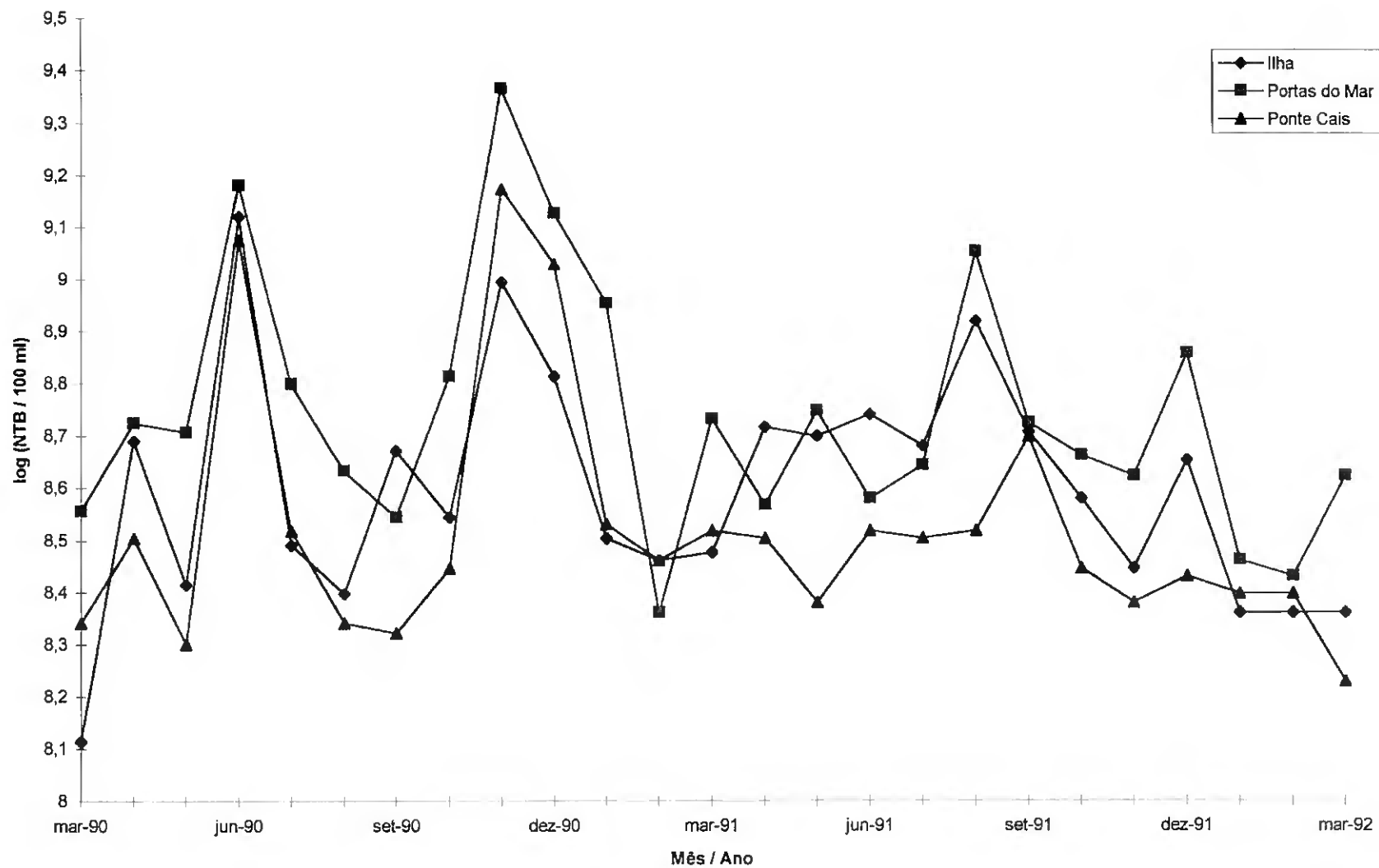


Figura 10. Variação espaço-temporal do Número Total de Bactérias nas estações Ilha, Portas do Mar e Ponte de Cais.

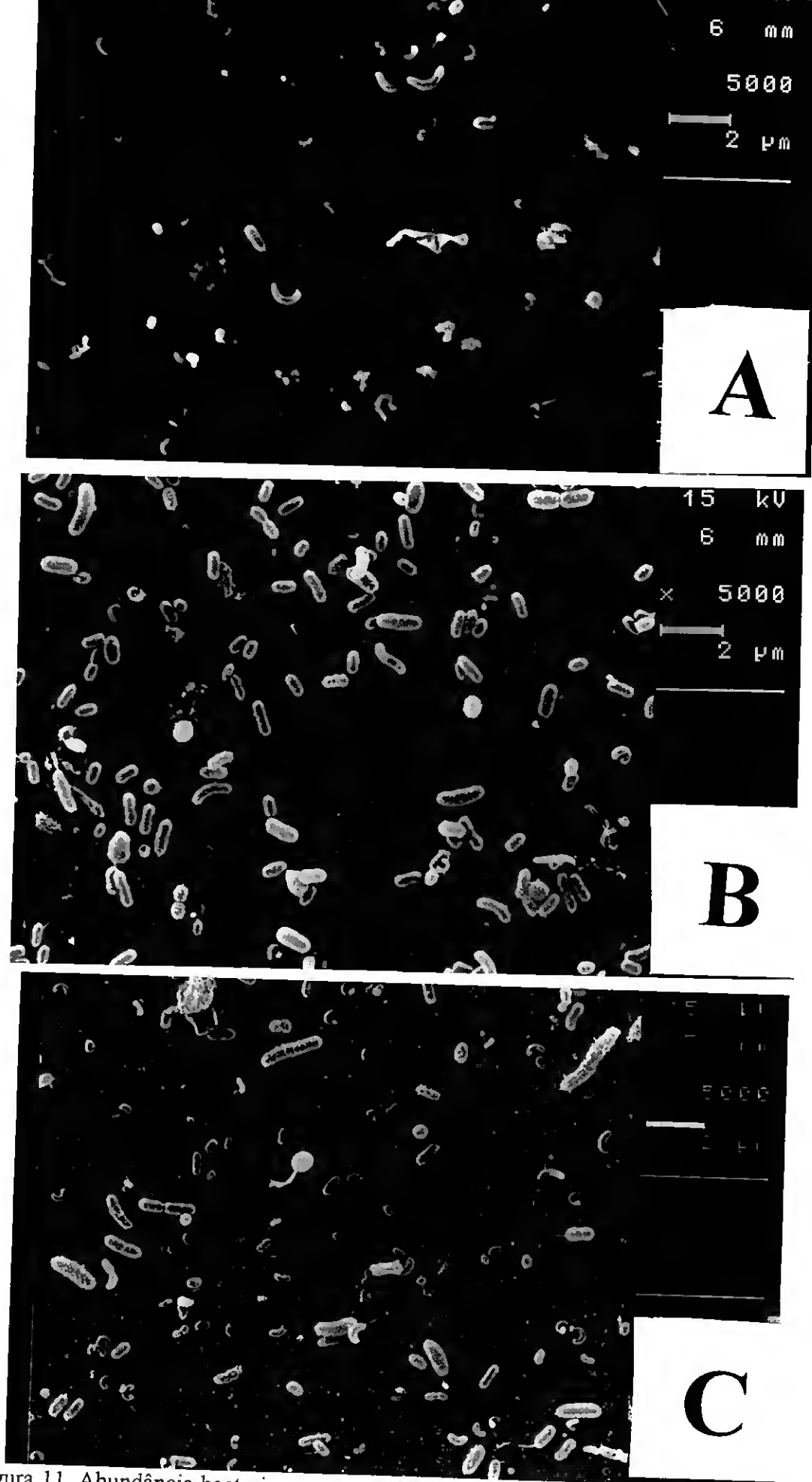


Figura 11. Abundância bacteriana em amostras de água da Ria Formosa. Estações: Ilha (A), Portas do Mar (B) e Ponte Cais (C). Microfotografias de microscópio electrónico de varrimento.

e correspondem a amostras de água em que se registaram contagens elevadas do número total de bactérias (Novembro de 1990 e Agosto de 1991).

1.2.2. Indicadores microbiológicos de poluição fecal

a - Coliformes totais

Os valores de coliformes totais, expressos em ufc / 100 ml e agrupados por estações do ano, para os três pontos de amostragem, encontram-se representados na Tabela 21. Em conformidade com estes resultados parece não haver uma relação directa destes microrganismos com as estações do ano. Também para este parâmetro, a maior abundância microbiana verifica-se na estação Portas do Mar (Figura 13-A). Na Ilha observaram-se valores mais baixos, comparativamente com as outras duas estações, com excepção da amostra colhida em Junho de 1990, na qual se registou um valor superior ao observado na estação Ponte Cais (Figura 13-A). Em termos de flutuações, as maiores verificam-se nas amostras da estação Portas do Mar, onde os valores máximos e mínimos diferem de 3 ordens de magnitude. Na estação Ponte Cais estas diferenças são de duas ordens e de uma para a Ilha .

b - Coliformes fecais

A Tabela 22 resume os dados obtidos para os coliformes fecais que foram tratados de forma idêntica à referida para os coliformes totais.

A Figura 13-B traduz a variação espaço-temporal das concentrações microbianas, expressas em logaritmos decimais nas três estações de amostragem.

Verifica-se que os valores registados para estes microrganismos apresentam, para o período em estudo e para as três estações de amostragem, a mesma tendência que a observada para os coliformes totais (Figura 13-A).

Tabela 21. Coliformes totais em águas superficiais, nas estações Ilha, Portas do Mar e Ponte de Cais (ufc/100 ml)

ANO	ESTAÇÃO	ILHA (x10 ²)			PORTAS DO MAR (x10 ⁵)			PONTE CAIS (x10 ³)		
		$\chi \pm s$ (n=3)	Máximo	Mínimo	$\chi \pm s$ (n=3)	Máximo	Mínimo	$\chi \pm s$ (n=3)	Máximo	Mínimo
1990	PRIMAVERA	5,20 ± 3,00	8,00	2,00	2,97 ± 0,91	3,80	2,00	2,93 ± 1,50	4,60	1,70
	VERÃO	15,50 ± 13,10	30,00	4,50	2,48 ± 2,28	4,70	0,10	5,43 ± 3,58	8,70	1,60
	OUTONO	5,70 ± 3,40	8,00	1,70	12,20 ± 6,70	19,00	5,60	8,77 ± 4,00	12,00	4,30
	INVERNO	20,30 ± 4,60	23,00	15,00	4,87 ± 4,56	9,80	0,80	12,77 ± 11,45	25,00	2,30
1991	PRIMAVERA	4,00 ± 2,30	6,60	2,30	102,95 ± 170,67	300,00	1,40	5,90 ± 7,03	14,00	1,40
	VERÃO	15,00 ± 3,60	18,00	11,00	4,60 ± 0,53	5,00	4,00	104,33 ± 152,15	280,00	14,00
	OUTONO	9,40 ± 5,70	16,00	5,40	2,90 ± 0,66	3,60	2,30	16,03 ± 12,72	30,00	5,10
	INVERNO	3,70 ± 2,50	6,30	1,20	2,93 ± 0,06	3,00	2,90	5,73 ± 3,50	8,50	1,80

χ - média
s - desvio-padrão

Tabela 22. Coliformes fecais em águas superficiais, nas estações Ilha, Portas do Mar e Ponte de Cais (ufc/100 ml).

ANO	ESTAÇÃO	ILHA (x10 ²)			PORTAS DO MAR (x10 ⁴)			PONTE CAIS (x10 ³)		
		$\chi \pm s$ (n=3)	Máximo	Mínimo	$\chi \pm s$ (n=3)	Máximo	Mínimo	$\chi \pm s$ (n=3)	Máximo	Mínimo
1990	PRIMAVERA	1,40 ± 1,20	2,60	0,20	6,80 ± 5,84	13,00	1,40	0,90 ± 0,35	1,30	0,64
	VERÃO	0,42 ± 0,14	0,57	0,30	5,89 ± 5,00	8,90	0,12	0,82 ± 0,69	1,40	0,06
	OUTONO	0,50 ± 0,12	0,61	0,37	16,17 ± 11,75	28,00	4,50	1,31 ± 0,44	1,70	0,83
	INVERNO	3,90 ± 2,17	5,20	1,40	7,80 ± 5,89	13,00	1,40	2,49 ± 2,25	5,00	0,66
1991	PRIMAVERA	1,20 ± 0,00	1,20	1,20	10,50 ± 7,09	16,00	2,50	1,28 ± 1,35	2,80	0,21
	VERÃO	1,00 ± 0,42	1,30	0,52	8,13 ± 6,82	16,00	3,90	10,00 ± 14,73	27,00	1,00
	OUTONO	1,53 ± 0,35	1,90	1,20	5,30 ± 2,54	8,20	3,50	1,85 ± 1,43	3,20	0,36
	INVERNO	1,00 ± 0,40	1,40	0,60	5,67 ± 1,55	7,20	4,10	1,08 ± 0,79	2,00	0,61

χ - média
s - desvio-padrão

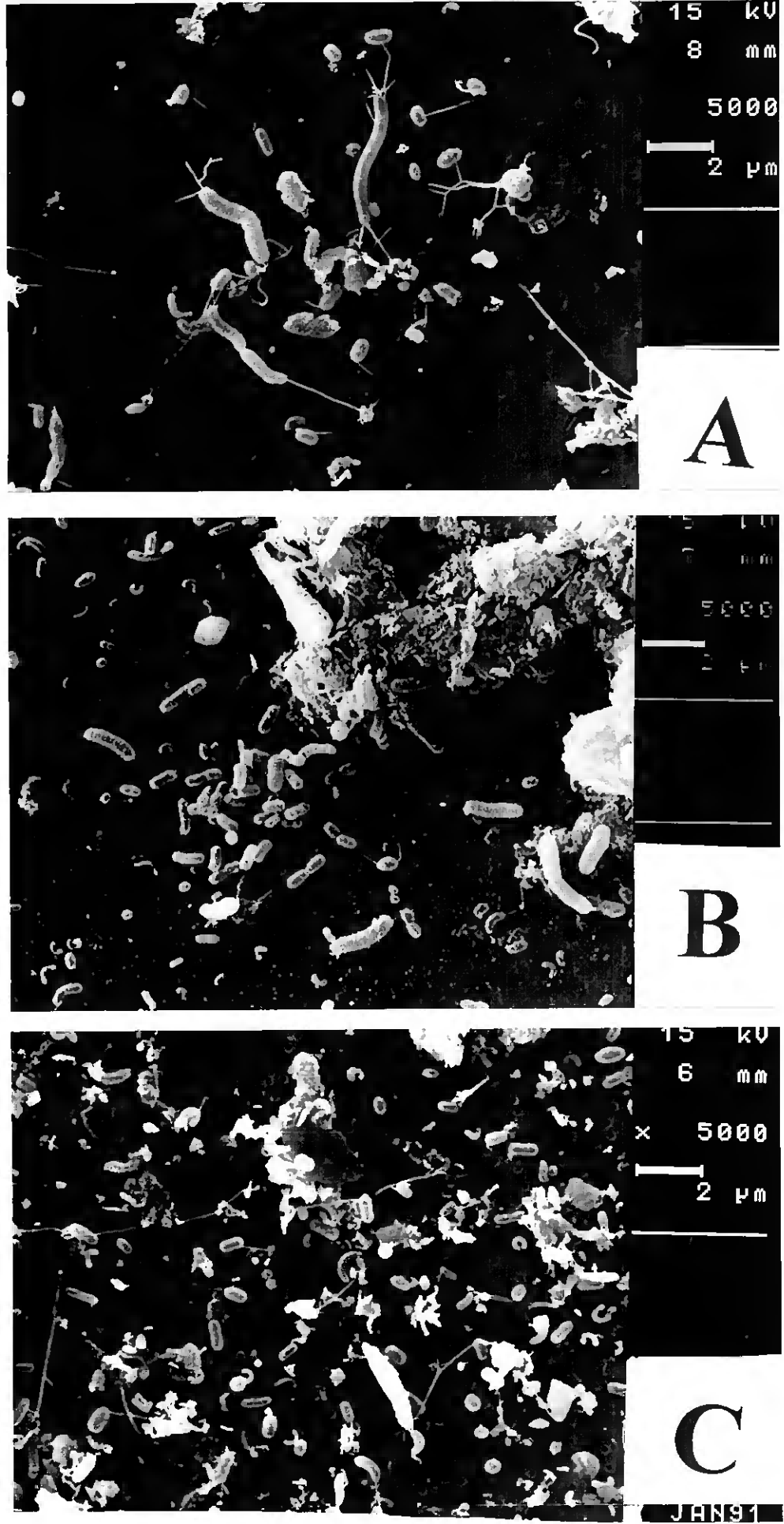


Figura 12. Tipos morfológicos. Bactérias isoladas e bactérias agregadas a material particulado. Microfotografias de microscópio eletrônico de varrimento.

c - Estreptococos fecais

Na Tabela 23 encontram-se agrupados os dados das contagens de estreptococos fecais nas três estações. Parece não existir, tal como o verificado para os coliformes totais e fecais, variações sazonais relevantes. Os dados registados na figura 14-A permitem verificar, que é também na estação Portas do Mar onde se registaram as contagens mais elevadas, seguindo-se a estação Ponte Cais e por último a estação Ilha com os valores mais baixos. Observaram-se grandes flutuações nos resultados das contagens destas bactérias, nas três estações de amostragem (Figura 14- A).

d - Bacteriófagos de *Escherichia coli* C

Os resultados obtidos para este parâmetro, expressos em unidades formadoras de placas de lise por 100 ml (ufp / 100 ml), encontram-se resumidos na Tabela 24.

A Figura 14-B traduz a variação espaço-temporal relativamente a este parâmetro.

Os colifagos foram quantificados em todas as amostras, num intervalo de concentração que variou de 80 (Ilha) a $9,2 \times 10^4$ ufp / 100 ml (Portas do Mar).

A variação espacial dos parâmetros referentes aos coliformes totais, coliformes fecais, estreptococos fecais e colifagos, encontra-se graficada na Figura 15, estando os dados agrupados por anos e a concentração média anual, expressa em log / 100 ml. A Figura 16 permite destacar a predominância dos microrganismos de origem fecal nas três estações de amostragem.

A Figura 17, é uma ilustração obtida através do microscópio electrónico de transmissão, na qual se pode observar a morfologia e dimensões de um colifago isolado numa amostra de água da Ria Formosa. Em conformidade com Ackermann (1987) o colifago isolado pertence à família *Siphoviridae*, e ao morfotipo B₁, com cauda flexível (Ackerman, 1991; Ackerman e Eisenstark, 1974).

Tabela 23. Estreptococos fecais em águas superficiais nas estações Ilha, Portas do Mar e Ponte de Cais (ufc/100 ml).

ANO	ESTAÇÃO	ILHA (x10)			PORTAS DO MAR (x10 ³)			PONTE CAIS (x10 ²)		
		$\chi \pm s$ (n=3)	Máximo	Mínimo	$\chi \pm s$ (n=3)	Máximo	Mínimo	$\chi \pm s$ (n=3)	Máximo	Mínimo
1990	PRIMAVERA	6,57 ± 2,70	9,70	5,00	2,30 ± 2,09	4,70	0,90	1,04 ± 0,20	1,20	0,82
	VERÃO	5,17 ± 2,30	7,20	2,70	3,29 ± 2,77	5,70	0,26	0,77 ± 0,19	0,95	0,57
	OUTONO	2,90 ± 1,70	4,80	1,70	5,77 ± 2,29	7,60	3,20	1,36 ± 0,57	1,90	0,77
	INVERNO	10,87 ± 8,80	21,00	4,80	7,23 ± 7,00	15,00	1,40	3,07 ± 1,10	3,81	1,80
1991	PRIMAVERA	3,60 ± 1,20	4,50	2,30	4,25 ± 3,54	8,20	1,35	1,42 ± 1,08	2,40	0,26
	VERÃO	3,93 ± 4,20	8,80	1,20	2,47 ± 1,69	4,10	0,72	3,07 ± 3,26	6,70	0,40
	OUTONO	3,10 ± 1,40	4,70	2,00	2,05 ± 1,78	4,10	0,85	1,06 ± 0,98	2,20	0,47
	INVERNO	3,60 ± 1,30	4,80	2,30	1,17 ± 0,35	1,50	0,80	9,41 ± 14,37	26,00	0,82

χ - média
s - desvio-padrão

Tabela 24. Fagos de *E. coli* C em águas superficiais nas estações Ilha, Portas do Mar e Ponte de Cais (ufp/100 ml).

ANO	ESTAÇÃO	ILHA (x10)			PORTAS DO MAR (x10 ³)			PONTE CAIS (x10 ²)		
		$\chi \pm s$ (n=3)	Máximo	Mínimo	$\chi \pm s$ (n=3)	Máximo	Mínimo	$\chi \pm s$ (n=3)	Máximo	Mínimo
1990	PRIMAVERA	2,60 ± 0,77	3,25	1,75	4,43 ± 1,93	5,60	2,20	1,50 ± 0,26	1,80	1,30
	VERÃO	4,93 ± 5,37	11,00	0,80	5,23 ± 2,60	7,80	2,60	1,03 ± 0,21	1,20	0,80
	OUTONO	3,67 ± 1,53	5,00	2,00	5,30 ± 2,68	7,70	2,40	2,43 ± 0,74	3,00	1,60
	INVERNO	10,27 ± 3,52	14,00	7,00	4,20 ± 2,62	7,10	2,00	3,00 ± 2,33	5,60	1,10
1991	PRIMAVERA	4,87 ± 2,14	6,20	2,40	3,07 ± 2,54	6,00	1,60	1,94 ± 1,67	3,80	0,56
	VERÃO	1,13 ± 0,12	1,20	1,00	4,36 ± 4,30	9,20	0,98	2,53 ± 2,65	5,50	0,40
	OUTONO	3,93 ± 2,16	6,40	2,40	0,71 ± 0,49	1,10	0,16	1,11 ± 0,79	1,60	0,20
	INVERNO	6,00 ± 2,00	8,00	4,00	1,62 ± 0,43	2,00	1,16	3,37 ± 3,67	7,60	1,20

χ - média
s - desvio-padrão

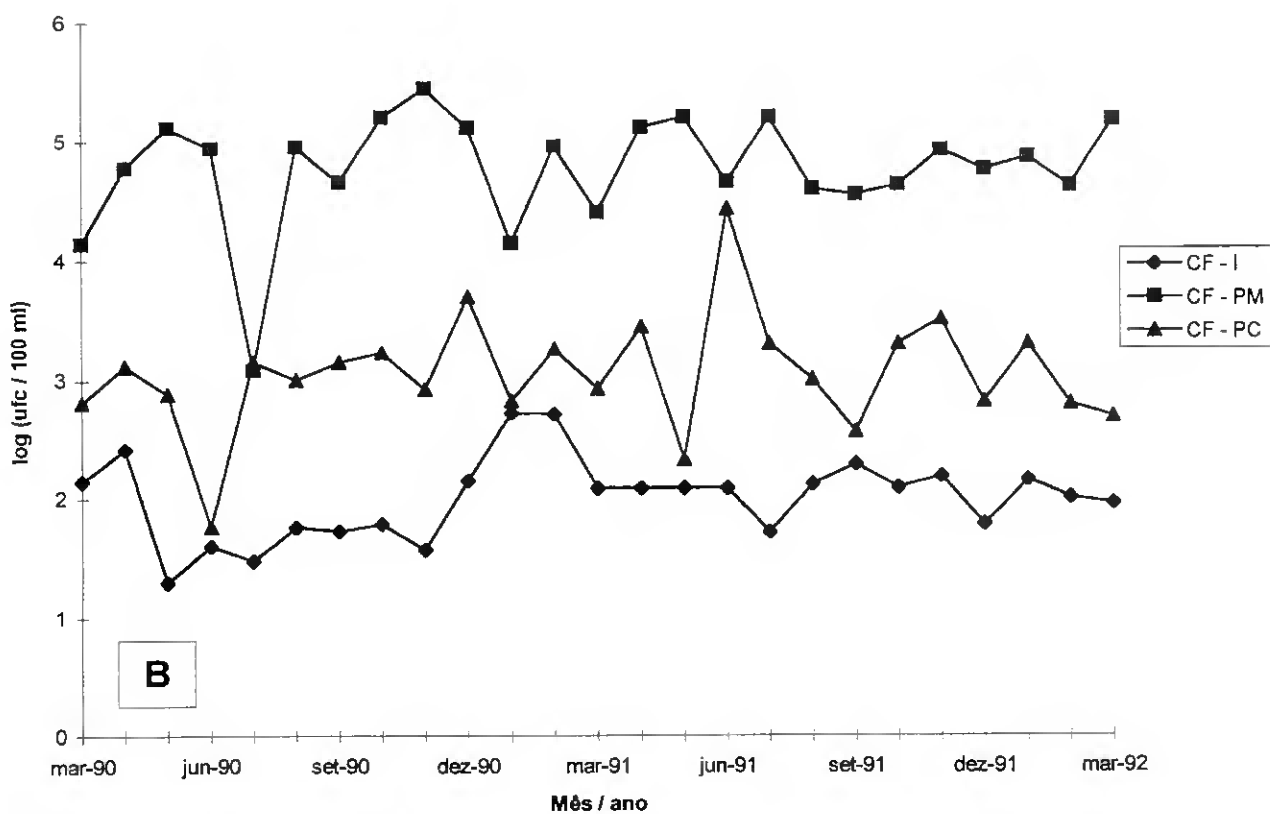
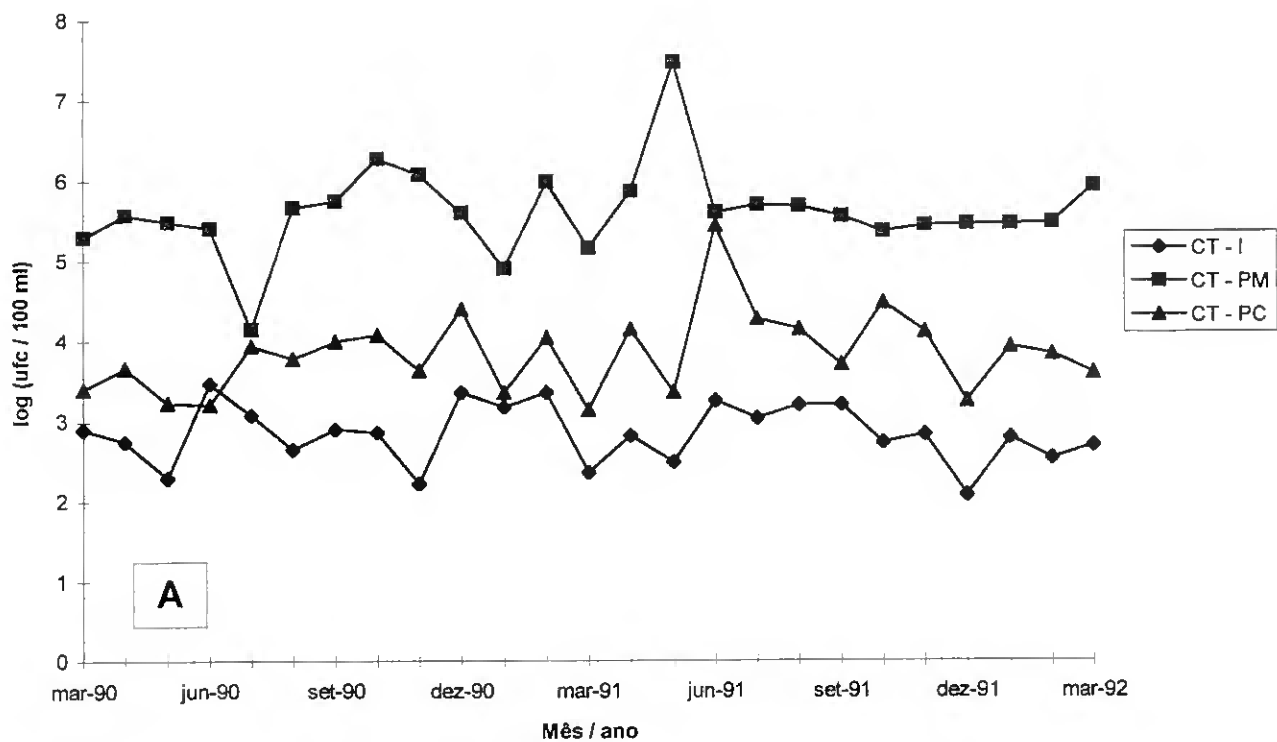


Figura 13. Variação espaço-temporal de coliformes totais (A) e coliformes fecais (B); estações Ilha (I), Portas do Mar (PM) e Ponte Cais (PC).

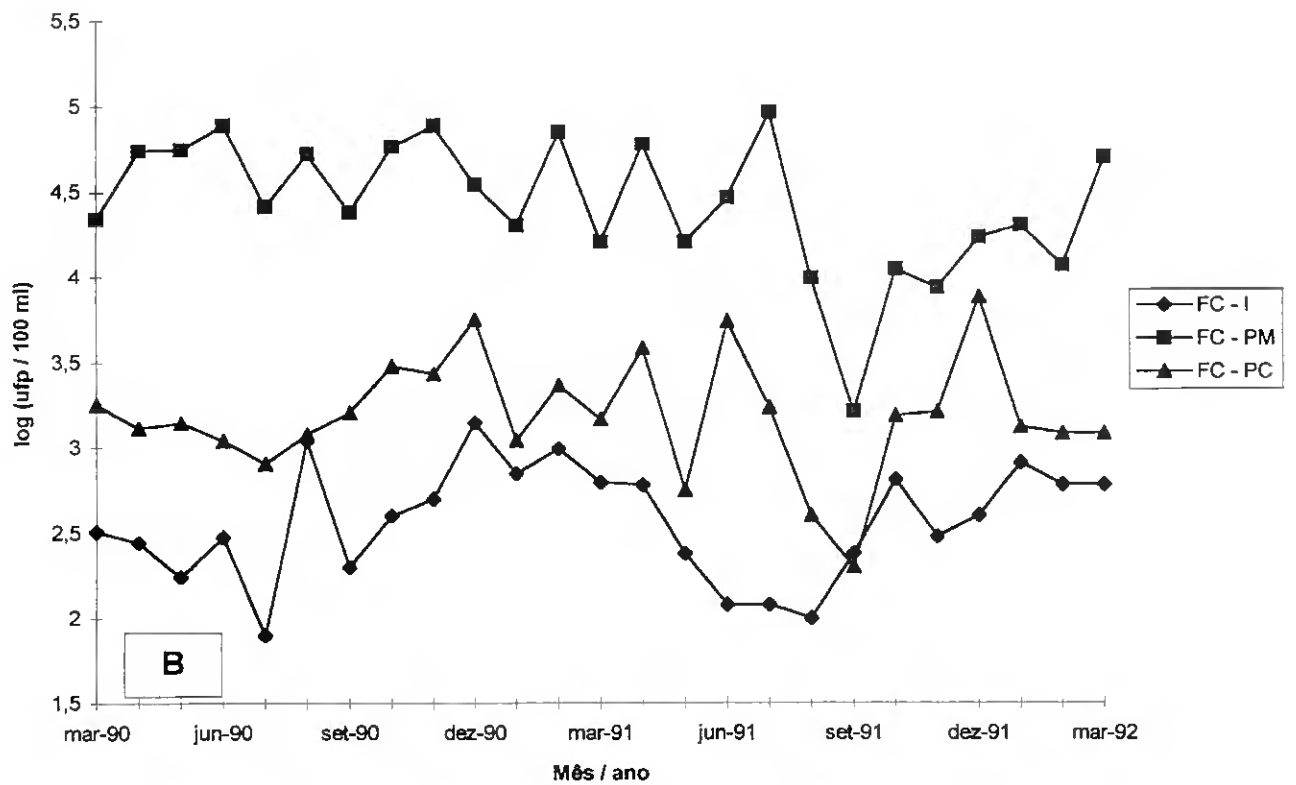
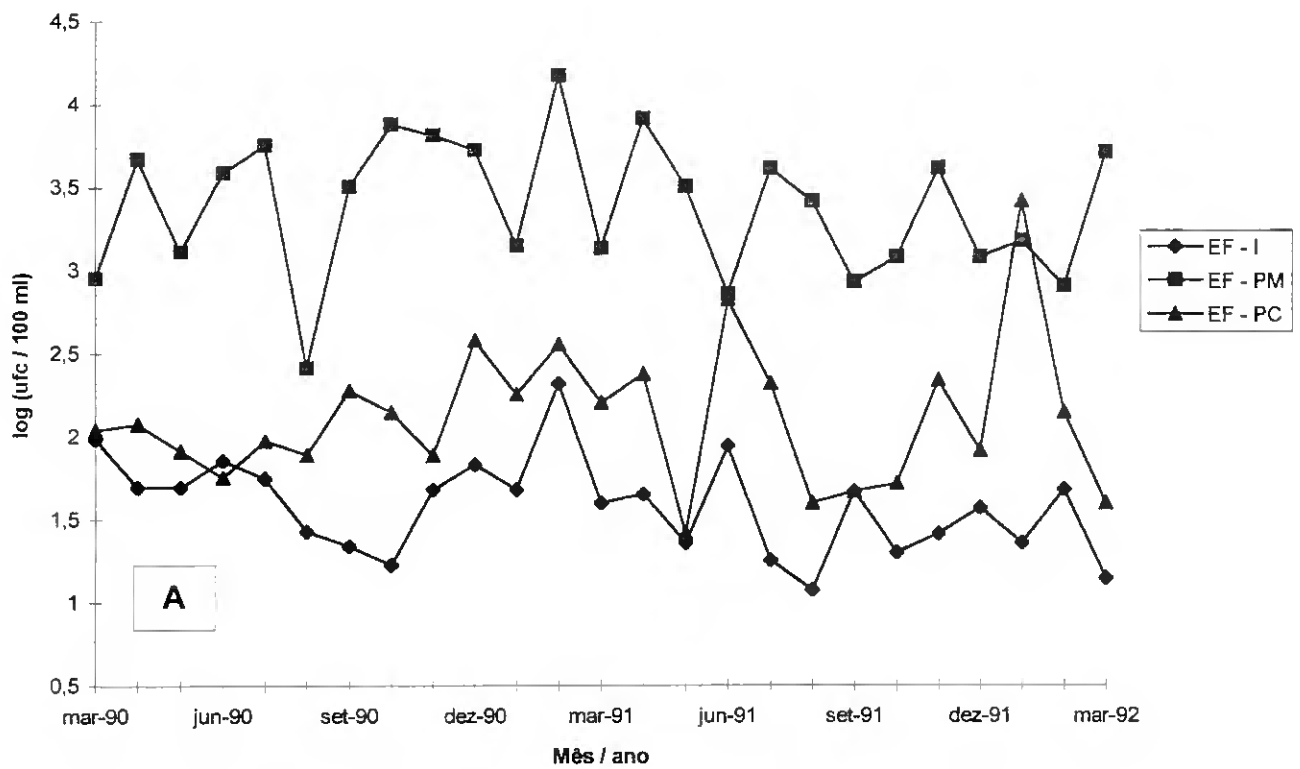


Figura 14. Variação espaço-temporal de estreptococos fecais (A) e colifagos (B); estações Ilha (I), Portas do Mar (PM) e Ponte Cais (PC).

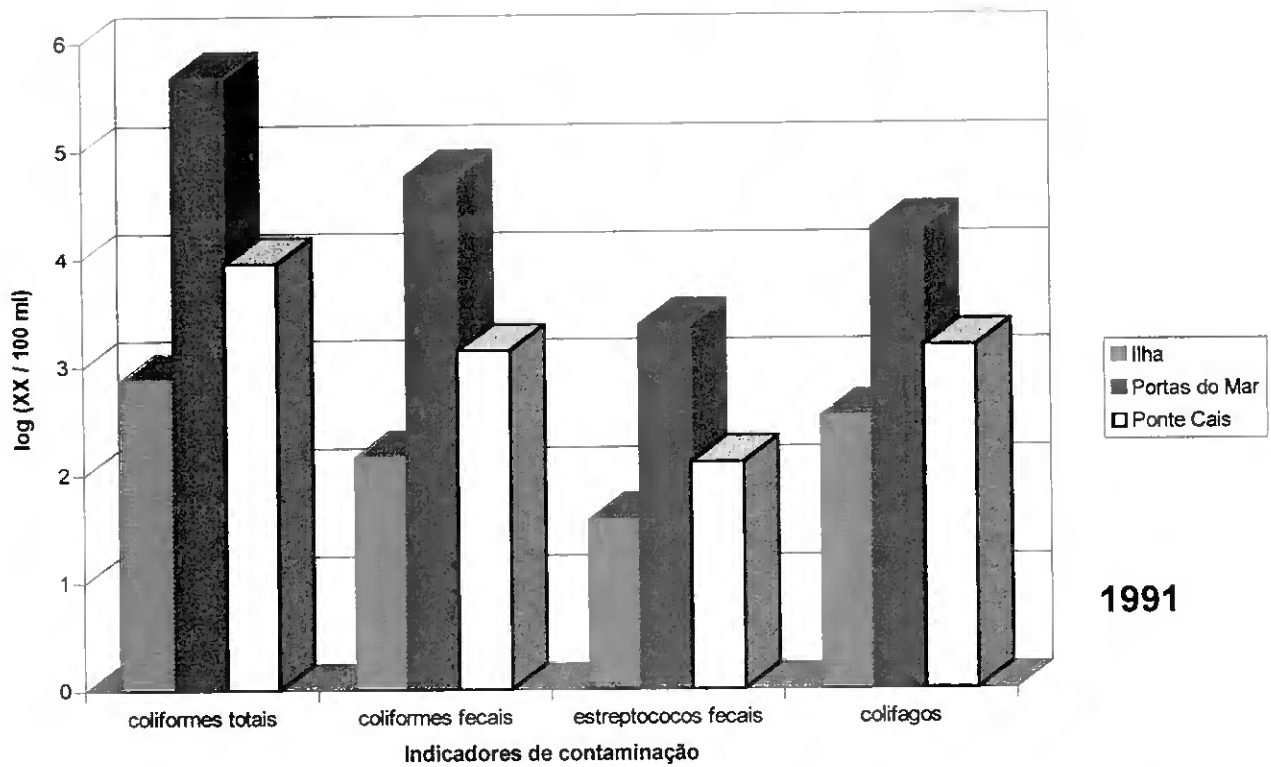
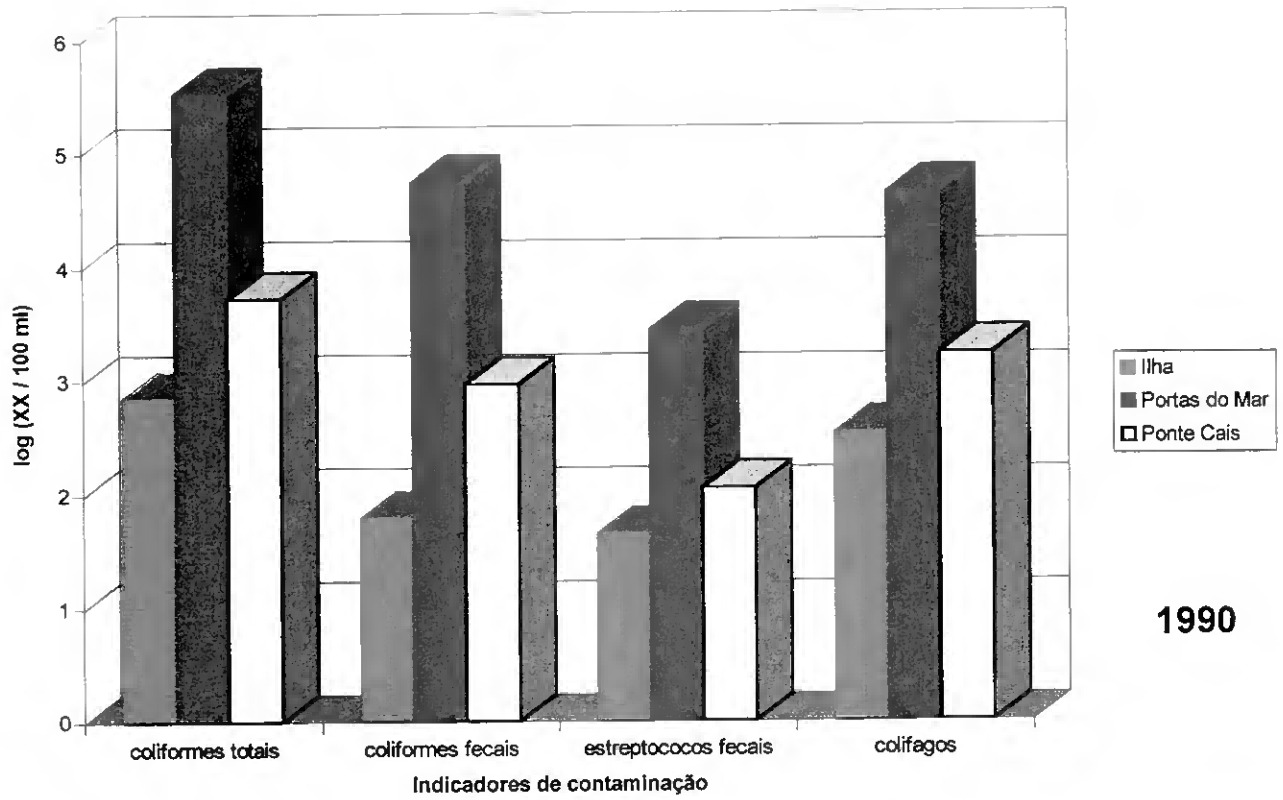
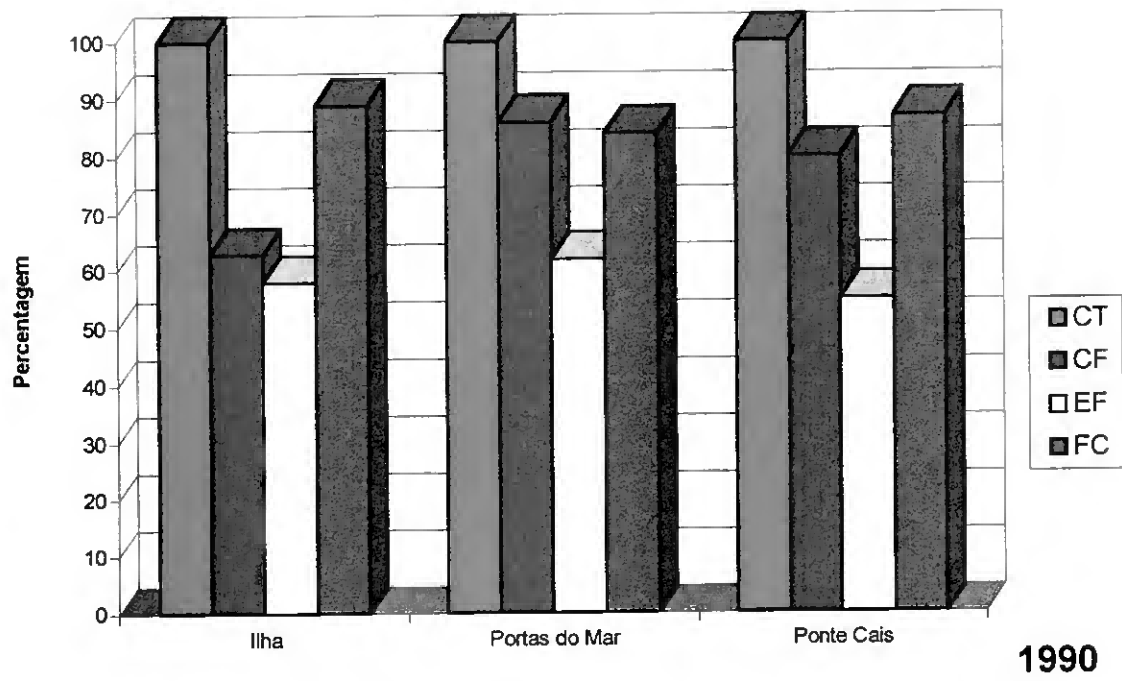
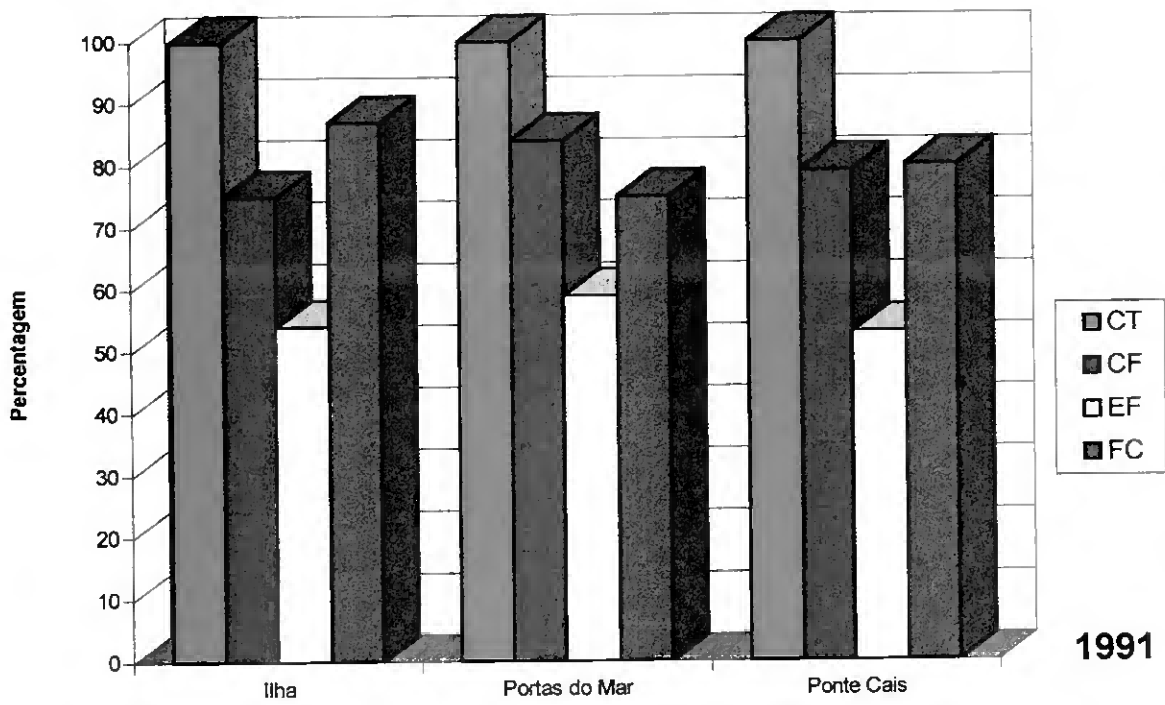


Figura 15. Variação espacial dos microrganismos indicadores de contaminação fecal



1990



1991

Figura 16. Percentagem de diferentes microrganismos em relação aos coliformes totais.

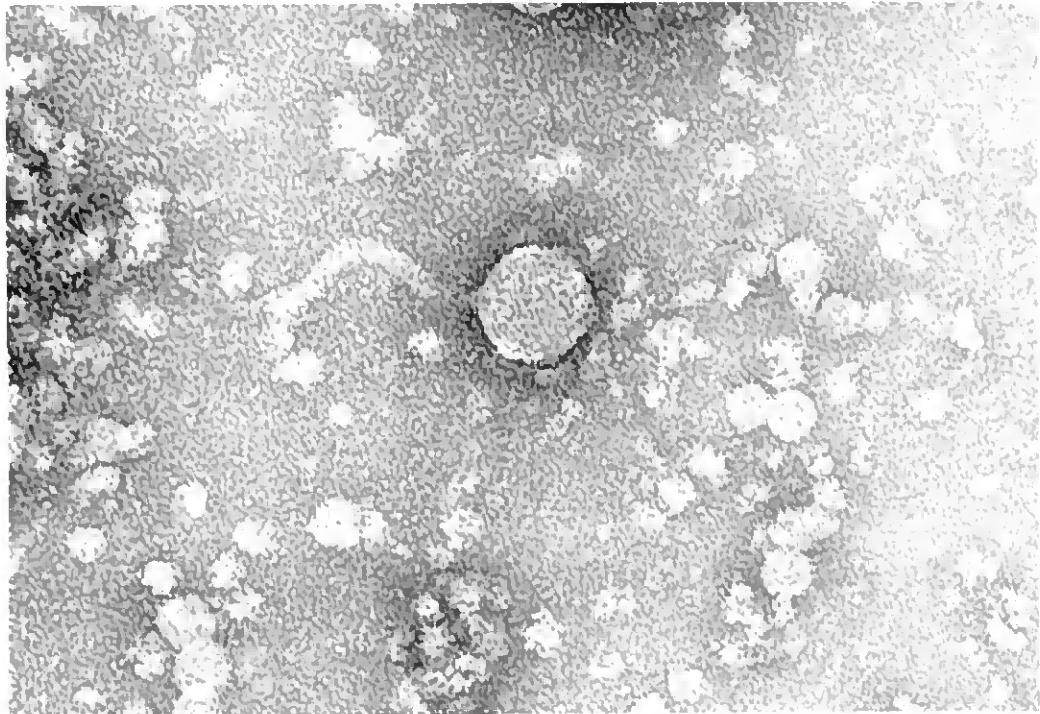


Figura 17. Morfologia de um colifago isolado em amostra de água da Ria Formosa. Microfotografia de microscópio electrónico de transmissão.

Os coeficientes de correlação de Pearson, que se apresentam a seguir nas Tabelas 25, 26, 27 e 28 permitem estabelecer a relação existente entre os microrganismos indicadores estudados.

Para as três estações de amostragem registaram-se correlações significativas ($p=0,05$) entre coliformes fecais e colifagos. Não foram encontradas outras correlações significativas entre os microrganismos indicadores pesquisados nas 25 amostras de água da estação Ilha. É de notar que a estação Ilha é a que se encontra mais afastada de fontes poluidoras sistemáticas. Para as amostras das estações Portas do Mar e Ponte Cais verificou-se que se correlacionavam bem os seguintes microrganismos: coliformes totais e coliformes fecais ($p=0,01$). Para a estação Portas do Mar ainda se verificaram boas correlações entre os colifagos e os estreptococos fecais. Para os estreptococos fecais isolados nas amostras de água da estação Ponte Cais registaram-se correlações significativas entre os coliformes totais e os fecais. Da análise global (Tabela 28), isto é considerando toda a informação obtida e processando-a como se tratasse de um só local de amostragem ($n=3 \times 25$), resulta que os quatro parâmetros, coliformes totais, coliformes fecais, estreptococos fecais e colifagos se correlacionam bem entre si.

Tabela 25. Matriz de correlação de microrganismos indicadores de contaminação fecal, em amostras de água da estação Ilha.

Parâmetros	Coliformes totais	Coliformes fecais	Estreptococos fecais	Colifagos
Coliformes totais	1			
Coliformes fecais	0,375	1		
Estreptococos fecais	0,284	0,257	1	
Colifagos	-0,127	0,385*	0,164	1

* significativo para $p=0,05$
 $n=25$

Tabela 26. Matriz de correlação de microrganismos indicadores de contaminação de origem fecal, em amostras de água da estação Portas do Mar.

Parâmetros	Coliformes totais	Coliformes fecais	Estreptococos fecais	Colifagos
Coliformes totais	1			
Coliformes fecais	0,759**	1		
Estreptococos fecais	0,236	0,241	1	
Colifagos	0,151	0,388*	0,450*	1

* significativa para $p=0,05$

** significativa para $p=0,01$

$n=25$

Tabela 27. Matriz de correlação de microrganismos indicadores de contaminação de origem fecal, em amostras de água da estação Ponte Cais.

Parâmetros	Coliformes totais	Coliformes fecais	Estreptococos fecais	Colifagos
Coliformes totais	1			
Coliformes fecais	0,841**	1		
Estreptococos fecais	0,450*	0,653**	1	
Colifagos	0,309	0,535**	0,473*	1

* significativa para $p=0,05$

** significativa para $p=0,01$

$n=25$

Tabela 28. Matriz de correlação de microrganismos indicadores de contaminação de origem fecal, em amostras de água das estações Ilha, Portas do Mar, Ponte Cais.

Parâmetros	Coliformes totais	Coliformes fecais	Estreptococos fecais	Colifagos
Coliformes totais	1			
Coliformes fecais	0,960**	1		
Estreptococos fecais	0,879**	0,898**	1	
Colifagos	0,860**	0,913**	0,884**	1

** significativa para $p=0,01$

$n=75$

1.2.3. Microrganismos patogénicos

Em relação a *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella*, os dados obtidos para estes microrganismos, foram tabelados e graficados de forma idêntica aos resultados apresentados nos pontos anteriores. Assim as Tabelas 29 e 30 resumem a informação obtida para *P. aeruginosa* e para *Salmonella*, respectivamente. As variações espaço-temporais, encontram-se registadas nas Figuras 18A e 18B.

Relativamente à levedura *Candida albicans*, apesar de se ter obtido crescimento de colónias típicas em meio selectivo, observaram-se tubos germinativos simplesmente em três amostras de água, da estação Ponte Cais. Quantificaram-se 8, 4, e 12 ufc/100 ml. Não se obtiveram valores de correlação significativos para este microrganismo.

Na estação Ilha, apenas se isolaram e identificaram *Salmonella* em 3 amostras, tendo sido 43 o Número Mais Provável (NMP) em 100 ml. O valor máximo observado nas outras duas estações, em 100ml, foi de 4600. Para estes três parâmetros os valores de correlação obtidos não foram significantes ($p > 0,05$), em nenhuma das três estações de amostragem.

Na Tabela 31 encontra-se uma listagem dos serotipos isolados nas três estações.

Tabela 29. *Pseudomonas aeruginosa* em águas superficiais nas estações Ilha, Portas do Mar e Ponte de Cais (ufc/100 ml).

ANO	ESTAÇÃO	ILHA			PORTAS DO MAR			PONTE CAIS		
		$\chi \pm s$ (n=3)	Máximo	Mínimo	$\chi \pm s$ (n=3)	Máximo	Mínimo	$\chi \pm s$ (n=3)	Máximo	Mínimo
1990	PRIMAVERA	2,67 ± 5,00	8	0	58,67 ± 74,00	142	0	23,33 ± 25,00	50	0
	VERÃO	4,00 ± 7,00	12	0	57,67 ± 13,00	73	50	23,33 ± 24,00	51	9
	OUTONO	4,67 ± 6,00	12	0	196,67 ± 64,00	270	160	19,00 ± 6,00	23	12
	INVERNO	8,67 ± 13,00	24	0	156,67 ± 75,00	200	70	10,57 ± 2,00	12	9
1991	PRIMAVERA	2,00 ± 3,00	6	0	29,67 ± 28,00	60	4	3,33 ± 6,00	10	0
	VERÃO	1,53 ± 3,00	5	0	36,00 ± 28,00	66	10	63,33 ± 92,00	170	8
	OUTONO	30,33 ± 49,00	87	0	90,00 ± 82,00	180	20	190,33 ± 303,00	540	2
	INVERNO	5,00 ± 6,00	12	0	308,67 ± 278,00	570	16	61,87 ± 98,00	175	5

χ - média
s - desvio-padrão

Tabela 30. *Salmonella* em águas superficiais nas estações Ilha, Portas do Mar e Ponte de Cais (NMP/100ml).

ANO	ESTAÇÃO	ILHA			PORTAS DO MAR			PONTE CAIS		
		$\chi \pm s$ (n=3)	Máximo	Mínimo	$\chi \pm s$ (n=3)	Máximo	Mínimo	$\chi \pm s$ (n=3)	Máximo	Mínimo
1990	PRIMAVERA	80,00 ± 138,56	240,00	0,00	3074,33 ± 2642,53	4600,00	23,00	164,40 ± 256,44	460,00	9,00
	VERÃO	3,00 ± 5,20	9,00	0,00	38,67 ± 48,44	93,00	0,00	174,67 ± 249,17	64,00	0,00
	OUTONO	0,00 ± 0,00	0,00	0,00	31,00 ± 53,69	93,00	0,00	0,00 ± 0,00	0,00	0,00
	INVERNO	0,00 ± 0,00	0,00	0,00	600,00 ± 446,77	1100,00	240,00	153,33 ± 265,58	460,00	0,00
1991	PRIMAVERA	0,00 ± 0,00	0,00	0,00	198,67 ± 227,70	460,00	43,00	31,00 ± 53,70	93,00	0,00
	VERÃO	0,00 ± 0,00	0,00	0,00	62,00 ± 53,69	93,00	0,00	0,00 ± 0,00	0,00	0,00
	OUTONO	14,33 ± 24,83	43,00	0,00	167,67 ± 254,08	460,00	0,00	0,00 ± 0,00	0,00	0,00
	INVERNO	0,00 ± 0,00	0,00	0,00	64,33 ± 77,24	150,00	0,00	153,33 ± 265,58	460,00	0,00

χ - média
s - desvio-padrão

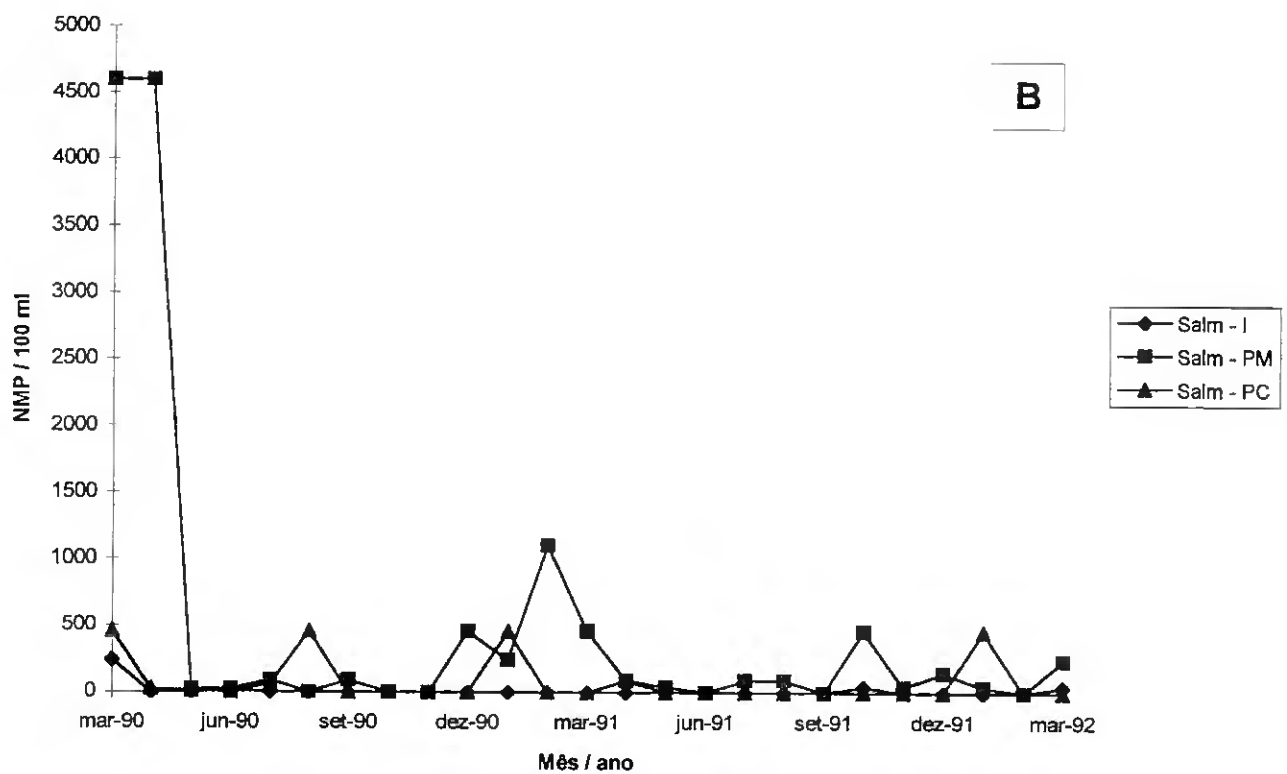
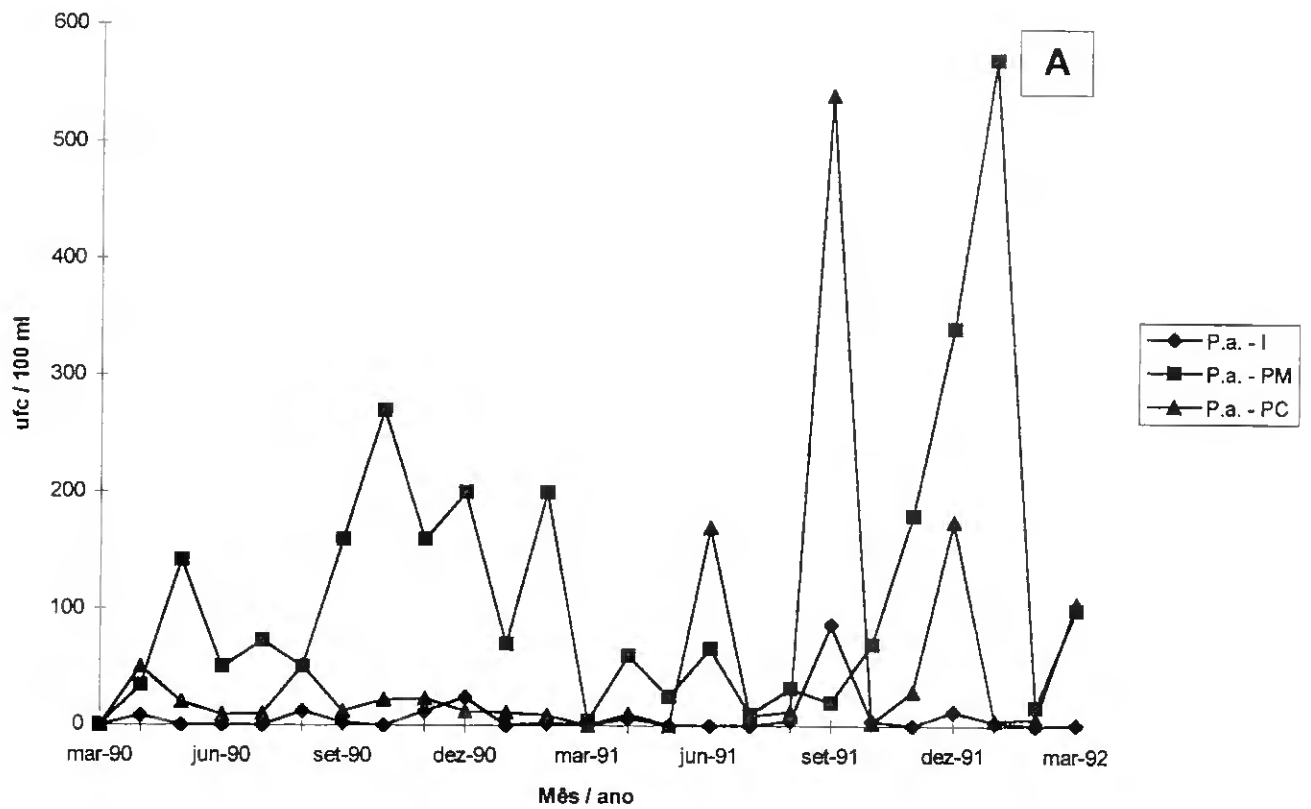


Figura 18. Variação espaço-temporal de *Pseudomonas aeruginosa* (A) e *Salmonella* (B); estações Ilha (I), Portas do Mar (PM) e Ponte Cais (PC).

Tabela 31. Serotipos de *Salmonella* isolados nas estações em estudo

Serotipo	Número de Isolamentos		
	Ilha	Portas do Mar	Ponte de Cais
<i>S. virchow</i>	2 (8,0)	4 (16,0)	2 (8,0)
<i>S. senftenberg</i>	1 (4,0)	1 (4,0)	1 (4,0)
<i>S. derby</i>	1 (4,0)	1 (4,0)	1 (4,0)
<i>S. brazaville</i>		1 (4,0)	1 (4,0)
<i>S. give</i>		2 (8,0)	
<i>S. heidelberg</i>		2 (8,0)	
<i>S. infantis</i>		1 (4,0)	1 (4,0)
<i>S. putten</i>		1 (4,0)	1 (4,0)
<i>S. typhimurium</i>		1 (4,0)	1 (4,0)
<i>S. worthington</i>		1 (4,0)	1 (4,0)
<i>Salmonella 6, 7: r:</i>	1 (4,0)	1 (4,0)	
<i>S. barreily</i>		1 (4,0)	
<i>S. brandenburg</i>		1 (4,0)	
<i>S. enteritidis</i>		1 (4,0)	
<i>S. mbandaka</i>		1 (4,0)	
<i>S. berta</i>		1 (4,0)	
<i>S. agona</i>		1 (4,0)	
<i>S. westhampton</i>		1 (4,0)	
Número total	5 (20,0)	23 (92,0)	9 (36,0)

* Em parêntese percentagem de isolamento

1.3. Relações entre microrganismos indicadores e patogénicos

As Tabelas 32, 33 e 34 traduzem as correlações obtidas para os microrganismos indicadores e patogénicos. Analisando cada estação de amostragem individualmente, não se registaram correlações significativas entre estes microrganismos. No entanto quando se efectua uma análise global (Tabela 34), isto é considerando todos os valores observados como fazendo parte da mesma amostra,

registam-se correlações significativas entre os microrganismos indicadores de contaminação fecal e os patogênicos *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella*.

Tabela 32. Matriz de correlação de parâmetros analisados em amostras de água da estação Ilha.

Parâmetros	Coliformes totais	Coliformes fecais	Estreptococos fecais	Colifagos	<i>Salmonella</i>
<i>Salmonella</i>	0,059	0,004	0,014	0,105	1
<i>P. aeruginosa</i>	-0,009	0,148	0,007	0,305	-0,171

n=25

Tabela 33. Matriz de correlação de parâmetros analisados em amostras de água da estação Portas do Mar.

Parâmetros	Coliformes totais	Coliformes fecais	Estreptococos fecais	Colifagos	<i>Salmonella</i>
<i>Salmonella</i>	-0,201	-0,238	0,296	0,111	1
<i>P. aeruginosa</i>	0,091	0,310	0,332	0,193	-0,212

n=25

Tabela 34. Matriz de correlação de parâmetros analisados em amostras de água da estação Ponte Cais.

Parâmetros	Coliformes totais	Coliformes fecais	Estreptococos fecais	Colifagos	<i>Salmonella</i>
<i>Salmonella</i>	-0,196	0,018	0,274	-0,066	1
<i>P. aeruginosa</i>	0,218	0,169	-0,045	0,066	-0,167

n=25

Tabela 35. Matriz de correlação de parâmetros analisados em amostras de água das estações Ilha, Portas do Mar, Ponte Cais.

Parâmetros	Coliformes totais	Coliformes fecais	Estreptococos fecais	Colifagos	<i>Salmonella</i>
<i>Salmonella</i>	0,443**	0,471**	0,570**	0,503**	1
<i>P. aeruginosa</i>	0,630**	0,663**	0,601**	0,693**	0,223

** significativa para $\alpha=0,01$
n=75

1.4. Relações entre microrganismos heterotróficos totais e indicadores fecais

Pela análise dos dados contidos nas Tabelas 36, 37 e 38 há a destacar, para as amostras da estação Ilha, correlação significativa entre os coliformes totais e microrganismos mesófilos que crescem a 22°C. Em amostras da estação Portas do Mar, os coliformes totais mostraram-se bem correlacionados com todos os microrganismos heterotróficos estudados. Ao analisar os dados na sua globalidade (Tabela 39), foram encontradas correlações significativas para todos os parâmetros aqui considerados com exceção para o total de bactérias. A diferença na metodologia utilizada para cálculo do Número Total de Bactérias poderá ser o motivo principal para não se registarem relações entre os microrganismos heterotróficos e o Número Total de Bactérias.

Tabela 36. Matriz de correlação, para parâmetros da estação de amostragem Ilha

Parâmetros	Nº Total Bactérias	Saprófitos 35‰	Saprófitos 17,5‰	Mesófilos 37°C	Mesófilos 22°C
Nº Total Bactérias	1	-0,102	-0,113	0,190	0,205
Coliformes totais	0,274	0,247	-0,071	0,314	0,468*
Coliformes fecais	-0,234	0,143	0,253	0,261	0,286
Estreptococos fecais	0,056	-0,159	-0,213	-0,080	-0,042
Colifagos	-0,194	0,114	0,127	-0,010	-0,043

*significante para $p=0,05$
n=25

Tabela 37. Matriz de correlação, para parâmetros da estação de amostragem Portas do Mar.

Parâmetros	Nº Total Bactérias	Saprófitos 35‰	Saprófitos 17,5‰	Mesófilos 37°C	Mesófilos 22°C
Nº Total Bactérias	1	0,048	-0,126	0,045	0,106
Coliformes totais	0,045	0,391*	0,548**	0,633**	0,704**
Coliformes fecais	0,211	0,242	0,184	0,353	0,411*
Streptococos fecais	0,259	0,266	0,211	0,283	0,288
Colifagos	0,216	-0,116	-0,176	-0,208	-0,004

* significativa para $p=0,05$

**significante para $p=0,01$

n=25

Tabela 38. Matriz de correlação, para parâmetros da estação de amostragem Ponte Cais.

Parâmetros	Nº Total Bactérias	Saprófitos 35‰	Saprófitos 17,5‰	Mesófilos 37°C	Mesófilos 22°C
Nº Total Bactérias	1	-0,365	-0,300	-0,233	-0,240
Coliformes totais	-0,066	0,243	0,112	0,309	0,316
Coliformes fecais	-0,190	0,074	-0,040	0,150	0,129
Streptococos fecais	-0,069	-0,160	-0,179	-0,125	-0,112
Colifagos	0,154	-0,079	-0,126	-0,224	-0,202

n=25

Tabela 39. Matriz de correlação, para parâmetros das estações de amostragem Ilha, Portas do Mar, Ponte Cais.

Parâmetros	Nº Total Bactérias	Saprófitos 35‰	Saprófitos 17,5‰	Mesófilos 37°C	Mesófilos 22°C
Nº Total Bactérias	1	0,057	0,059	0,207	0,218
Coliformes totais	0,275*	0,617**	0,679**	0,831**	0,825**
Coliformes fecais	0,236*	0,572**	0,644**	0,795**	0,775**
Streptococos fecais	0,286*	0,502**	0,580**	0,711**	0,694**
Colifagos	0,264*	0,492**	0,575**	0,681**	0,674**

* significativa para $p=0,05$

**significante para $p=0,01$

n=75

1.5. Relações entre parâmetros físico-químicos e microbiológicos

1.5.1. Físico-químicos e indicadores de contaminação fecal

Nas Tabelas 40, 41, 42 e 43 concentra-se informação sobre as correlações entre os indicadores microbiológicos de contaminação fecal (coliformes totais, coliformes fecais, estreptococos fecais e colifagos) e parâmetros físico-químicos do meio marinho. Nas amostras da estação Ilha, registaram-se correlações significativas, embora negativas, entre a temperatura e os coliformes fecais; os coliformes totais e a transparência e a salinidade. Na estação Portas do Mar apenas os coliformes totais se correlacionam negativa e significativamente com o oxigénio dissolvido. Não se observaram correlações significativas para as amostras recolhidas na estação Ponte Cais.

Através da análise global dos dados (Tabela 43), registaram-se correlações significativas (negativas) entre os indicadores clássicos e o oxigénio dissolvido e a transparência, assim como entre os estreptococos fecais e a salinidade.

Tabela 40. Matriz de correlação de parâmetros registados em amostras de água da estação Ilha.

Parâmetros	Temperatura	Oxigénio Dissolvido	Salinidade	Transparência
Coliformes totais	0,247	-0,073	-0,126	-0,455*
Coliformes fecais	-0,527**	0,193	-0,423*	-0,256
Estreptococos fecais	-0,239	0,162	-0,275	-0,599**
Colifagos	-0,727**	0,151	-0,650**	-0,039

* significante para $p=0,05$

** significante para $p=0,01$

n=25

Tabela 41. Matriz de correlação de parâmetros registados em amostras de água da estação Portas do Mar.

Parâmetros	Temperatura	Oxigénio dissolvido	Salinidade	Transparência
Coliformes totais	-0,084	0,419*	-0,075	0,226
Coliformes fecais	-0,200	0,141	-0,217	0,086
Estreptococos fecais	-0,134	0,093	-0,289	-0,021
Colifagos	0,097	0,003	-0,127	-0,301

* significativa para $p=0,05$
n=25

Tabela 42. Matriz de correlação de parâmetros registados em amostras de água da estação Ponte Cais

Parâmetros	Temperatura	Oxigénio dissolvido	Salinidade	Transparência
Coliformes totais	0,311	-0,156	-0,069	0,021
Coliformes fecais	0,066	-0,215	-0,141	-0,057
Estreptococos fecais	-0,250	-0,185	-0,130	-0,292
Colifagos	-0,286	-0,153	-0,378	0,124

n=25

Tabela 43. Matriz de correlação de parâmetros registados em amostras de água das estações Ilha, Portas do Mar, Ponte Cais.

Parâmetros	Temperatura	Oxigénio dissolvido	Salinidade	Transparência
Coliformes totais	0,057	-0,251*	-0,180	-0,266*
Coliformes fecais	-0,065	-0,271*	-0,229	-0,275*
Estreptococos fecais	-0,078	-0,280*	-0,251*	-0,381**
Colifagos	-0,111	-0,276*	-0,263*	-0,291*

* significativa para $p=0,05$

** significativa para $p=0,01$

n=75

1.5.2. Físico-químicos e microrganismos heterotróficos

As Tabelas 44, 45, 46 e 47, reflectem as relações registadas para os parâmetros físico-químicos e os microrganismos cultivados a temperaturas de 37° C, 22° C e salinidades de 35 ‰ e 17,5 ‰.

Na Tabela 44, que se refere às amostras da estação Ilha, não se encontram valores de correlação significativos para as relações entre os parâmetros físico-químicos e os microrganismos heterotróficos. Nas estações Portas do Mar e Ponte Cais (Tabelas 45 e 46), há a destacar a influência do oxigénio dissolvido na variação dos microrganismos mesófilos. Na análise global (Tabela 47), também não se registaram correlações significativas.

Tabela 44. Matriz de correlação de parâmetros colhidos em amostras da estação Ilha

Parâmetros	Temperatura	Oxigénio dissolvido	Salinidade	Transparência
Mesófilos a 37° C	-0,093	0,005	-0,164	-0,268
Mesófilos a 22° C	-0,038	0,060	-0,207	-0,332
Saprófitos a 35 ‰	0,098	-0,030	0,102	-0,246
Saprófitos a 17,5 ‰	-0,087	0,179	0,128	-0,151

n=25

Tabela 45. Matriz de correlação de parâmetros colhidos em amostras da estação Portas do Mar.

Parâmetros	Temperatura	Oxigénio dissolvido	Salinidade	Transparência
Mesófilos a 37° C	-0,016	0,358	-0,080	0,292
Mesófilos a 22° C	0,016	0,397*	-0,077	0,240
Saprófitos a 35 ‰	0,154	0,009	0,075	0,158
Saprófitos a 17,5 ‰	0,323	0,182	0,011	0,189

* significante para $p=0,05$

n=25

Tabela 46. Matriz de correlação de parâmetros colhidos em amostras da estação Ponte Cais.

Parâmetros	Temperatura	Oxigênio dissolvido	Salinidade	Transparência
Mesófilos a 37° C	0,227	0,494**	0,222	-0,063
Mesófilos a 22° C	0,186	0,433*	0,174	-0,001
Saprófitos a 35 ‰	0,303	0,250	0,203	0,148
Saprófitos a 17,5 ‰	0,372	0,308	0,277	0,130

* significante para $p=0,05$

** significante para $p=0,01$

n=25

Tabela 47. Matriz de correlação de parâmetros colhidos em amostras das estações Ilha, Portas do Mar, Ponte Cais.

Parâmetros	Temperatura	Oxigênio dissolvido	Salinidade	Transparência
Mesófilos 37° C	0,035	-0,033	-0,142	-0,211
Mesófilos 22° C	0,047	-0,028	-0,151	-0,224
Saprófitos 35 ‰	0,155	-0,070	-0,016	-0,094
Saprófitos 17,5 ‰	0,168	-0,034	-0,054	-0,149

n=75

1.5.3. Físico-químicos e microrganismos patogênicos.

Os resultados reunidos nas Tabelas 48, 49 e 50 indicam a existência de correlações significativas entre *Pseudomonas aeruginosa* e o oxigênio dissolvido, e entre *Salmonella* e os parâmetros, salinidade e transparência. Na análise global (Tabela 51) não se registaram correlações significativas entre *Salmonella* e salinidade.

Tabela 48. Matriz de correlação de parâmetros colhidos em amostras da estação Ilha

Parâmetros	Temperatura	Oxigênio dissolvido	Salinidade	Transparência
<i>Salmonella</i>	0,008	-0,090	0,020	-0,176
<i>P. aeruginosa</i>	-0,107	-0,243	-0,187	0,205

n=25

Tabela 49. Matriz de correlação de parâmetros colhidos em amostras da estação Portas do Mar.

Parâmetros	Temperatura	Oxigênio dissolvido	Salinidade	Transparência
<i>Salmonella</i>	0,473*	-0,259	-0,037	0,223
<i>P. aeruginosa</i>	-0,173	-0,196	-0,248	0,208

* significativa para p=0,05

** significativa para =0,001

n=25

Tabela 50. Matriz de correlação de parâmetros colhidos em amostras da estação Ponte Cais.

Parâmetros	Temperatura	Oxigênio dissolvido	Salinidade	Transparência
<i>Salmonella</i>	-0,054	0,013	0,451*	-0,464*
<i>P. aeruginosa</i>	0,279	-0,481*	0,016	0,209

* significativa para p=0,05

n=25

Tabela 51. Matriz de correlação de parâmetros colhidos em amostras das estações Ilha, Portas do Mar, Ponte Cais.

Parâmetros	Temperatura	Oxigênio dissolvido	Salinidade	Transparência
<i>Salmonella</i>	-0,11	-0,096	-0,14	-0,425**
<i>P. aeruginosa</i>	-0,004	-0,395**	-0,215	0,004

** significativa para =0,001

n=75

2. ESTUDO COMPARATIVO DE MEIOS SELECTIVOS PARA O ISOLAMENTO E QUANTIFICAÇÃO DE ESTREPTOCOCOS FECAIS

2.1. Prova de crescimento qualitativo

Na Tabela 52, encontram-se os resultados referentes ao estudo de crescimento qualitativo, das 15 estirpes bacterianas ensaiadas em 7 meios de cultura selectivos.

Todos os meios selectivos, utilizados neste teste, permitiram o crescimento das estirpes de estreptococos fecais em estudo, com excepção para o caso do meio de agar Kanamicina Esculina Azida, no qual se registou um crescimento reduzido de *Streptococcus equinus*, somente no final do período de pesquisa. Totalmente selectivos, foram unicamente, o agar mEnterococcus e o agar KF, dado que asseguraram o crescimento óptimo de todos os estreptococos fecais às 24 h, e não permitiram o crescimento de nenhuma das restantes estirpes bacterianas. Por outro lado, os agares Bilis Esculina Azida (BEA) e Kanamicina Esculina, que são usados como rotina para a recuperação de enterococos e estreptococos fecais, revelaram um crescimento óptimo de microrganismos acompanhantes, tais como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*, e crescimento reduzido de estirpes do género *Klebsiella*. O meio basal de Barne e o caldo Azida Dextrose (meio de Rothe) permitiram o crescimento de praticamente todas as estirpes testadas. Contudo, o caldo confirmativo, Etilo Violeta Azida (EVA, meio de Litsky), revelou possuir uma boa selectividade.

2.2. Selectividade

A Tabela 53 resume os resultados de selectividade de 8 meios de cultura utilizando 13 amostras de água da Ria Formosa. A selectividade mede a capacidade de um meio de cultura inibir ou reduzir o crescimento dos microrganismos acompanhantes. Nenhum meio de cultura testado, no presente trabalho, atingiu uma redução, dos microrganismos acompanhantes, de 1000 vezes, aqui expresso como 3-logs. A redução média variou entre 2,35 e 0,73-logs para o procedimento em que se

TABELA 52. Crescimento qualitativo de diferentes microrganismos em meios de cultura selectivos para estreptococos fecais.

Estirpe	Meios de cultura						
	m Enterococcus	KF	BEA	KEA	Barne's	Rothe's	Litsky's
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 8213	+++ ^a	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>E. faecium</i> ATCC 10541	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Streptococcus equinus</i> CECT 973	+++	+++	+++	± ^b	+++	+++	+++
<i>S. mitis</i> CECT 804	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 8532	- ^c	-	+++	+++	++ ^d	+++	-
<i>S. epidermidis</i> NCTC 4276	-	-	+++	-	++	+++	-
<i>Escherichia coli</i> NCTC 9001	-	-	-	-	+++	+++	-
<i>Klebsiella aerogenes</i> NCTC 418	-	-	±	±	+++	±	-
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	-	-	±	±	++	±	-
<i>Proteus vulgaris</i> CECT 484	-	-	-	-	+++	+++	-
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	-	-	-	-	+++	+++	+ ^e
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145	-	-	+++	+++	+++	+++	+
<i>Bacillus stearothermophilus</i> NCTC 10003	-	-	-	-	+++	+++	-
<i>Candida albicans</i> INSA 969	-	-	+++	+++	-	+++	-

^a crescimento a 24h

^d crescimento a 48h

^b crescimento reduzido

^e crescimento a 72h

^c sem crescimento

ATCC: American Type Culture Collection

CECT: Colección Española de Cultivos Tipos

NCTC: National Collection of Type Cultures

INSA: Instituto Nacional de Saúde (Portugal)

TABELA 53. Selectividade dos métodos para enumeração de estreptococos fecais em amostras de água do mar.

Meios de cultura	Factor de redução ^a				
	Primavera (n= 3)	Verão (n= 1)	Outono (n= 7)	Inverno (n= 2)	Global (n= 13)
m Enterococcus	106,4	78,3	243,8	113,8	179,4
KF	131,9	58,1	279,8	126,8	205,1
BEA	36,4	35,3	82,3	62,5	65,0
KEA	51,6	52,9	211,3	40,6	136,0
BE	4,1	1,5	7,3	2,8	5,4
Barne's	47,4	29,5	197,7	51,4	127,6
Mitis-Salivarius	4,1	4,5	96,8	7,7	54,6
Rothe-Litsky	88,3	1,6	359,2	52,7	222,0

^a Razão entre o número total de colónias contadas no meio de controlo (PCA) e o número total de colónias contadas em cada meio testado. O valor apresentado representa a média obtida em oito amostras por teste e amostragem

aplicou em conjunto os meios de Rothe e Listky e agar Bilis Esculina. Os meios mais selectivos foram a associação Rothe e Litsky, KF e mEnterococcus, atendendo a que não existem diferenças significativas entre as médias dos seus factores de redução ($p > 0,1$) (2,35 versus 2,31 versus 2,25-logs). No entanto, se os resultados forem analisados com base na estação do ano, o agar mEnterococcus apresenta a melhor capacidade selectiva para o verão e para o inverno, o agar KF para a primavera e Rothe-Litsky para o período do outono. Os factores de redução manifestados pelos meios testados variaram de acordo com o conteúdo microbiológico das amostras. Assim, para níveis superiores a 10^6 ufc/100 ml, todos os meios testados apresentaram factores de selectividade elevados, variando entre cerca de 3-logs (2,98) para a associação Rothe e Litsky e 1,32 logs para o agar BE. Para níveis inferiores a 10^6 ufc/100 ml, somente os meios KF e mEnterococcus apresentaram reduções da ordem dos 2-logs.

2.3. Especificidade

Considera-se que um meio é específico para um determinado microrganismo, estreptococos fecais neste caso particular, quando 90% ou mais das colónias típicas, recuperadas por esse meio de cultura, sejam confirmadas como pertencentes a esse grupo microbiano. Por outro lado, a percentagem de estreptococos fecais que crescem como colónias não típicas, não pode ser superior a 10%. Um número superior a 500 colónias, que cresceram nos meios selectivos, foram isoladas e identificadas conforme a metodologia descrita em Material e Métodos. As percentagens mais elevadas, de colónias típicas confirmadas como sendo estreptococos fecais, foram determinadas nos agares KF e mEnterococcus (98,5 e 97,5%, respectivamente) (Tabela 54). Estes foram os únicos meios que satisfizeram o critério de especificidade.

Os restantes meios testados, apresentaram uma especificidade muito baixa, dado que a percentagem de confirmação, das colónias típicas, como sendo estreptococos fecais, variou de 80,5% para o agar KEA a 6,8% para o agar BE. Por outro lado, as percentagens de falsos negativos, foram aceitáveis para todos os meios testados (inferior a 10%). A verificação, ao nível do género, das colónias típicas que

TABELA 54. Especificidade comparativa de diversos meios de cultura selectivos para estreptococos fecais.

Meios de cultura	Nº. de colónias examinadas	Colónias típicas		Colónias não típicas	
		Nº. examinado	Percentagem de confirmação como estreptococos fecais	Nº. examinado	Percentagem de confirmação como estreptococos fecais
m Enterococcus	80	80	97,5	0	0
KF	68	66	98,5	2	0
BEA	79	60	68,3	19	1,3
KEA	69	41	80,5	28	1,4
BE	73	44	6,8	29	1,4
Barne's	69	68	67,6	1	0
Mitis-Salivarius	95	77	13,0	18	0
TOTAL	533	436		97	

cresceram nos diferentes meios testados, encontra-se descrita na Tabela 55. Todas as colónias típicas (n=533), foram identificadas utilizando o sistema API 20 STREP.

Na Tabela 56 encontram-se listadas as espécies identificadas, o número de isolamentos e os meios de cultura onde se desenvolveram. Todos os meios recuperaram, principalmente espécies que pertencem ao género *Enterococcus*, com excepção para o agar BÍlis Esculina, que recuperou somente espécies do género *Streptococcus*, das quais nenhuma pertence ao grupo dos estreptococos fecais. Pelos resultados obtidos, os agares BE e Mitis-Salivarius foram eliminados dos estudos comparativos que se seguem.

2.4 - Eficiência de detecção e recuperação de estreptococos fecais

Os meios testados, descritos na Tabela 57 são igualmente eficientes na detecção de estreptococos fecais em amostras de água (100%). Contudo, as taxas de recuperação dos meios, apresentam diferenças, tomando em consideração as colónias típicas e o número de estreptococos fecais confirmados. O agar mEnterococcus e o procedimento da filtração com membrana, apresentam a percentagem média de recuperação relativa mais elevada (84,7%), no entanto não se verifica uma diferença significativa para a técnica do NMP usando os caldos Rothe e Listky (81,2%). Por outro lado, foi observada uma taxa de recuperação relativa tão baixa como 59%, para o agar BEA em conjunto com a técnica da filtração por membrana.

2.5. Precisão

Na Figura 19, estão representados os valores do índice de dispersão de Fisher D^2 , calculados para cada um dos 6 meios de cultura em estudo, e para um total de 21 amostras de água.

Como pode ser observado, existe uma distribuição uniforme das contagens para os agares mEnterococcus, Kanamicina Esculina Azida e Mitis - Salivarius, e não foi detectado um efeito significativo de placa para placa. Foi também registada uma

TABELA 55. Verificação, ao nível do género, de colónias típicas desenvolvidas nos diferentes meios de cultura testados.

Meio de cultura	Nº. de colónias examinadas	Percentagem de verificação de colónias típicas como:				
		<i>Enterococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Aerococcus/Micrococcus</i>	<i>Staphylococcus</i>	Gram-negativos
m Enterococcus	80	90,0	7,5	1,25	1,25	0
KF	66	95,5	3,0	0	1,5	0
BEA	60	53,3	15,0	0	3,3	28,3
KEA	41	73,2	14,6	0	0	12,2
BE	44	0	6,8	0	40,9	52,3
Barne's	68	55,9	16,2	0	11,8	16,2
Mitis-Salivarius	77	7,8	6,5	1,3	24,7	59,7

TABELA 56. Identificação de colónias típicas desenvolvidas em meios selectivos para estreptococos fecais.

Microrganismos	Meios de cultura						
	m Enterococcus	KF	KEA	BEA	BE	M-S	Barne's
<i>Enterococcus faecium</i>	34 ^a	36	20	11	0	0	22
<i>E. faecalis</i>	14	16	2	6	0	2	5
<i>E. durans</i>	22	11	7	13	0	4	10
<i>E. gallinarum</i>	2	0	0	2	0	0	0
<i>E. avium</i>	0	0	1	0	0	0	1
<i>Streptococcus</i> spp.	6	2	3	7	3	4	6
<i>S. bovis</i>	0	0	0	2	0	0	2
<i>S. lactis/diacetilus</i>	0	0	3	0	0	1	3
<i>Staphylococcus</i> spp.	1	1			7	6	5
<i>S. hominis</i>					1	1	
<i>S. warneri</i>						1	1
<i>S. aureus</i>					2	3	1
<i>S. epidermidis</i>				2	4	3	
<i>S. xylosus</i>					1	1	
<i>S. lentus</i>					2	1	
<i>S. saprophyticus</i>					1	2	1
<i>S. cohnii</i>						1	
<i>Micrococcus</i> spp.						1	
<i>Aerococcus viridans</i>	1						
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>				4			
<i>V. fluvialis</i>			1		3	1	
<i>V. alginolyticus</i>			1				1
<i>V. vulnificus</i>				4	2		
<i>V. damsela</i>							1
<i>Aeromonas hydrophila</i>					2	3	1
<i>A. sobria</i>					1		
<i>Chromobacterium violaceum</i>			1				
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>			3				
<i>Moraxella</i> spp.					1		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			2				
<i>P. cepacia</i>					1		
<i>P. pausimovilis</i>			1				
<i>P. stutzeri</i>				2			
<i>P. testovoraculigenes</i>				1		2	
<i>P. pickettii</i>						1	
<i>P. putrefaciens</i>						2	
<i>P. putida</i>							3
<i>Flavobacterium indologenes</i>				1			
<i>Achromobacter</i> spp.						1	
<i>A. xylosoxidans</i>						1	
<i>Pasteurella</i> spp.						2	
<i>Morganella morganii</i>							1

TABELA 56. Identificação de colónias típicas desenvolvidas em meios selectivos para estreptococos fecais (continuação)

microrganismos	Meios de cultura						
	m Enterococcus	KF	KEA	BEA	BE	M-S	Barne's
<i>Citrobacter freundii</i>			1	3	1	4	2
<i>Enterobacter cloacae</i>						5	
<i>E. intermedium</i>				2		3	1
<i>E. agglomerans</i>					1	2	
<i>E. sakazakii</i>					2	2	
<i>Escherichia coli</i>					2	2	
<i>E. adecarboxylata</i>						2	
<i>Klebsiella oxytoca</i>						6	1
<i>K. pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i>					2	5	
<i>K. pneumoniae</i> ssp. <i>ozonae</i>						1	
<i>Yersinia intermedia</i>						1	

^a Número de isolamentos

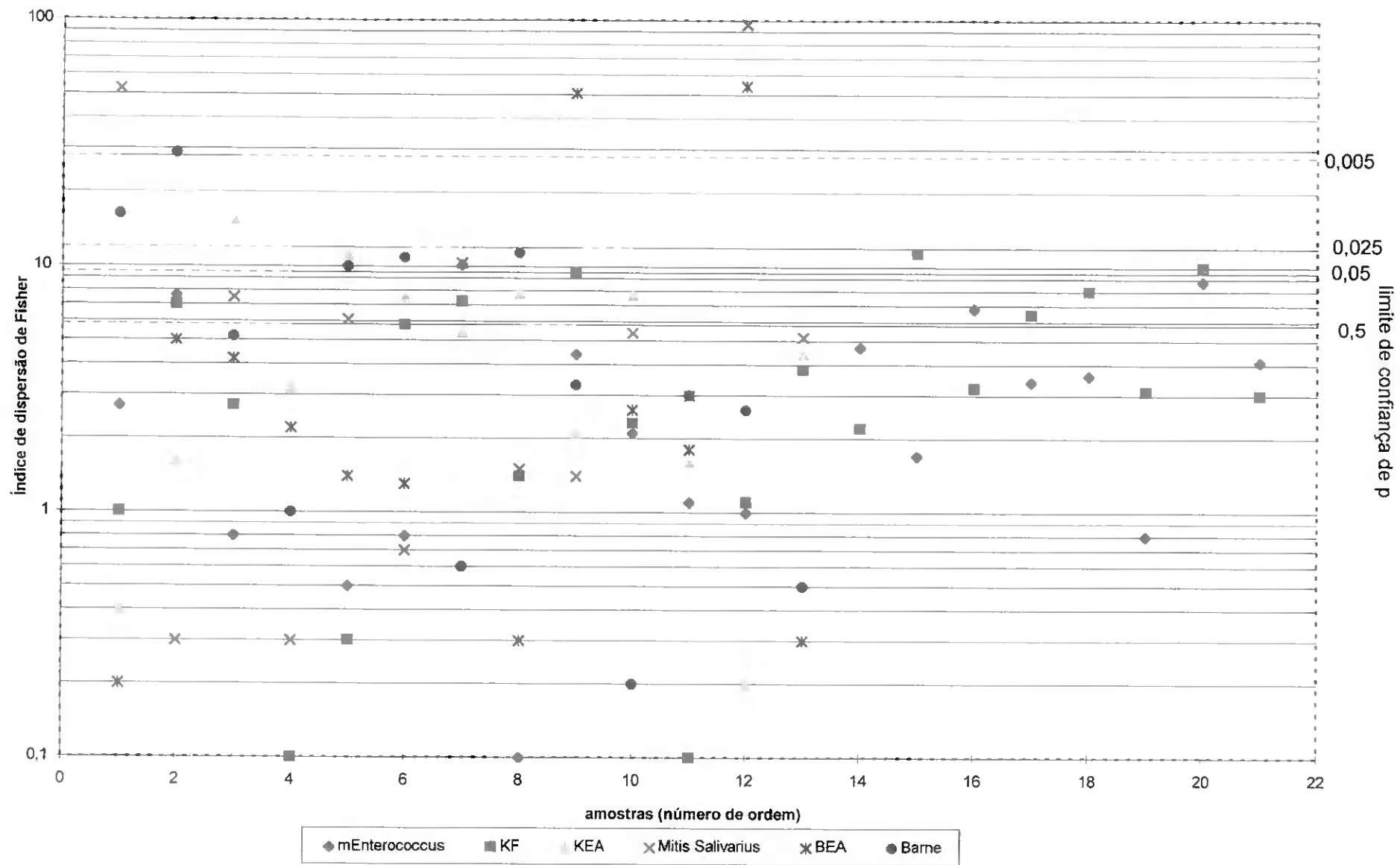


Figura 19. Precisão dos diferentes meios selectivos estimada a partir dos valores D^2 de dispersão de Fisher

boa precisão para o meio BÍlis Esculina Azida, apesar de duas amostras apresentarem valores de D^2 que ultrapassam os níveis de confiança para $p=0,005$. O meio basal de Barne e o agar KF apresentaram os piores resultados no que respeita à precisão.

2.6 . Exactidão

Os resultados da recuperação das 3 estirpes (*Streptococcus equinus* sobrevive muito pouco tempo nas suspensões), encontram-se registados nas Tabelas 58 e 59. Todos os meios testados apresentaram percentagens de recuperação elevadas, para as suspensões bacterianas em água do mar, com intervalos de recuperação médios entre 74,85 (para o agar KF com o *Streptococcus mitis*) a 116,3% (para o agar mEnterococcus com *Enterococcus faecalis*). Por outro lado, para as suspensões em água doce, as percentagens médias de recuperação variaram de 66,7% (para o meio BEA com *Streptococcus mitis*) a 111,7% (para o agar KF com *Enterococcus faecium*).

Obtiveram-se diferenças significativas ($p<0,005$) para todos os meios, das suspensões em água doce, na recuperação das estirpes de *Enterococcus* versus estirpes de *Streptococcus*. Para as suspensões em água do mar, verificou-se o mesmo para todos os meios, exceptuando para o agar KEA.

A ordenação dos meios comparados neste teste de exactidão, para as suspensões de água do mar e água doce é a que se segue: agar mEnterococcus (90,9%), agar KF (89,9%), agar BEA (84,3%), e agar KEA (81,3%).

3. SOBREVIVÊNCIA DE INDICADORES DE CONTAMINAÇÃO FECAL NO MEIO AMBIENTE AQUÁTICO - ESTUDO EM LABORATÓRIO

As Figuras 20A a 20H traduzem os resultados obtidos, em laboratório, sobre a cinética de desaparecimento de diferentes grupos de microrganismos incluindo bactérias e bacteriófagos ao serem descarregados de águas residuais para o ambiente marinho. Todos os microrganismos estudados revelaram uma inactivação com o

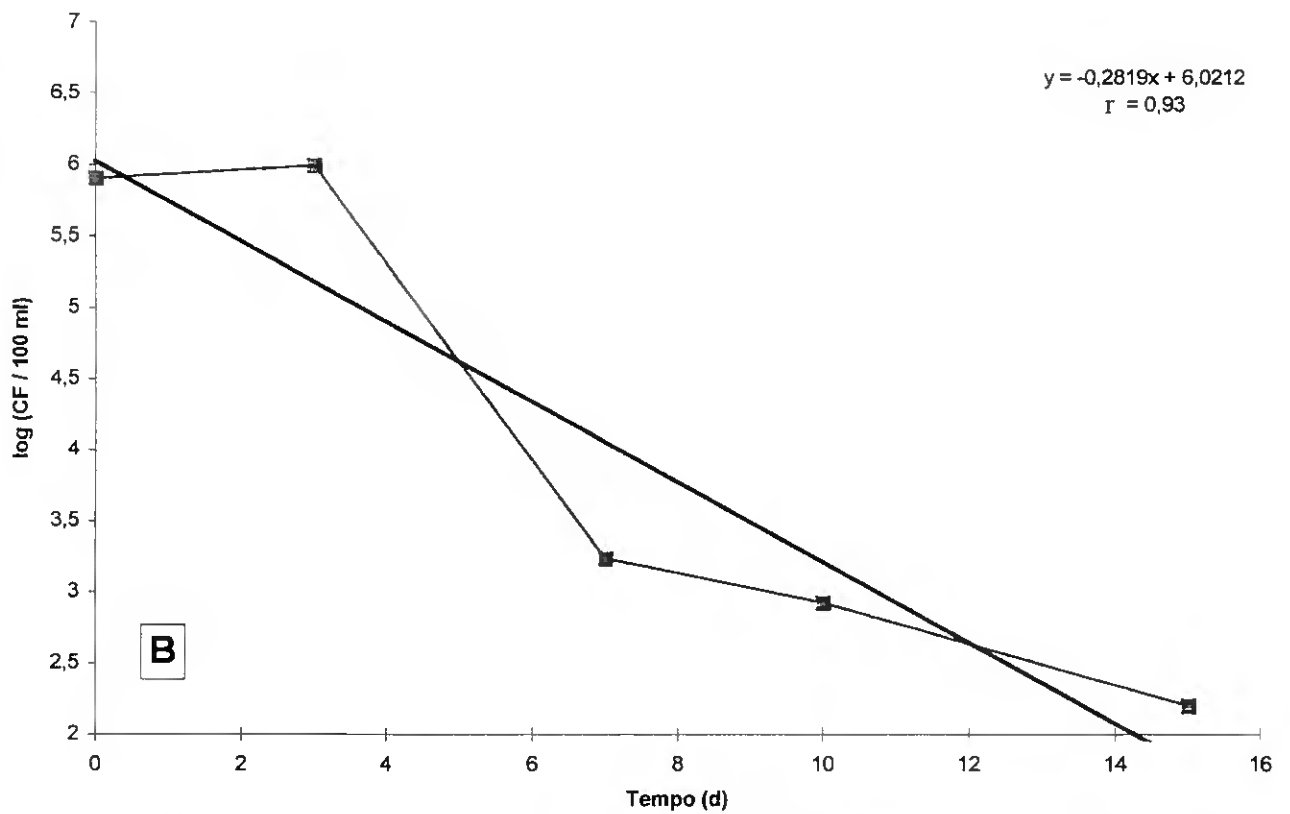
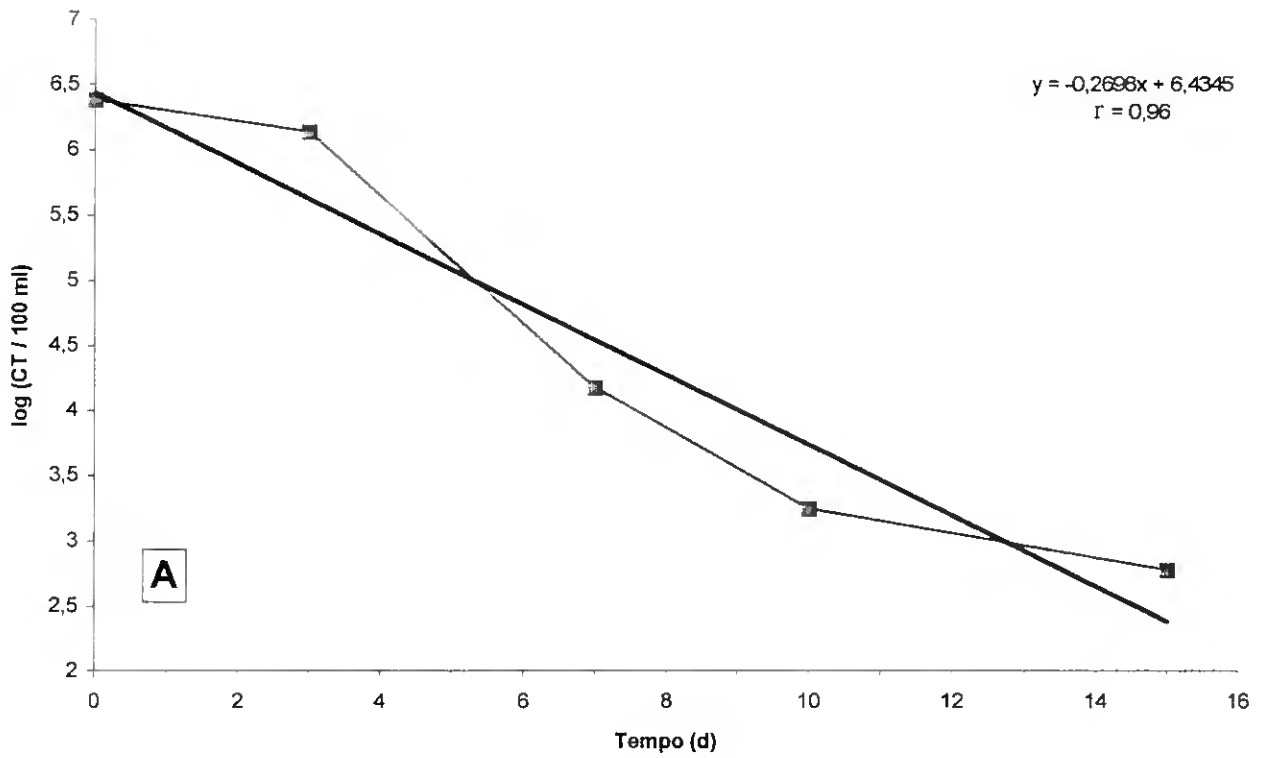


Figura 20. Inativação de coliformes totais (A) e coliformes fecais (B) em águas marinhas sob condições de laboratório

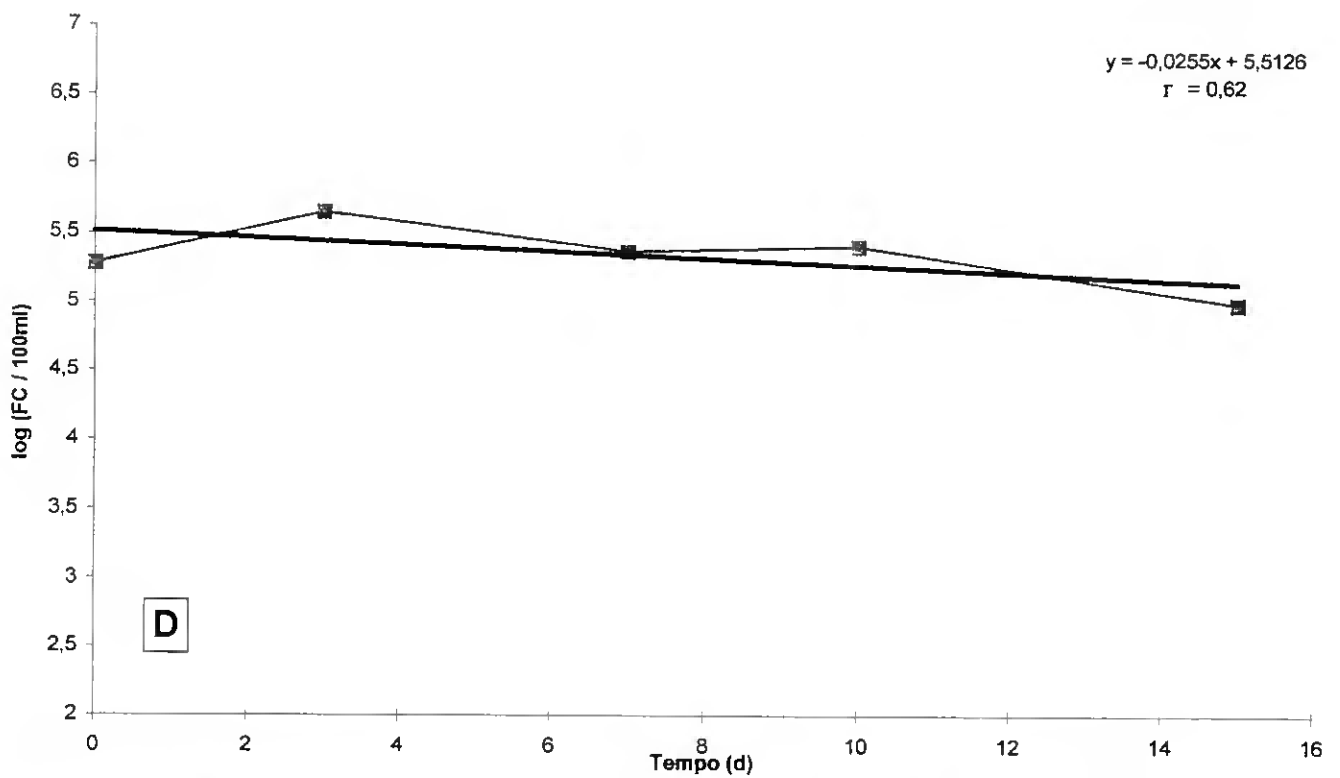
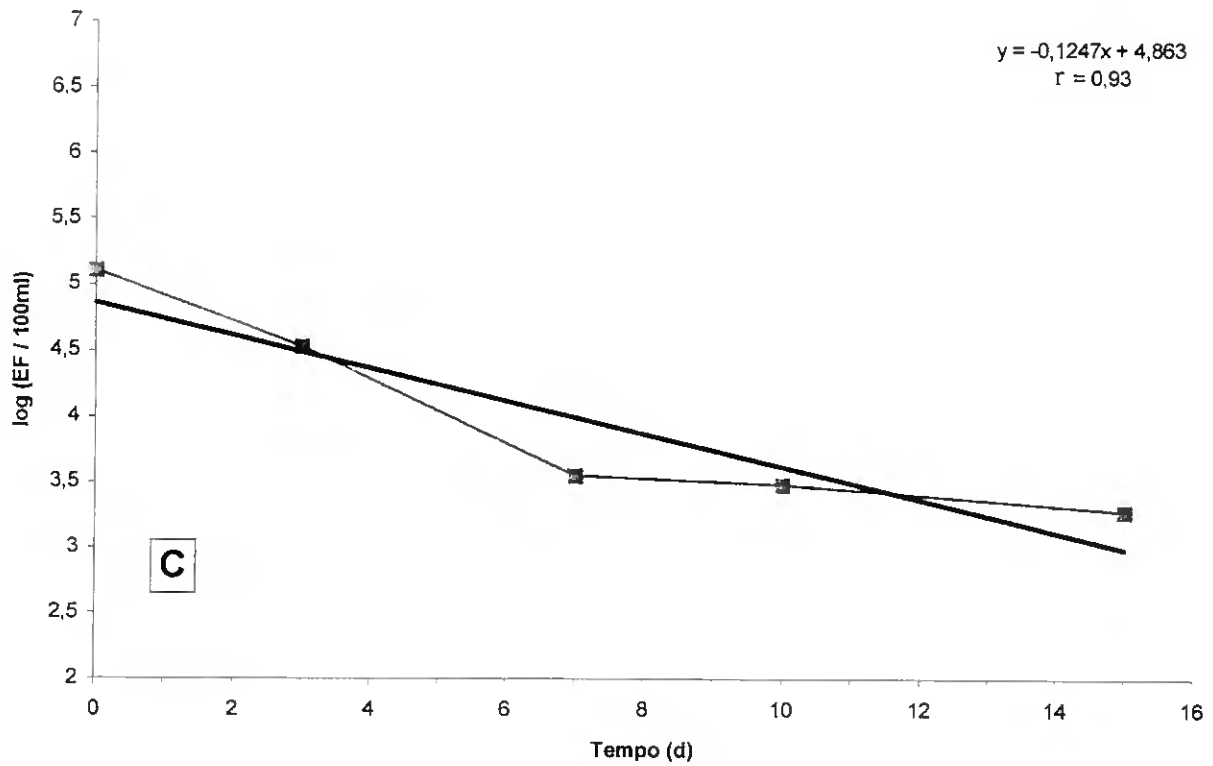


Figura 20. Inativação de estreptococos fecais (C) e colifagos C (D) em águas marinhas sob condições de laboratório

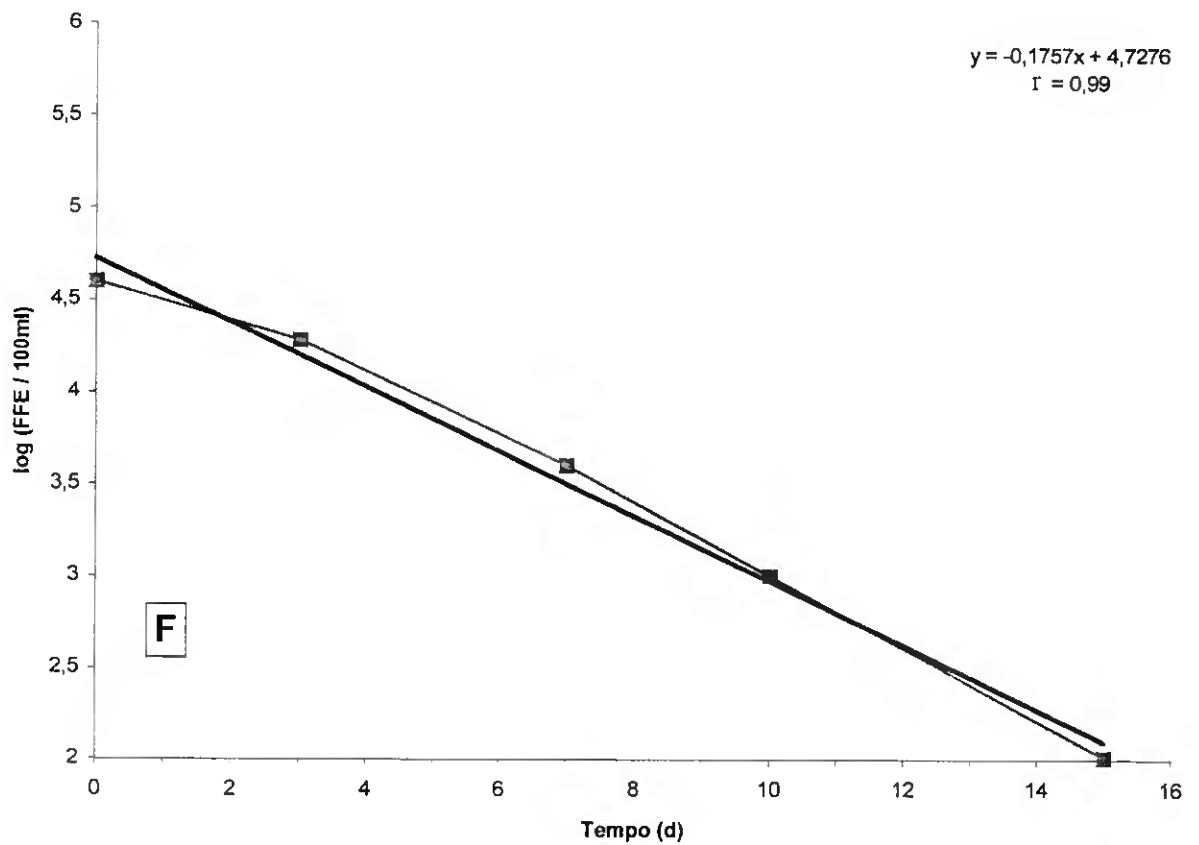
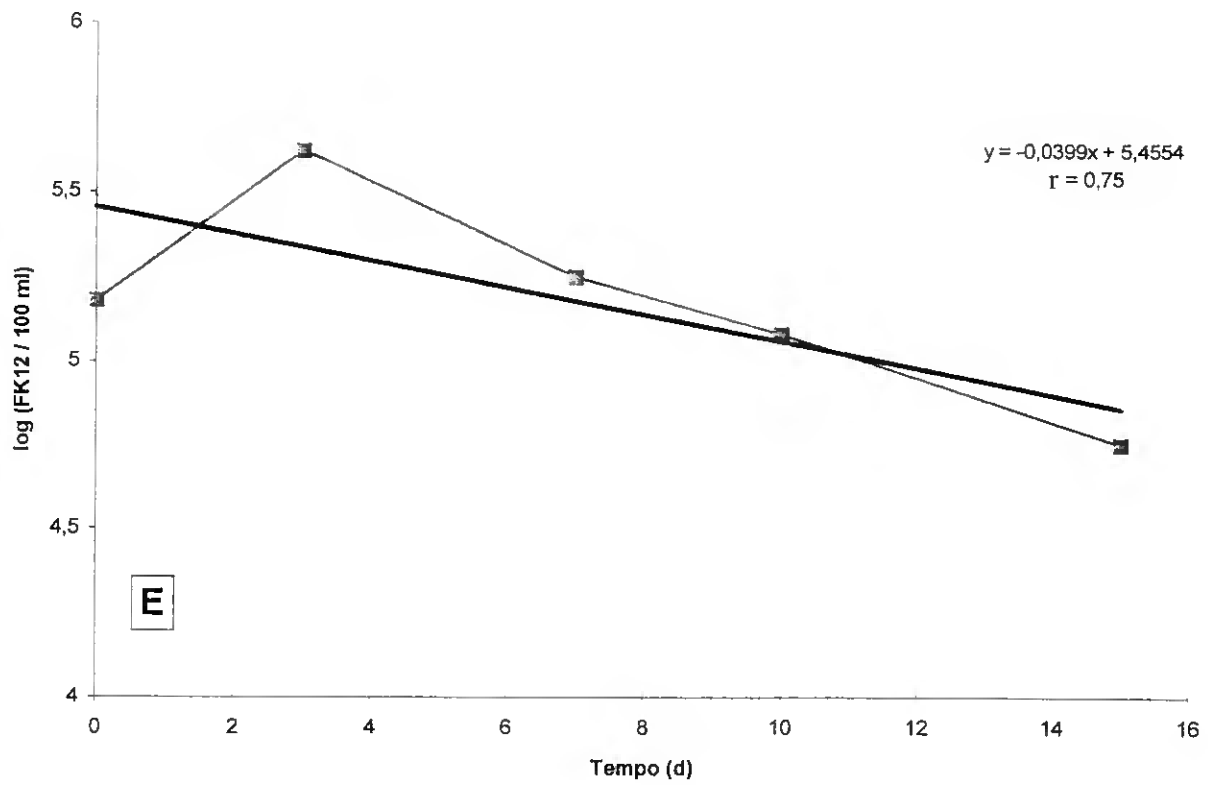


Figura 20. Inativação de colifagos K12 (E) e fagos F-específicos (F) em águas marinhas sob condições de laboratório

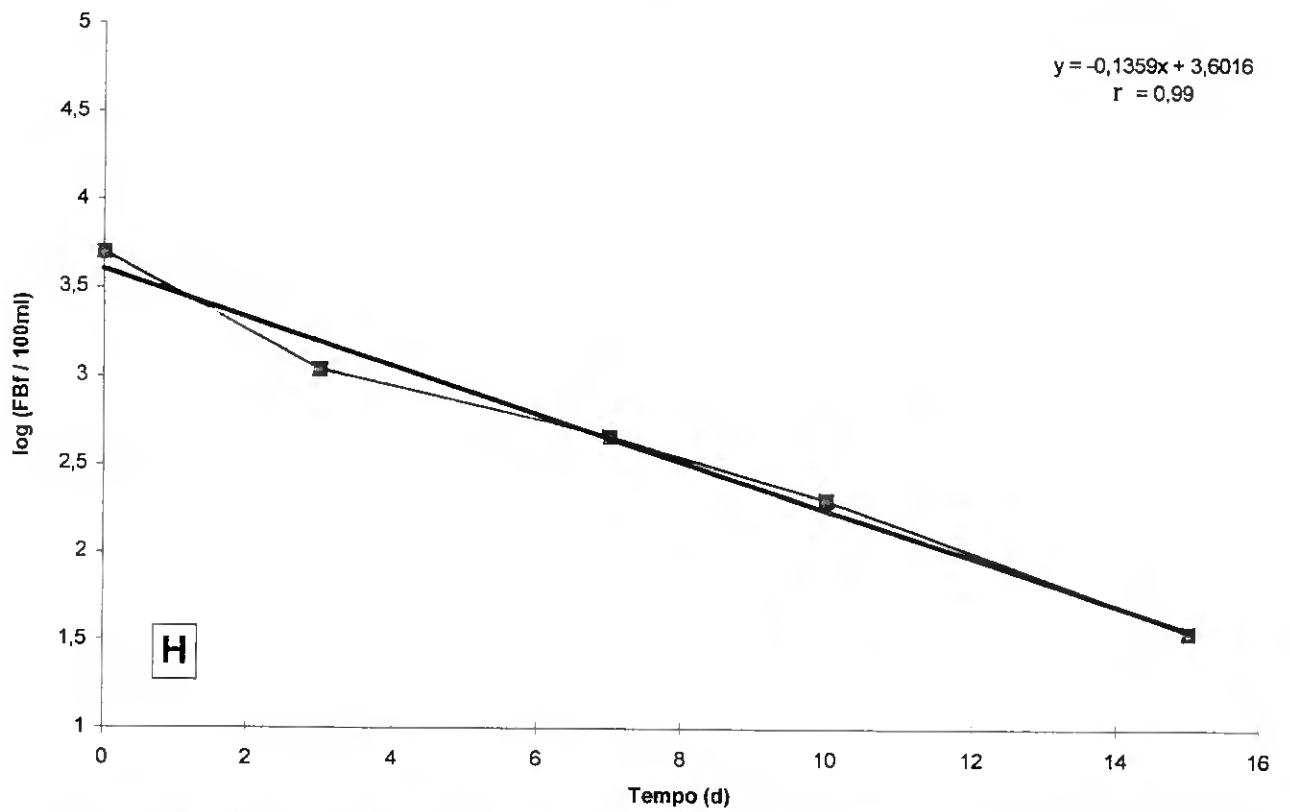
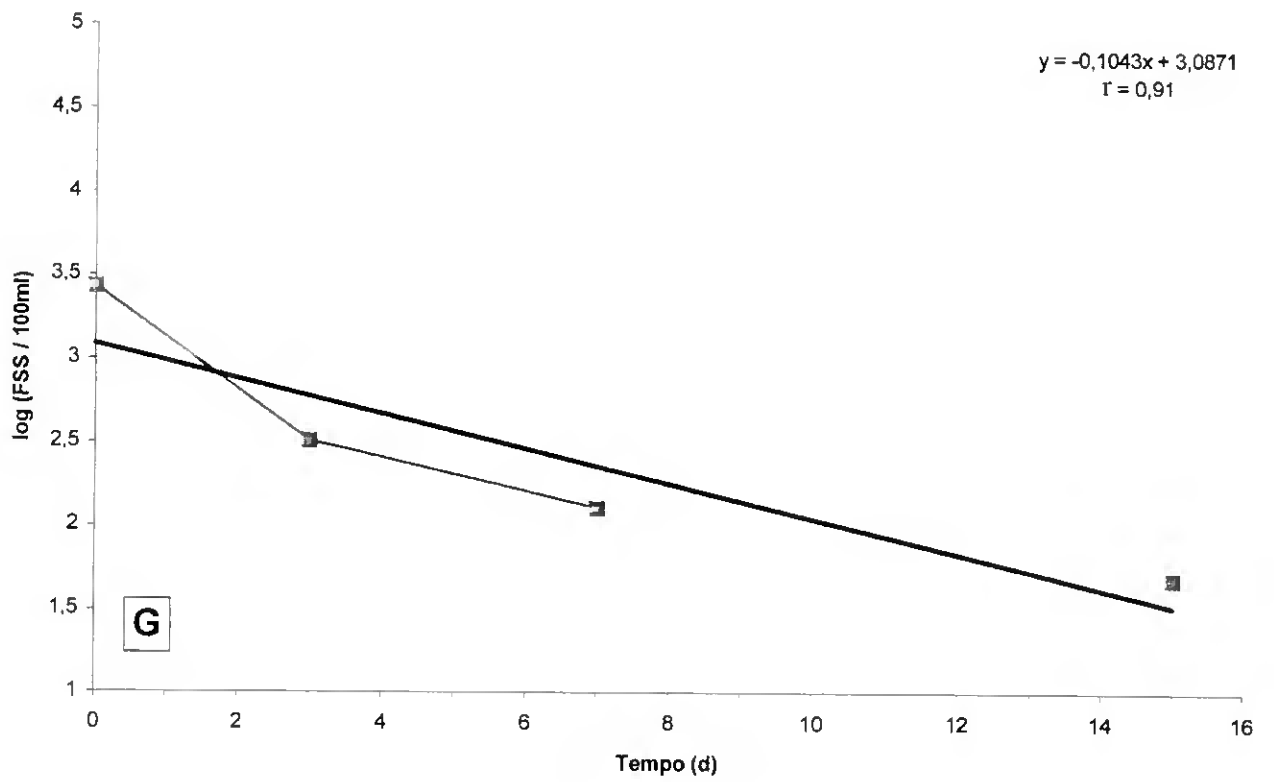


Figura 20. Inativação de fagos somáticos de *Salmonella* (G) e fagos somáticos de *Bacteroides fragilis* (H) em águas marinhas sob condições de laboratório

TABELA 57. Comparação da eficiência de diferentes meios de cultura e procedimentos para o isolamento de estreptococos fecais em amostras de água do mar

Meio de cultura	Amostras (nº).													Média
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
m Enterococcus	84,4 ^a	80,9	100	75,1	73,4	93,3	100	100	100	87,4	72,4	91,0	43,0	84,7
KF	70,2	81,8	51,7	100	48,6	47,6	98,5	68,7	83,2	84,8	54,6	81,4	40,4	70,1
BEA	100	58,2	57,0	84,0	37,3	27,1	34,7	87,5	55,4	97,4	68,3	17,1	42,7	59,0
KEA	77,9	63,9	99,4	68,0	46,2	36,7	89,7	68,7	80,8	78,7	47,5	49,0	50,3	65,9
Barne's	97,9	19,5	69,1	94,1	50,6	56,2	90,9	75,8	82,4	100	58,4	58,0	74,6	71,3
Rothe-Litsky	60,1	100	86,1	36,9	100	100	58,4	73,7	53,4	86,5	100	100	100	81,2

^a A percentagem relativa de recuperação foi obtida aplicando a seguinte equação:

$$\text{Percentagem relativa de recuperação (meio A)} = \left[\frac{\text{Contagem no meio A}}{\text{Contagem máxima num determinado meio de cultura}} \right] \times 100$$

TABELA 58. Recuperação relativa em meios de cultura selectivos de diversas culturas puras de estreptococos fecais em suspensão em água do mar filtrada

Meio de cultura	Percentagem de recuperação relativa da estirpe ^a											
	<i>E. faecium</i> ATCC 105431 sob tensão em (h)				<i>E. faecalis</i> ATCC 8213 sob tensão em (h)				<i>S. mitis</i> CECT 804 sob tensão em (h)			
	0	6	24	média	0	6	24	média	0	6	24	média
m Enterococcus	79,4 ^b	96,2	92,1	89,2	115,6	96,2	137,2	116,3	76,6	81,1	81,0	79,6
KF	90,1	90,1	124,7	101,6	107,8	99,6	51,6	86,3	76,6	72,7	75,1	74,8
BEA	78,1	77,8	93,2	83,0	100,3	99,7	144,0	114,7	73,8	80,8	75,7	76,8
KEA	79,3	80,8	86,5	82,2	89,1	85,1	78,2	84,1	85,1	88,0	84,1	85,7

^a Percentagem relativa de recuperação = (número médio de colónias contadas em meios selectivos / número médio de colónias contadas em meios de referência) x 100.

^b Média de três experiências diferentes feitas em quintuplicado

O termo sob tensão corresponde à palavra inglesa "stressed".

TABELA 59. Recuperação relativa, em meios selectivos de culturas puras de estreptococos fecais em suspensão em água doce.

Meio de cultura	Percentagem relativa de recuperação da estirpe ^a											
	<i>E. faecium</i> ATCC 105431 sob tensão em (h)				<i>E. faecalis</i> ATCC 8213 sob tensão em (h)				<i>S. mitis</i> CECT 804 sob tensão em (h)			
	0	6	24	Média	0	6	24	Média	0	6	24	Média
m Enterococcus80,3 ^b	84,2	105,5	90,0		80,1	68,7	140,3	96,4	82,2	61,2	79,4	74,3
KF	107,1	93,1	135,0	111,7	92,1	98,5	99,6	96,7	69,6	53,8	81,4	68,3
BEA	79,6	84,9	127,1	97,2	67,4	61,6	72,8	67,3	81,1	52,2	66,7	66,7
KEA	79,1	84,5	98,5	87,4	70,8	76,0	84,6	77,2	76,7	71,6	65,8	71,3

^a Percentagem relativa de recuperação = (número médio de colónias contadas em meios selectivos / número médio de colónias contadas em meios de referência) x 100.

^b Média de três experiências diferentes feitas em quintuplicado

O termo sob tensão corresponde à palavra inglesa "stressed".

decorrer do tempo de experimentação. Os coliformes fecais e totais apresentam a menor sobrevivência. Por outro lado os estreptococos fecais apresentam uma dinâmica de inativação mais relacionada com a dos bacteriófagos, com exceção para os colifagos C e K12. Estes últimos microrganismos não apresentaram uma inativação significativa ($T_{90} > 15$ d). Os bacteriófagos F-específicos foram, dentro deste grupo de microrganismos, os que apresentaram uma taxa de desaparecimento maior ($T_{90}=5,7$ d).

Tabela 60. Valores dos parâmetros T_{90} (d) das bactérias indicadoras e bacteriófagos obtidos nas experiências de sobrevivência no laboratório.

Parâmetro	T_{90} (labor.)
Coliformes totais	3,7
Coliformes fecais	3,6
Estreptococos fecais	8,0
Colifagos C	>15
Colifagos K12	>15
Fagos F ⁺ específicos	5,7
Fagos somáticos de <i>Salmonella</i>	9,6
Fagos de <i>Bacteroides</i>	7,3

4. POLUIÇÃO MICROBIOLÓGICA EM MOLUSCOS

De forma a obter pelo menos uma amostra de cada estação do ano, foram colhidas 10 amostras de mexilhão da espécie *Mytilus edulis*; 5 na estação Ilha e as restantes 5 na Ponte Cais.

4.1. Microrganismos indicadores

Nas amostras de água e mexilhão que foram colhidas na mesma altura e local, verifica-se em relação aos microrganismos indicadores (coliformes totais, coliformes fecais, e estreptococos fecais), uma percentagem de detecção de 100 %, tendo estes microrganismos alcançado concentrações conforme se pode verificar pela Tabela 61 e Figura 21.

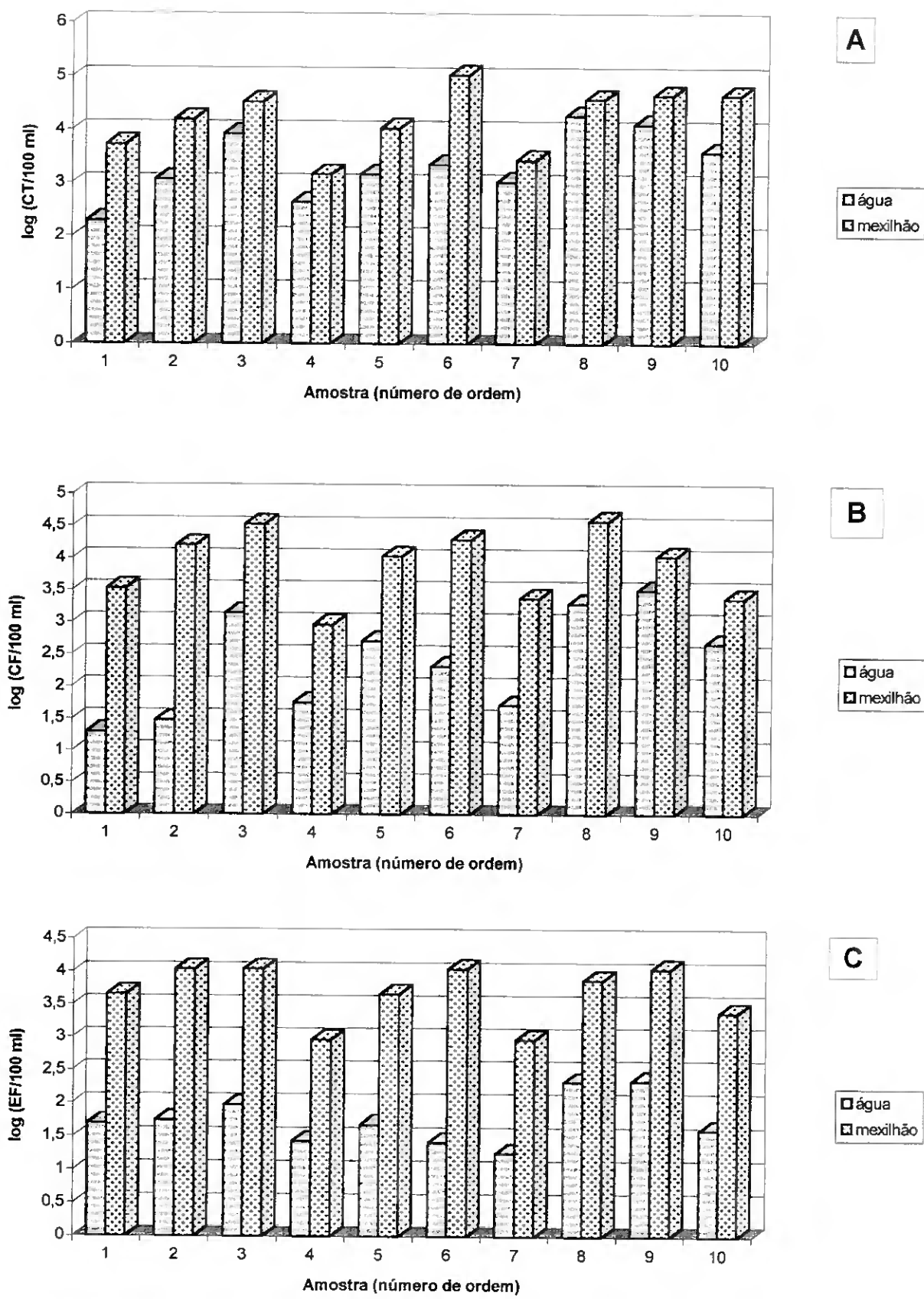


Figura 21. Microrganismos indicadores em água e em mexilhão. Coliformes totais (A), coliformes fecais (B) e estreptococos fecais.

Tabela 61. Coliformes e estreptococos fecais em amostras de água, mexilhão (*Mytilus edulis*) e factor de concentração.

PARÂMETROS	ÁGUA (x10 ²)			MEXILHÃO (x10 ³)			FACTOR DE CONCENTRAÇÃO		
	$\chi \pm s$ (n=10)	Máximo	Mínimo	$\chi \pm s$ (n=10)	Máximo	Mínimo	$\chi \pm s$ (n=10)	Máximo	Mínimo
Coliformes totais	51,45 ± 63,89	190,00	2,00	31,26 ± 32,85	110,00	1,50	12,26 ± 14,66	47,83	2,05
Coliformes fecais	7,97 ± 10,75	32,00	0,20	14,11 ± 13,61	39,00	0,93	94,20 ± 164,03	536,33	3,44
Estreptococos fecais	0,79 ± 0,75	2,20	0,18	6,50 ± 4,32	11,00	0,93	115,50 ± 118,54	423,08	34,44

χ - média

s - desvio-padrão

Pela leitura da Tabela 61, constata-se que a maior concentração média é atingida pelos coliformes totais, quer para as amostras de água, quer para as de mexilhão. O factor de concentração foi calculado conforme descrito por Cabelli e Heffernan (1970). O factor de concentração é maior para os estreptococos fecais.

A razão entre os coliformes totais e os estreptococos fecais é menor para as amostras de mexilhão, devido à abundância relativa destes últimos.

Em relação à variabilidade dos resultados, os coeficientes de variação (CV), obtidos para os três parâmetros microbiológicos pesquisados em amostras de mexilhão foram inferiores aos obtidos para os mesmos parâmetros analisados em amostras de água (Tabela 62).

Tabela 62. Coeficiente de variação obtido para as amostras de água e de mexilhão.

Amostra	Coliformes totais	Coliformes fecais	Estreptococos fecais
Água	1,24	1,35	0,95
Mexilhão	1,05	0,92	0,66

Através da utilização do teste da análise de variância (ANOVA) verifica-se que existem para os parâmetros microbiológicos testados (coliformes totais, coliformes fecais, estreptococos fecais), diferenças significativas entre as médias dos resultados obtidos através das análises de mexilhão e as da água. Os dados foram previamente transformados logaritmicamente para assegurar a normalidade da distribuição (Tabela 63).

Tabela 63. Análise de variância (ANOVA) da densidade microbiana (\log_{10}) em amostras de água e mexilhão.

Estatísticos	Coliformes totais	Coliformes fecais	Estreptococos fecais
Soma dos Quadrados	3,66	11,98	18,45
Graus de Liberdade	1	1	1
Coeficiente F	9,57	26,44	115,73
F Crítico	4,41	4,41	4,41

4.2. Microrganismos patogénicos

Salmonella foi o microrganismo patogénico pesquisado, quer em amostras de água quer de mexilhão.

A percentagem de detecção observada foi de 10% para as amostras de água, e 30% para as amostras de mexilhão. Somente numa única amostragem foi isolada *Salmonella* em ambas as amostras, embora pertencentes a diferentes serotipos.

Salmonella saintpaul e *Salmonella senftenberg* foram as espécies isoladas, respectivamente na amostra de água e de mexilhão. Em termos quantitativos (NMP/100 ml) os valores obtidos foram de 64 bactérias para a amostra de água e 93 para as três amostras de mexilhão. *Salmonella worthington* foi também isolada numa amostra de molusco.

5. MONITORIZAÇÃO

5.1. Qualidade microbiológica

5.1.1. Distribuições de frequências e parâmetros de qualidade microbiológica

A distribuição log-normal é uma distribuição de probabilidades muito adequada para o estudo da qualidade microbiológica (El-Shaarawi e Pipes, 1982; WHO, 1994). A aplicação deste modelo é adequado quando o número de amostras é superior a 6, sendo no entanto preferível que seja superior a 10 (Mujeriego et al., 1980a).

Foi efectuada uma análise gráfica dos logaritmos das concentrações dos microrganismos indicadores, coliformes totais, coliformes fecais e estreptococos fecais, usando «rankits», de acordo com o procedimento descrito por Sokal e Rohlf (1981). Os gráficos que permitem testar a normalidade da distribuição de frequência referente a cada um dos três indicadores bacteriológicos de contaminação fecal e estimar os seus

parâmetros, encontram-se reflectidos nas Figuras 22 a 30. Os valores dos «rankits» que se situaram fora do intervalo compreendido entre -1,5 a +1,5 não foram considerados para traçar a recta (Sokal e Rohlf, 1981). Estes valores estão representados como série 2 nas Figuras 22 a 30.

As Tabelas 64 e 65 reflectem a variação espacial das concentrações médias (expressas em logaritmos decimais), dos três indicadores bacterianos e os valores do desvio-padrão da distribuição de frequências lognormal.

Tabela 64. Qualidade microbiológica das águas estudadas, em função de coliformes totais (CT), coliformes fecais (CF) e estreptococos fecais (EF).

Microrganismo	Ilha	Portas do Mar	Ponte Cais
CT50	2,85	5,60	3,80
CT80	3,19	5,88	4,21
CT95	3,51	6,14	4,60
Desvio-padrão (s)	3,25	5,93	4,29
CF50	1,98	5,21	3,05
CF80	2,59	5,54	3,40
CF95	2,86	5,86	3,74
Desvio-padrão (s)	2,32	4,81	3,47
EF50	1,58	3,40	2,08
EF90	1,97	3,99	2,57
Desvio-padrão (s)	1,87	3,86	2,46

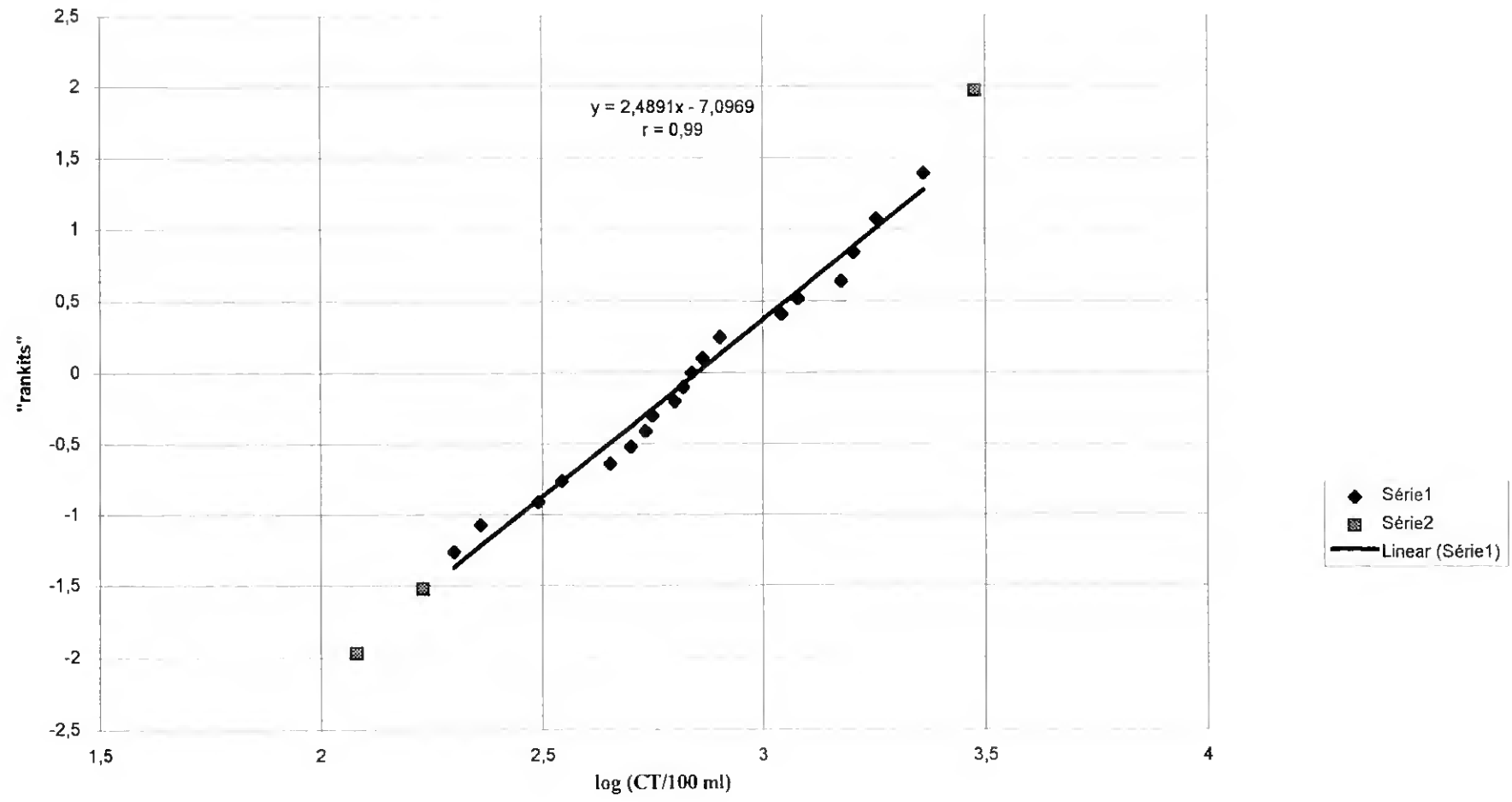


Figura 22. Distribuição lognormal das concentrações de coliformes totais na estação Ilha.

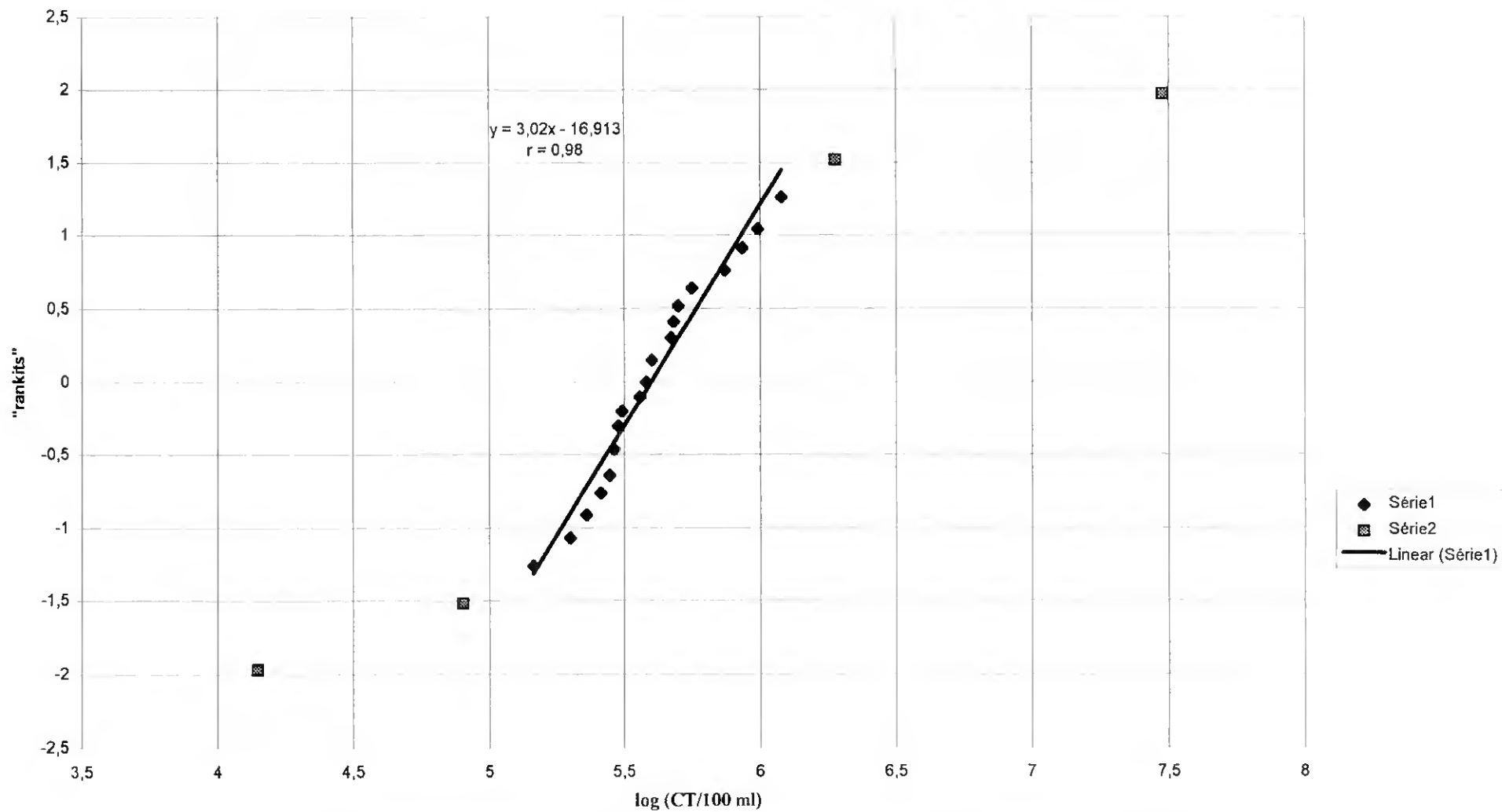


Figura 23. Distribuição lognormal das concentrações de coliformes totais na estação Portas do Mar.

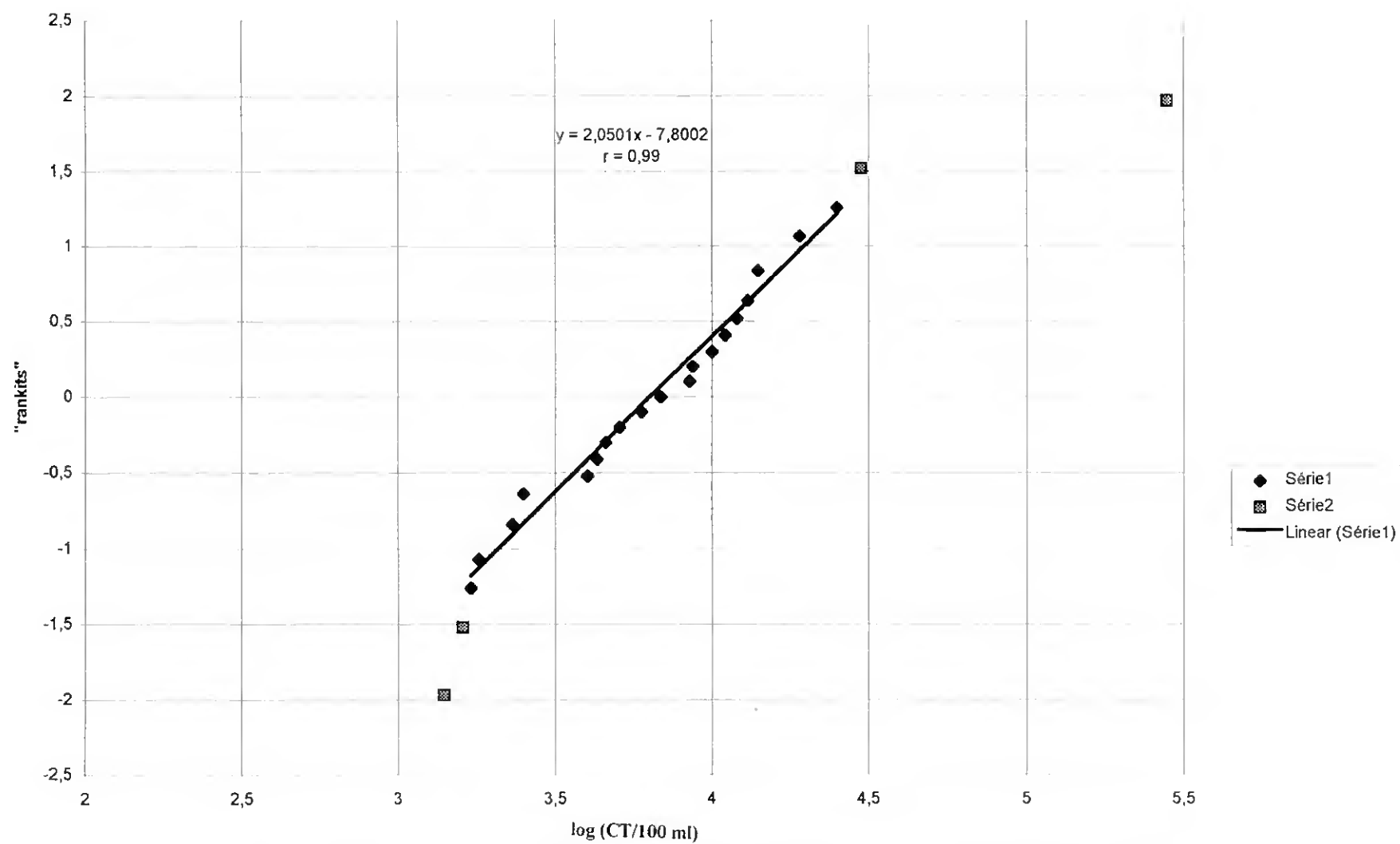


Figura 24. Distribuição lognormal das concentrações de coliformes totais na estação Ponte Cais.

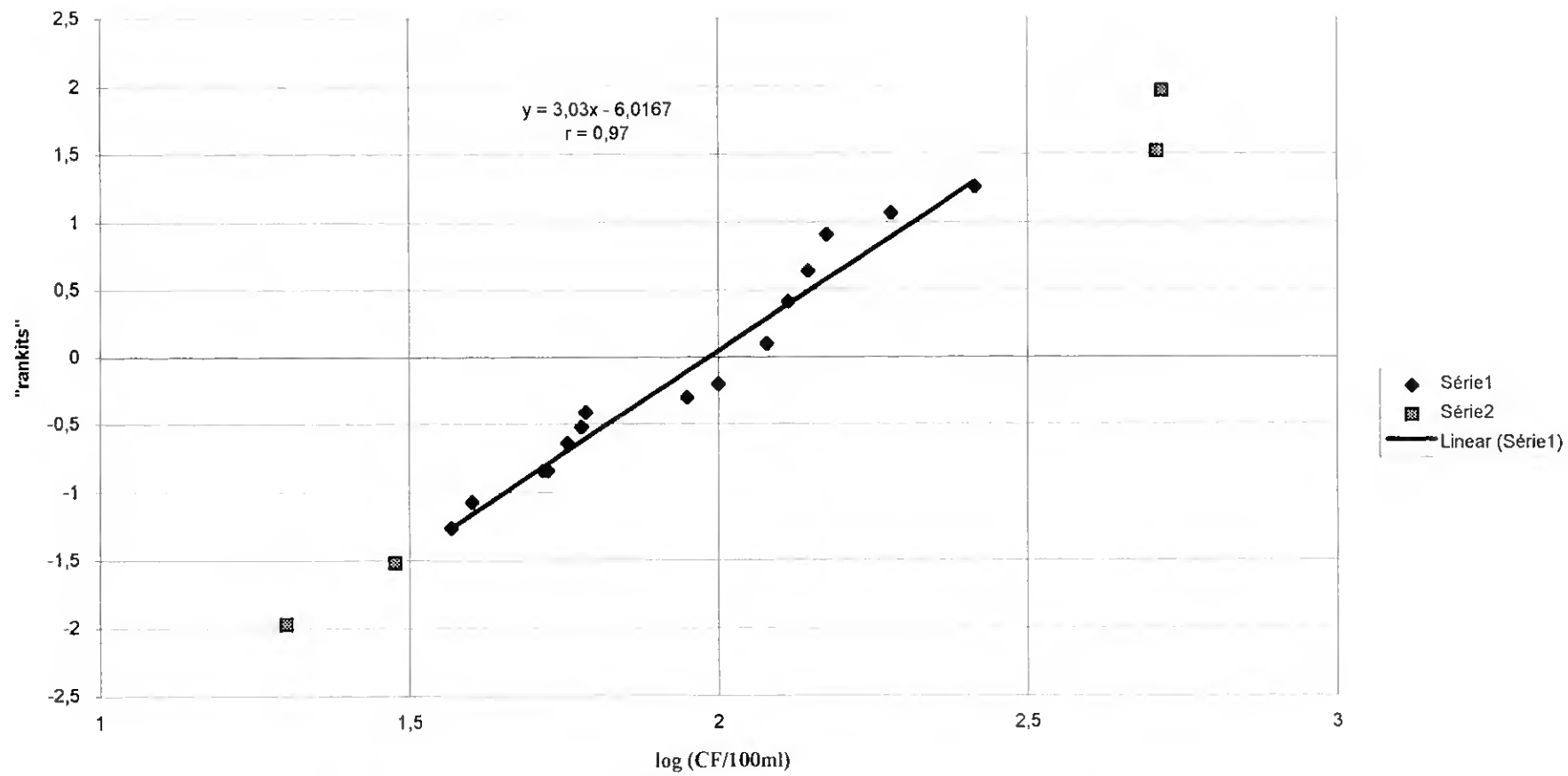


Figura 25. Distribuição lognormal das concentrações de coliformes fecais na estação Ilha.

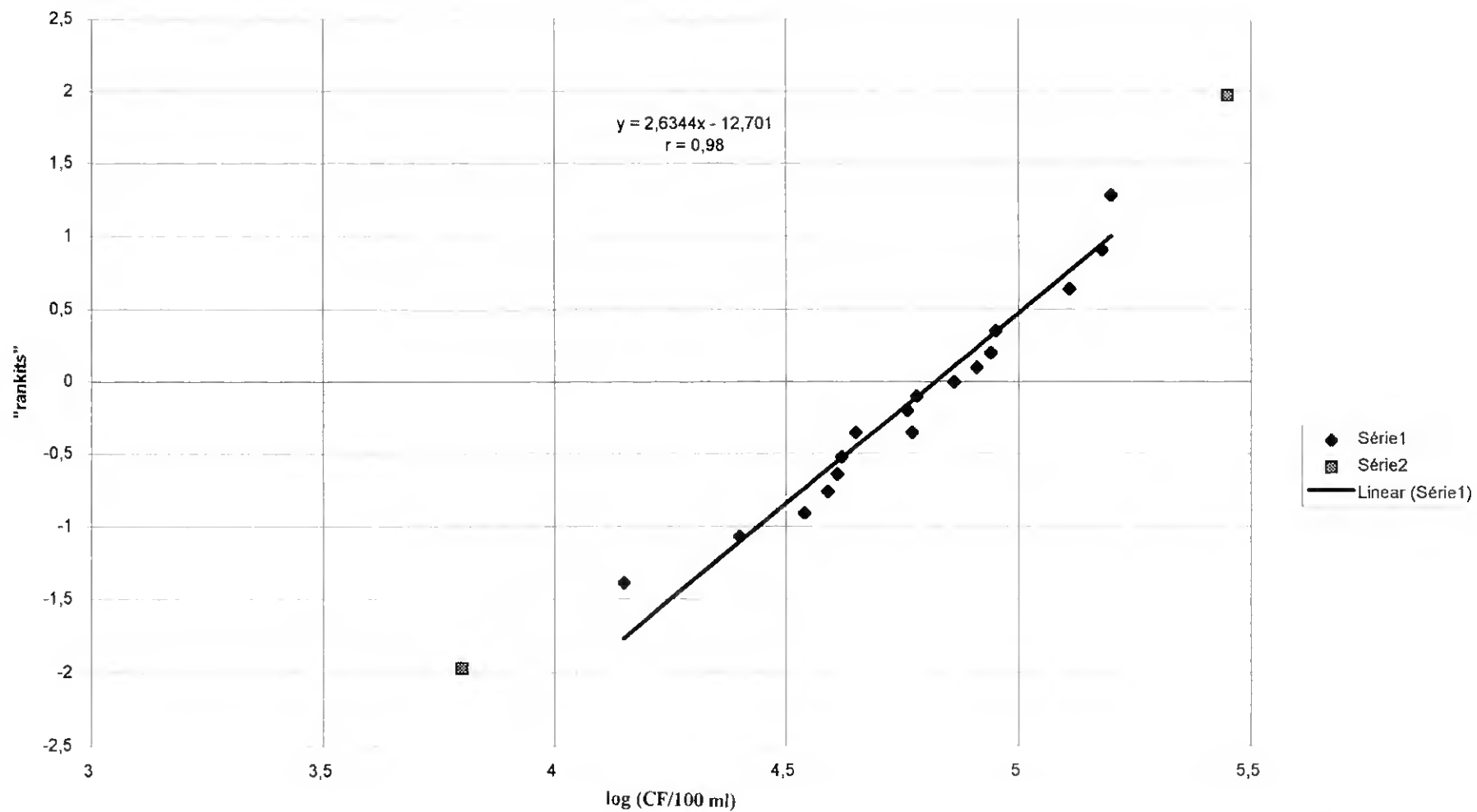


Figura 26. Distribuição lognormal das concentrações de coliformes fecais na estação Portas do Mar.

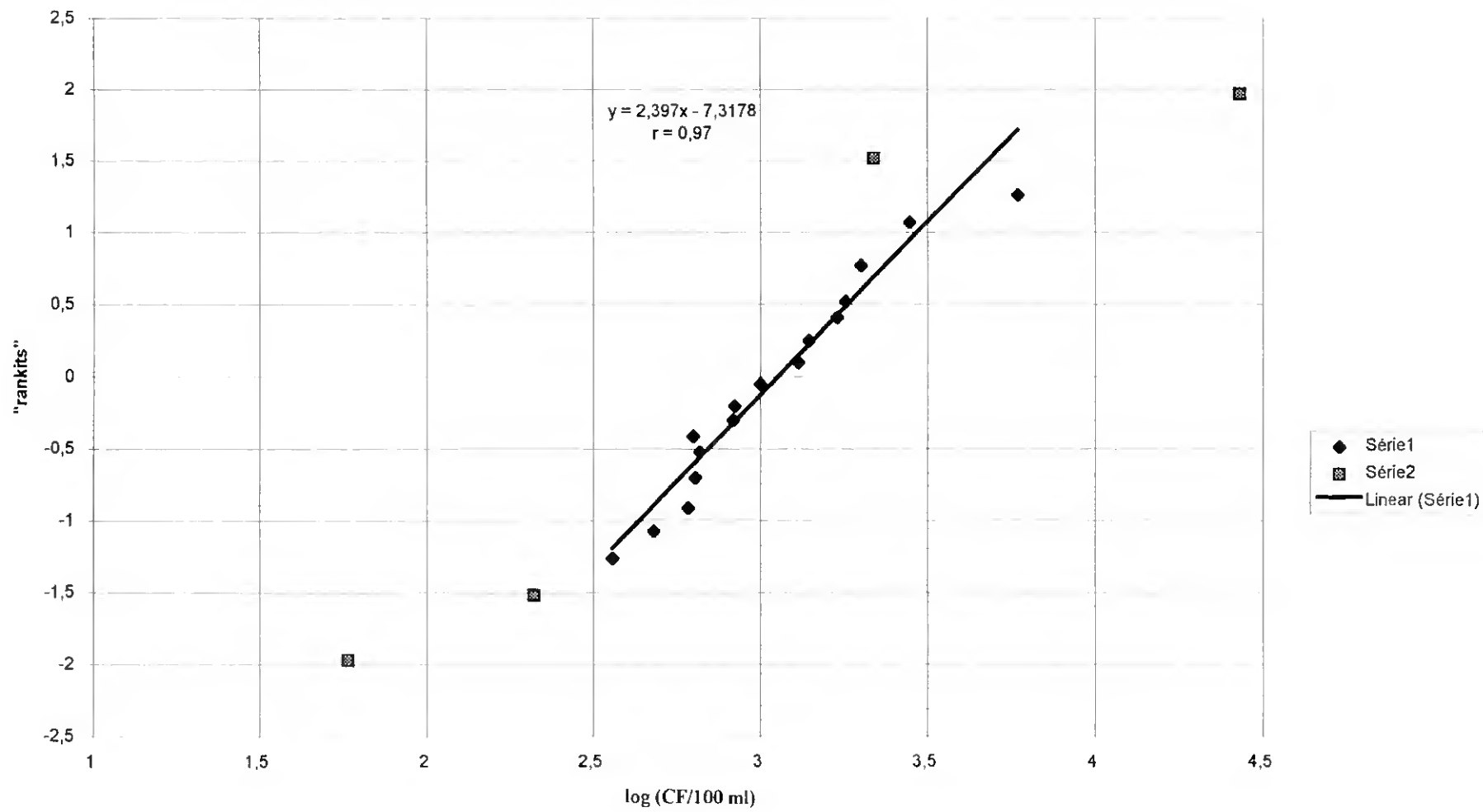


Figura 27. Distribuição lognormal das concentrações de coliformes fecais na estação Ponte de Cais.

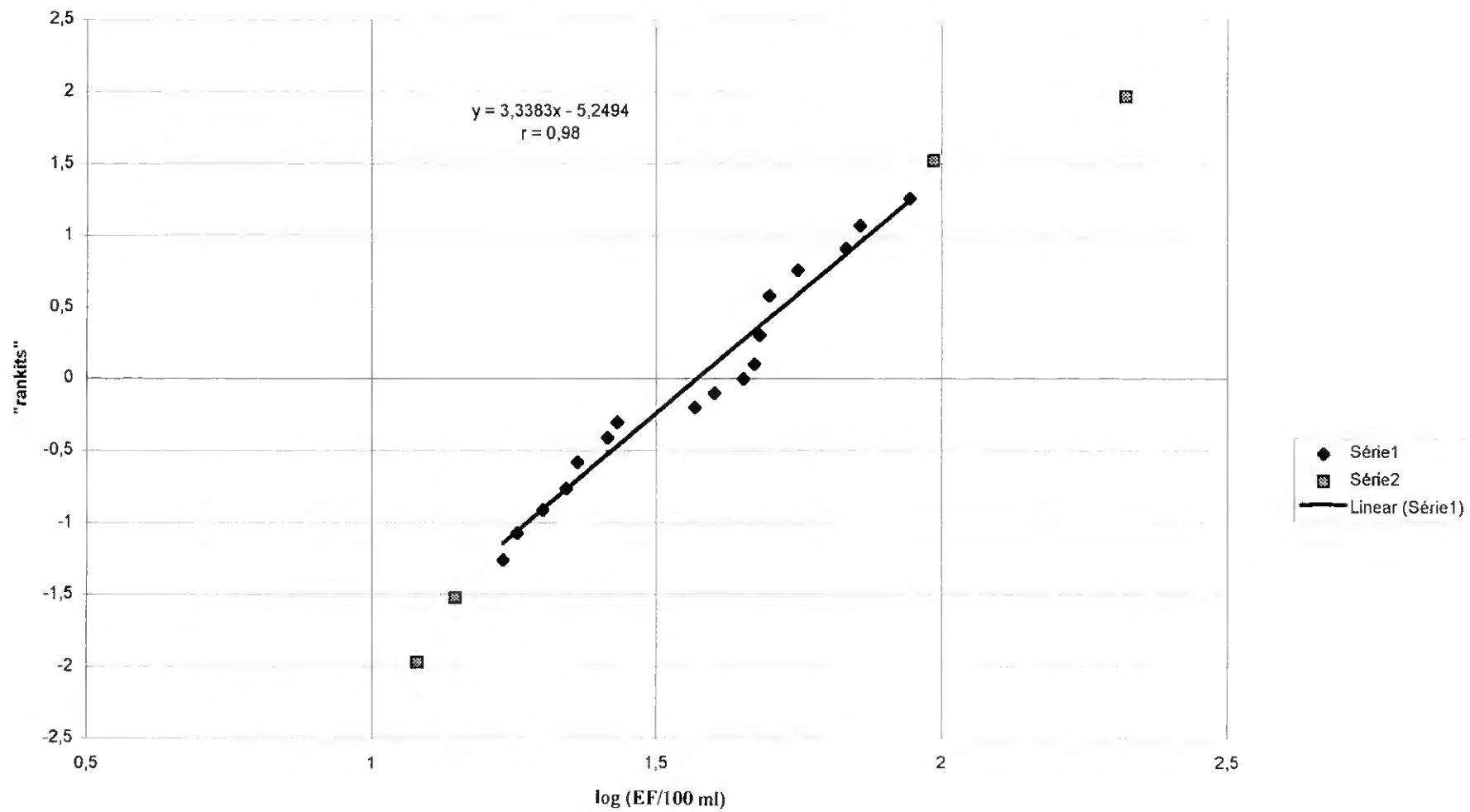


Figura 28. Distribuição lognormal das concentrações de estreptococos fecais na estação Ilha.

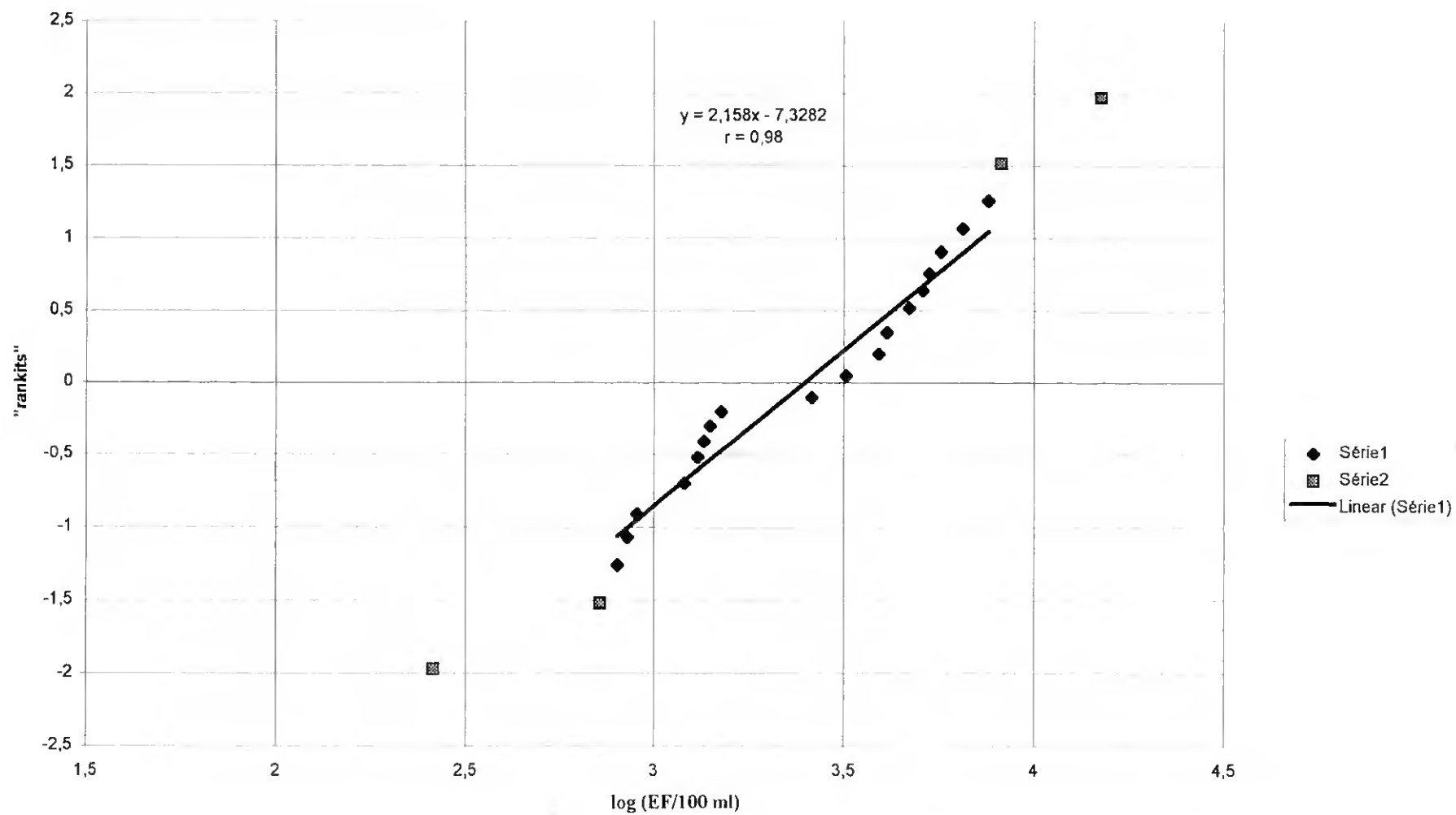


Figura 29. Distribuição lognormal das concentrações de estreptococos fecais na estação Portas do Mar.

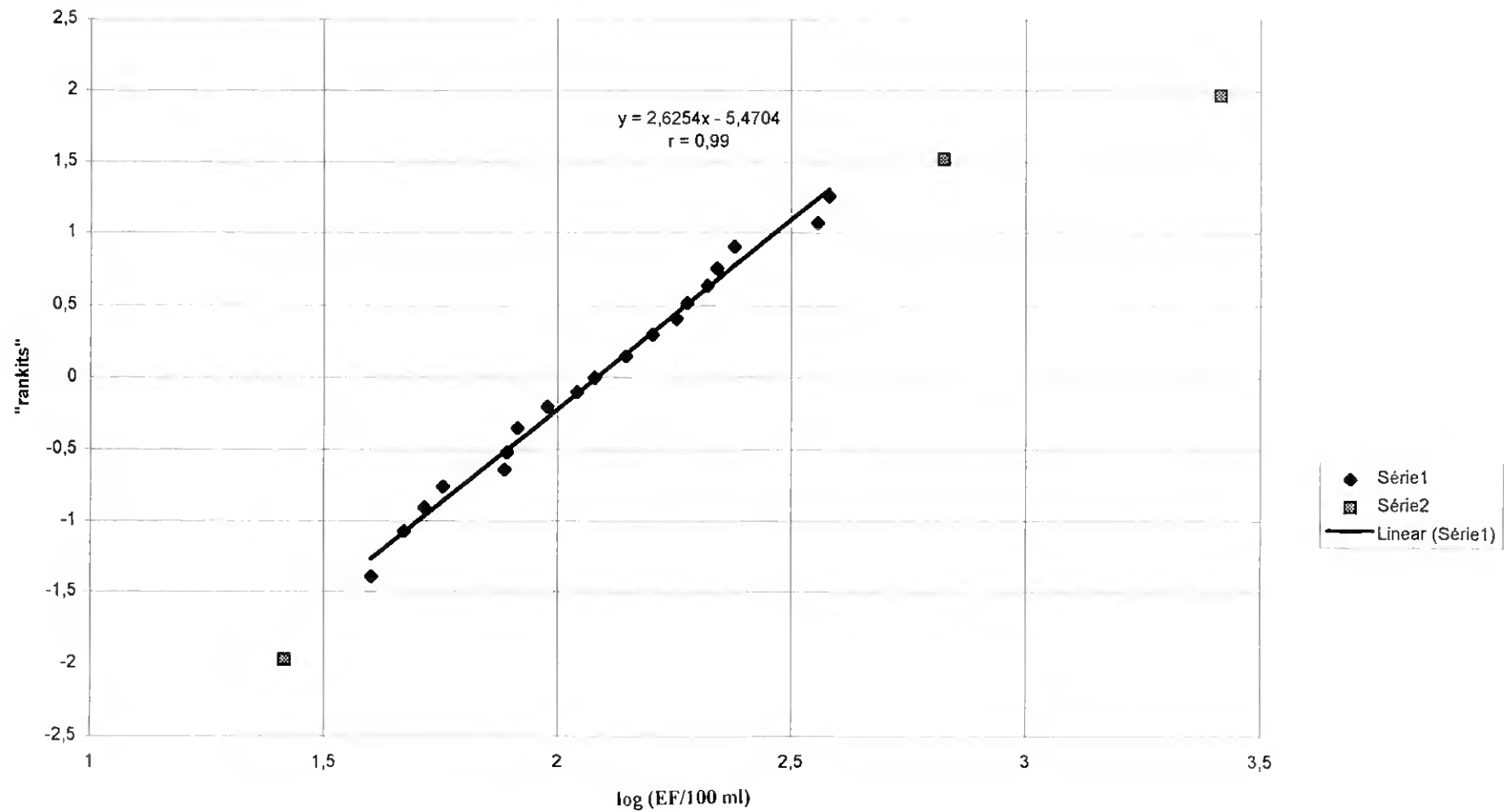


Figura 30. Distribuição lognormal das concentrações de estreptococos fecais na estação Ponte Cais.

Tabela 65. Distribuição relativa dos valores do desvio-padrão obtidos por aplicação do modelo probabilístico aos parâmetros microbiológicos registrados nas três estações de amostragem.

Microrganismo	Nº de estações	$s \leq 1$	$1 < s < 3$	$s \geq 3$
Coliformes totais	3	-	-	3 (100%)
Coliformes fecais	3	-	1 (33,33%)	2 (66,67%)
Streptococos fecais	3	-	2 (66,67%)	1 (33,33%)

Como se aprecia na Tabela 65, dependendo dos parâmetros indicadores considerados podem-se obter classificações diferentes da distribuição relativa dos valores de s . Assim para o parâmetro coliformes totais, todas as estações apresentam valores de $s \geq 3$, no entanto considerando os coliformes fecais e os estreptococos fecais há uma maior discriminação das estações de amostragem.

Em conformidade com Mujeriego et al. (1980a), valores do desvio-padrão inferiores ou iguais à unidade, $s \leq 1$, estão associados a estações de amostragem cujas águas apresentam uma qualidade excelente sob o ponto de vista microbiológico, ou então encontram-se localizadas na vizinhança de uma saída importante de águas residuais. Por outro lado valores de desvio-padrão iguais ou superiores a três, $s \geq 3$, estão ligados a estações de amostragem influenciadas por fontes poluidoras próximas, mas com descargas muito variáveis, ou situadas em zonas geográficas com interferências, nomeadamente correntes. Valores compreendidos entre um e três, $1 < s < 3$, estão associados ao comportamento geral que apresentam as estações de amostragem.

Considerando os resultados obtidos no presente trabalho, verifica-se que os valores do desvio-padrão obtidos para os parâmetros coliformes totais, coliformes fecais, estreptococos fecais foram superiores a três na estação Portas do Mar. A

estação Ponte Cais apresenta valores de desvio padrão superior a três para os coliformes fecais.

Os resultados que se apresentam na Tabela 66 foram calculados a partir dos valores da variância estimados pela distribuição lognormal e a partir dos gráficos representados pelas Figuras 22 a 30. Os limites de confiança foram calculados de acordo com o descrito por Sokal e Rohlf (1981).

Tabela 66. Qualidade microbiológica das águas nas três estações amostradas: intervalo de confiança do desvio-padrão ($\alpha = 0,05$).

Estação	CT	CF	EF
Ilha	$2,54 \leq s \leq 4,52$	$1,81 \leq s \leq 3,23$	$1,46 \leq s \leq 2,60$
Portas do Mar	$4,63 \leq s \leq 8,25$	$3,76 \leq s \leq 6,69$	$3,01 \leq s \leq 5,37$
Ponte Cais	$3,35 \leq s \leq 5,97$	$2,71 \leq s \leq 4,83$	$1,92 \leq s \leq 3,42$

n=25

Verifica-se que na estação Ilha os valores obtidos são inferiores ao valor 3,74 do desvio padrão característico das normas da Comunidade Europeia, também estimado por meio de uma distribuição normal logarítmica a partir dos limites numéricos de CT80 e CT95 ou CF80 e CF95 estabelecidos nessas normas. Os valores são no entanto superiores ao valor 1,80 do desvio padrão característico dos critérios de qualidade da WHO/UNEP, estimados igualmente através de uma distribuição lognormal a partir dos limites numéricos CF50 e CF90 desses critérios.

Os valores obtidos para a estação Portas do Mar foram sempre superiores quer a 1,80 quer a 3,74.

Para a estação Ponte Cais unicamente os estreptococos fecais apresentam um valor inferior a 3,74 embora maior que 1,80.

O intervalo de confiança da concentração microbiológica mediana (XX50), para uma dada estação de amostragem foi definida pelos seguintes limites:

$$\left| \text{antilog} \left(\log \text{XX50} - \frac{s}{\sqrt{n}} t_{1-\alpha/2, n-1} \right); \text{antilog} \left(\log \text{XX50} + \frac{s}{\sqrt{n}} t_{1-\alpha/2, n-1} \right) \right|$$

A Tabela 67 contém os valores obtidos para os intervalos de confiança de 95% da mediana de coliformes totais, coliformes fecais e estreptococos fecais.

Tabela 67. Qualidade microbiológica das águas nas três estações amostradas: intervalo de confiança de 95% da mediana.

Estação	Coliformes totais	Coliformes fecais	Estreptococos fecais
Ilha	$3,24 \times 10^4 - 1,55 \times 10^4$	$1,05 \times 10^3 - 8,70 \times 10^2$	$6,46 - 2,24 \times 10^2$
Portas do Mar	$1,41 \times 10^4 - 1,12 \times 10^8$	$1,68 \times 10^3 - 1,57 \times 10^7$	$6,46 \times 10 - 9,77 \times 10^4$
Ponte Cais	$1,08 \times 10^2 - 3,69 \times 10^3$	$4,17 \times 10 - 3,02 \times 10^4$	$1,15 \times 10 - 1,23 \times 10^3$

5.1.2. Índice de Contaminação Acumulada (I.C.A.)

No presente estudo aplicou-se também o Índice de Contaminação Acumulada (I.C.A.) (Borrego e Mariño, 1995), para avaliar a qualidade das águas amostradas durante o período de dois anos. O cálculo deste índice efectua-se atribuindo às amostras um valor arbitrário, que varia de 1 a 5, com base na concentração dos diferentes parâmetros microbiológicos (Tabela 68).

Tabela 68. Índice de Contaminação Acumulada (I.C.A.).

Concentração microbiológica/100 ml	Valor de I.C.A. atribuído
≤ 100	1
de 101 a 500	2
de 501 a 2000	3
de 2001 a 4000	4
> 4000	5

Tabela 69. Classificação e condição sanitária das águas com base no Índice de Contaminação Acumulada (I.C.A.).

I.C.A.	Classificação sanitária	Condição para banho
1-1,2	Ótima	Livre ¹
1,3-2,2	Boa	Livre
2,3-3,2	Tolerável	Com precauções ²
3,3-4	Má	Não aconselhável ³
4,1-5	Péssima	Proibido ⁴

(1) Não é necessário adoptar medidas higiénico-sanitárias depois do banho.

(2) É aconselhável limitar a duração do banho (máximo até 15min), e tomar um duche de água potável depois do banho.

(3) O banho pode causar transtornos principalmente na pele e mucosas.

(4) Não se aconselha o banho.

Através das Tabelas 70 e 71 representam-se os valores de I.C.A. e de classificação sanitária para as três estações de amostragem durante o período de dois anos (Março de 1990- Março de 1992).

Tabela 70. Índice de Contaminação Acumulada (I.C.A.) calculado para as três estações.

Parâmetros	Ilha		Portas do Mar		Ponte Cais	
	1990	1991	1990	1991	1990	1991
CT	1,1	1,4	5	5	4,5	4,5
CF	0,5	1	4,8	5	3,1	3,3
EF	0,4	0,5	4,1	3,8	1,5	2,2
FC	0,8	1,2	5	4,8	3,4	3,2

Tabela 71. Classificação sanitária das áreas amostradas de acordo com os valores do Índice de Contaminação Acumulada (I.C.A.) calculado para os parâmetros microbiológicos: coliformes totais (CT), coliformes fecais (CF), estreptococos fecais (EF) e colifagos (FC).

Parâmetros	Ilha		Portas do Mar		Ponte Cais	
	1990	1991	1990	1991	1990	1991
CT	ÓTIMA	BOA	PÉSSIMA	PÉSSIMA	PÉSSIMA	PÉSSIMA
CF	ÓTIMA	ÓTIMA	PÉSSIMA	PÉSSIMA	TOLERÁVEL	TOLERÁVEL
EF	ÓTIMA	ÓTIMA	PÉSSIMA	MÁ	BOA	BOA
FC	ÓTIMA	ÓTIMA	PÉSSIMA	PÉSSIMA	MÁ	TOLERÁVEL

5.1.3. Classificação das zonas de estudo em conformidade com os critérios definidos pela Organização Mundial de Saúde e Comunidade Europeia.

Analisando os resultados resumidos na Tabela 72, verifica-se que a estação Portas do Mar apresenta valores, quer para 50 quer para 90% das amostras, que ultrapassam as concentrações estabelecidas através dos critérios recomendados pela WHO/UNEP. Relativamente à estação Ponte Cais, unicamente os estreptococos fecais estão em conformidade com o estabelecido neste critério. Na estação Ilha as amostras não ultrapassaram os valores recomendados.

Tabela 72. Qualidade microbiológica das águas: comparação dos limites especificados pelo critérios recomendados pela OMS/UNEP e os valores observados.

Parâmetro de qualidade	Concentrações microbianas *			
	Especificado pelo critério	Observado Ilha	Observado Portas Mar	Observado Ponte Cais
CF50	2	1,98	5,21	3,03
CF90	3	2,40	5,31	3,55
EF50	2	1,58	3,40	2,08
EF90	3	1,97	3,99	2,57

* Valores expressos em logaritmos decimais

Na Tabela 73 encontram-se registados os valores especificados na legislação portuguesa, (transcrição da recomendação comunitária) e os valores observados nas três estações de amostragem.

Tabela 73. Qualidade microbiológica das águas: comparação dos limites especificados pelo critérios recomendados pela Comunidade Europeia, praticados em Portugal e os valores observados.

Parâmetro de qualidade	Concentrações microbianas *			
	Especificado pelo critério (NMP/100ml)	Observado Ilha (ufc/100ml)	Observado PM (ufc/100ml)	Observado PC (ufc/100ml)
CT80	2,70	3,19	5,88	4,31
CT95	4,00	3,51	6,14	4,75
CF80	2,00	2,59	5,54	3,38
CF95	3,30	2,86	5,86	3,71
EF90	2,00	1,97	3,99	2,57

* Valores expressos em logaritmos decimais.

Dado que as zonas de amostragem não são normalmente utilizadas para fins idênticos, as Tabelas 74 e 75 permitem analisar as três zonas de acordo com a sua normal utilização.

Tabela 74. Percentagem de observações, da estação Ilha, que excedem os valores regulamentados na legislação portuguesa, para águas recreativas com contacto directo.

Coliformes totais		Coliformes fecais		Estreptococos fecais		<i>Salmonella</i>	
VMR	VMA	VMR	VMA	VMR	VMA	VMR	VMA
n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
17 (68)	0	14 (56)	0	1 (4)	---	---	4 (16)

Tabela 75. Percentagem de observações, das estações Porta do Mar e Ponte Cais, que excedem os valores regulamentados na legislação portuguesa, para águas recreativas com contacto indirecto.

<u>Estação</u>	<u>Coliformes totais</u> n (%)	<u>Coliformes fecais</u> n (%)
Portas do Mar	25 (100)	24 (96)
Ponte Cais	9 (36)	4 (16)

5.2. Percentagem de detecção de patogénicos

As Tabelas 76 a 78 permitem avaliar a presença de microrganismos patogénicos em amostras de água, nelas se encontram resumidas as percentagens de detecção dos microrganismos patogénicos *Salmonella*, *C. albicans* e *P. aeruginosa*.

Tabela 76. Percentagens de detecção calculadas para amostras de 100 ml de água da estação Ilha.

Ano	<u>Amostras</u>	<u><i>Salmonella</i></u>	<u><i>C.albicans</i></u>	<u><i>P. aeruginosa</i></u>
	n	n (%)	n (%)	n (%)
1990	10	2 (20)	0	5 (50)
1991	12	1 (8)	0	6 (50)
1992	3	1 (33)	0	2 (67)
Total	25	4 (16)	0	13 (52)

Tabela 77. Percentagens de detecção calculadas para amostras de 100 ml de água da estação Portas do Mar.

Ano	<u>Amostras</u>	<u><i>Salmonella</i></u>	<u><i>C.albicans</i></u>	<u><i>P. aeruginosa</i></u>
	n	n (%)	n (%)	n (%)
1990	10	7 (70)	0	9 (90)
1991	12	10 (83)	0	12 (100)
1992	3	2 (67)	0	3 (100)
Total	25	19 (76)	0	24 (96)

Tabela 78. Percentagens de detecção calculadas para amostras de 100 ml de água da estação Ponte Cais.

Ano	Amostras	<i>Salmonella</i>	<i>C.albicans</i>	<i>P. aeruginosa</i>
	n	n (%)	n (%)	n (%)
1990	10	5 (50)	0	9 (90)
1991	12	2 (17)	2 (17)	10 (83)
1992	3	1 (33)	1 (33)	3 (100)
Total	25	8 (32)	3 (12)	22 (88)

5.3. Percentagem de detecção de patogénicos relacionada com o intervalo de concentração de indicadores

Nas Tabelas 79 a 90 apresenta-se a relação entre as concentrações de microrganismos indicadores coliformes totais, coliformes fecais, estreptococos fecais, colifagos e os microrganismos patogénicos.

Para qualquer das relações estudadas verifica-se que as percentagens de detecção de microrganismos patogénicos são menores para as amostras de água colhidas na estação Ilha e os maiores valores verificam-se na estação Portas do Mar, cabendo à estação Ponte Cais os valores intermédios. *Pseudomonas aeruginosa* foi o microrganismo patogénico detectado num maior número de amostras, tendo atingido percentagens de presença entre os 52% a 100% (EF/P.a.). A levedura *Candida albicans* foi isolada, unicamente em 3 amostras pertencentes à estação de amostragem Ponte Cais. Nestas tabelas pode-se também verificar que nem sempre o aumento do título do indicador corresponde a um aumento da detecção dos patogénicos.

Tabela 79. Percentagens de detecção calculadas para amostras de 100 ml de água da estação Ilha.

Intervalo de concentração	Coliformes			
	<u>totais</u> n	<u>Salmonella</u> n (%)	<u>C.albicans</u> n (%)	<u>P. aeruginosa</u> n (%)
≤ 500	8	1 (12,5)	0	4 (50,0)
501 - 10 ³	8	2 (25)	0	5 (62,5)
10 ³ - 10 ⁴	9	1 (11,1)	0	4 (44,4)
≥10 ⁴	0	0	0	0
Total	25	4 (16)	0	13 (52)

Tabela 80. Percentagens de detecção calculadas para amostras de 100 ml de água da estação Portas do Mar.

Intervalo de concentração	Coliformes			
	<u>totais</u> n	<u>Salmonella</u> n (%)	<u>C.albicans</u> n (%)	<u>P. aeruginosa</u> n (%)
≤ 10 ⁵	2	2 (100)	0	2 (100)
10 ⁵ - 5 x 10 ⁵	15	11 (73,3)	0	14 (93,3)
> 5 x 10 ⁵	8	6 (75,0)	0	8 (100)
Total	25	19 (76,0)	0	24 (96,0)

Tabela 81. Percentagens de detecção calculadas para amostras de 100 ml de água da estação Ponte Cais.

Intervalo de concentração	Coliformes			
	<u>totais</u> n	<u>Salmonella</u> n (%)	<u>C.albicans</u> n (%)	<u>P. aeruginosa</u> n (%)
≤ 5 x 10 ³	10	4 (40)	1 (10)	7 (70)
5 x 10 ³ - 10 ⁴	5	3 (60)	0	5 (100)
> 10 ⁴	10	1 (10)	2 (20)	10 (100)
Total	25	8 (32)	3 (12)	22 (88)

Tabela 82. Percentagens de detecção calculadas para amostras de 100 ml de água da estação Ilha.

Intervalo de concentração	Coliformes			
	<u>fecais</u> n	<u>Salmonella</u> n (%)	<u>C.albicans</u> n (%)	<u>P. aeruginosa</u> n (%)
$\leq 10^2$	15	2 (20)	0	5 (50)
$> 10^2$	10	2 (13)	0	8 (53)
Total	25	4 (16)	0	13 (52)

Tabela 83. Percentagens de detecção calculadas para amostras de 100 ml de água da estação Portas do Mar.

Intervalo de concentração	Coliformes			
	<u>totais</u> n	<u>Salmonella</u> n (%)	<u>C.albicans</u> n (%)	<u>P. aeruginosa</u> n (%)
$\leq 2 \times 10^3$	1	1 (100)	0	1 (100)
$2 \times 10^3 - 5 \times 10^4$	9	6 (66,7)	0	8 (88,9)
$5 \times 10^4 - 1 \times 10^5$	7	6 (85,7)	0	7 (100)
$> 10^5$	8	6 (75,0)	0	8 (100)
Total	25	19 (76)	0	24 (96)

Tabela 84. Percentagens de detecção calculadas para amostras de 100ml de água da estação Ponte Cais.

Intervalo de concentração	Coliformes			
	<u>fecais</u> n	<u>Salmonella</u> n (%)	<u>C.albicans</u> n (%)	<u>P. aeruginosa</u> n (%)
$\leq 10^2$	1	0	0	1 (100)
$10^2 - 10^3$	10	3 (30,0)	1 (10)	7 (70,0)
$10^3 - 2 \times 10^3$	7	3 (42,8)	1 (8,3)	7 (100)
$> 2 \times 10^3$	7	2 (28,6)	1 (50,0)	7 (100)
Total	25	8 (32)	3 (100)	22 (92)

Tabela 85. Percentagens de detecção calculadas para amostras de 100 ml de água da estação Ilha.

Intervalo de concentração	Estreptococos			
	<u>fecais</u> n	<u>Salmonella</u> n (%)	<u>C.albicans</u> n (%)	<u>P. aeruginosa</u> n (%)
≤25	8	2 (25)	0	5 (62,5)
25 -50	9	0	0	4 (44,4)
50 - 100	7	2 (28,6)	0	3 (42,8)
> 10 ²	1	0	0	1 (100)
Total	25	4 (16)	0	13 (52)

Tabela 86. Percentagens de detecção calculadas para amostras de 100 ml de água da estação Portas do Mar.

Intervalo de concentração	Estreptococos			
	<u>fecais</u> n	<u>Salmonella</u> n (%)	<u>C.albicans</u> n (%)	<u>P. aeruginosa</u> n (%)
≤ 10 ³	5	1 (20,0)	0	4 (80)
1 x 10 ³ - 2 x 10 ³	6	6 (100)	0	6 (100)
2 x 10 ³ - 5 x 10 ³	7	7 (100)	0	7 (100)
> 5 x 10 ³	7	5 (71,4)	0	7 (100)
Total	25	17 (68)	0	24 (96)

Tabela 87. Percentagens de detecção calculadas para amostras de 100 ml de água da estação Ponte Cais.

Intervalo de concentração	Estreptococos			
	<u>fecais</u> n	<u>Salmonella</u> n (%)	<u>C.albicans</u> n (%)	<u>P. aeruginosa</u> n (%)
≤ 100	11	3 (27)	1 (9)	10 (91)
100 - 300	10	4 (40)	0	8 (80)
> 300	4	1 (25)	2 (50)	4 (100)
Total	25	8 (32)	3 (12)	22 (88)

Tabela 88. Percentagens de detecção calculadas para amostras de 100 ml de água da estação Ilha

Intervalo de concentração	Colifagos	<i>Salmonella</i>	<i>C.albicans</i>	<i>P. aeruginosa</i>
	n	n (%)	n (%)	n (%)
< 300	9	0	0	3 (33,3)
300 - 600	9	3 (33,3)	0	4 (44,4)
> 600	7	1 (14,3)	0	5 (71,4)
Total	25	4 (16,0)	0	13 (52,0)

Tabela 89. Percentagens de detecção calculadas para amostras de 100 ml de água da estação Portas do Mar.

Intervalo de concentração	Colifagos	<i>Salmonella</i>	<i>C.albicans</i>	<i>P. aeruginosa</i>
	n	n (%)	n (%)	n (%)
< 2 x 10 ⁴	8	6 (75,0)	0	8 (100)
2 x 10 ⁴ - 5 x 10 ⁴	8	7 (87,5)	0	7 (87,5)
> 5 x 10 ⁴	9	6 (66,7)	0	9 (100)
Total	25	19 (76,0)	0	24 (96,0)

Tabela 90. Percentagens de detecção calculadas para amostras de 100 ml de água da estação Ponte Cais.

Intervalo de concentração	Colifagos	<i>Salmonella</i>	<i>C.albicans</i>	<i>P. aeruginosa</i>
	n	n (%)	n (%)	n (%)
≤ 1,2 x 10 ³	9	3 (33,3)	0	8 (88,9)
1,2 x 10 ³ - 2 x 10 ³	9	4 (44,4)	2 (22,2)	7 (77,8)
> 2 x 10 ³	7	1 (14,3)	1 (14,3)	7 (100)
Total	25	8 (32,0)	3 (12,0)	22 (88,0)

5.4. Aplicação de índices.

Considerando as concentrações microbianas, obtidas ao longo do período de amostragem, para os coliformes totais, coliformes fecais, estreptococos fecais e colifagos, calcularam-se os respectivos quocientes que se encontram graficados nas figuras que se apresentam a seguir (Figuras 31 a 33).

Analisando a informação contida nesses gráficos verifica-se que, para as três estações, as contagens de coliformes totais foram sempre superiores às referentes aos coliformes fecais. As diferenças foram sempre de uma a duas ordens de magnitude, com uma única exceção para a estação Portas do Mar, na qual se registou uma amostra com uma diferença de três ordens de magnitude.

As concentrações de coliformes totais foram superiores às dos coliformes fecais, em todas as amostras e estações.

As concentrações de coliformes fecais ultrapassaram os valores das concentrações de estreptococos fecais entre 84% (Ilha) a 96% (Portas do Mar e Ponte Cais) das amostras.

A razão entre os coliformes fecais e os colifagos é diferente em cada uma das três estações de amostragem. Assim, na estação Ilha somente uma amostra apresentou concentrações de coliformes fecais superiores às registadas para os colifagos. Na estação Ponte Cais, a afirmação anterior aplica-se a 32 % das amostras, e a 88% das amostras da estação Portas do Mar.

Através da Tabela 91, pretende-se verificar a relação existente entre o índice coliformes fecais e estreptococos fecais (CF/EF) e o intervalo de concentração de coliformes fecais, ou seja o grau de poluição.

As amostras provenientes da estação Ilha, indicam que a concentração de estreptococos fecais ultrapassou a dos coliformes fecais, quando o nível de poluição

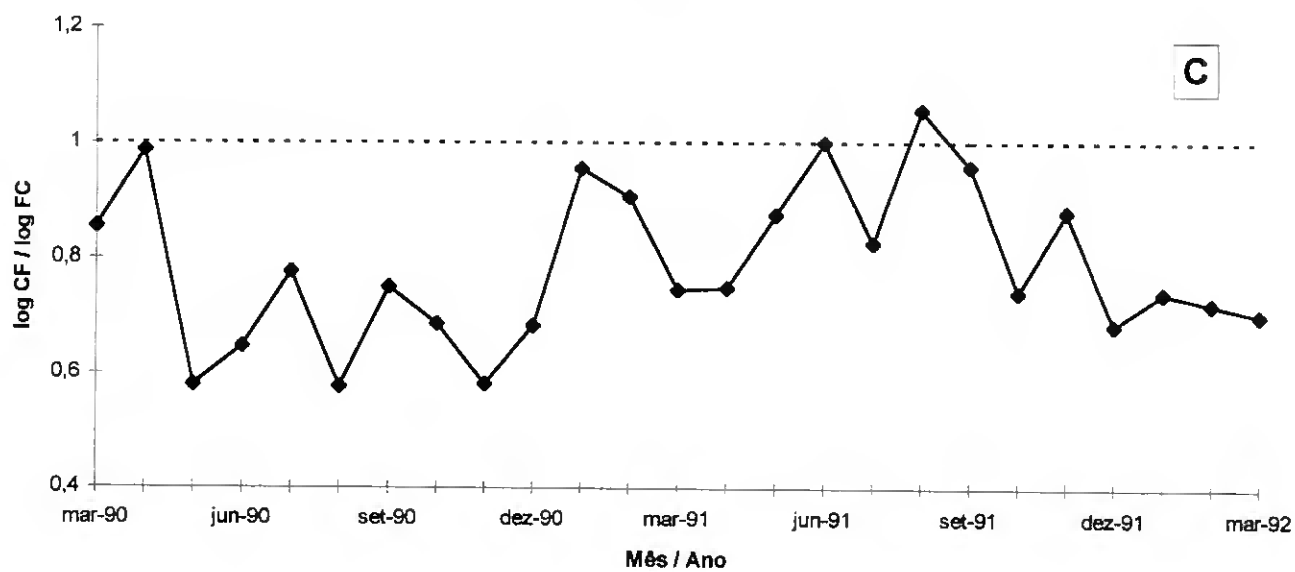
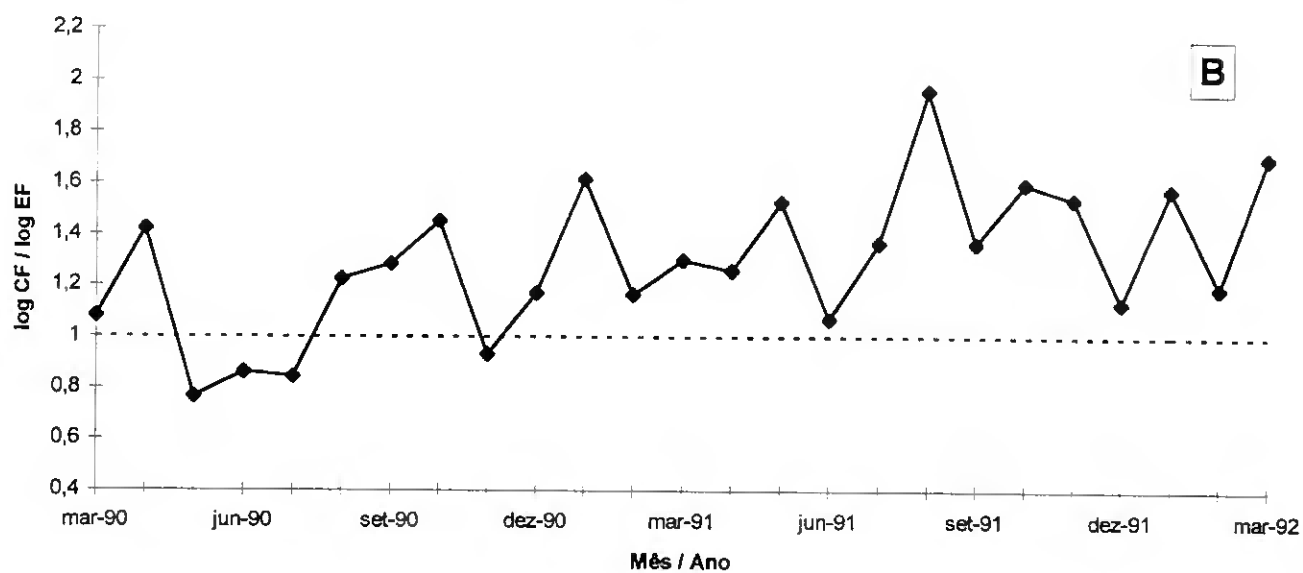
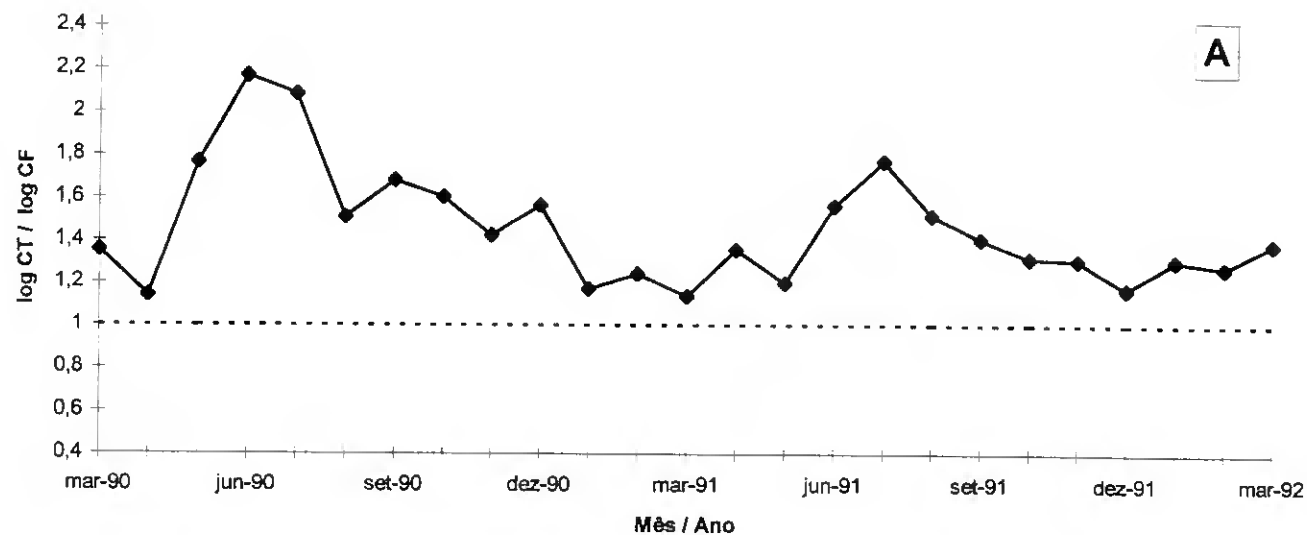


Figura 31. Relações entre coliformes totais e coliformes fecais (A), coliformes fecais e estreptococos fecais (B) e entre coliformes fecais e colifagos (C). Estação Ilha.

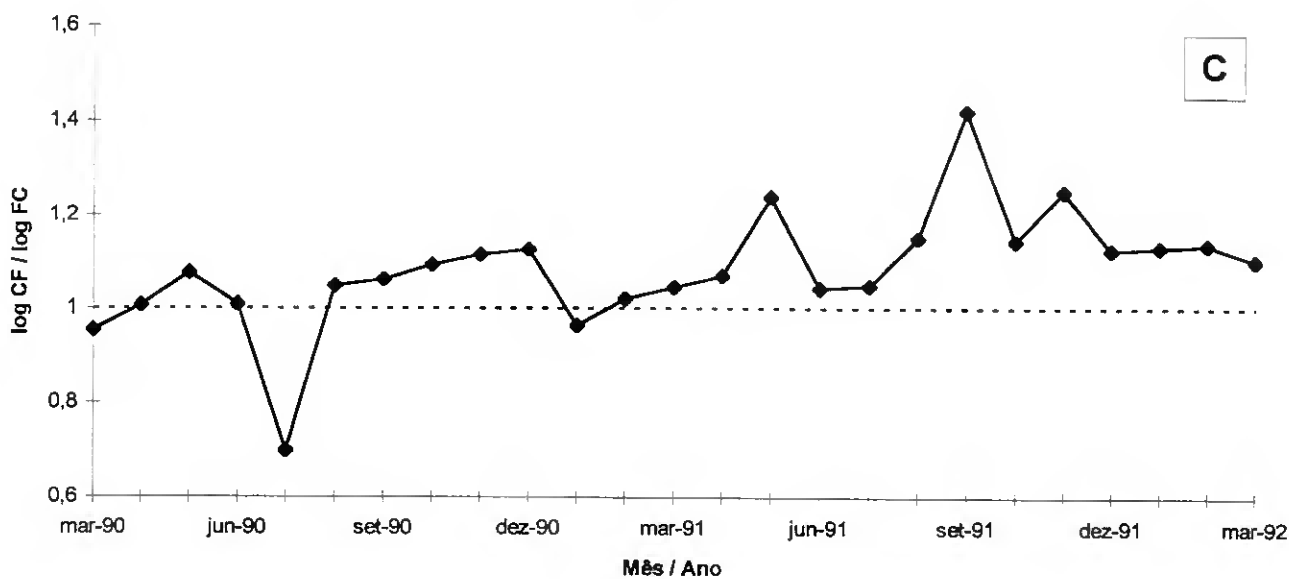
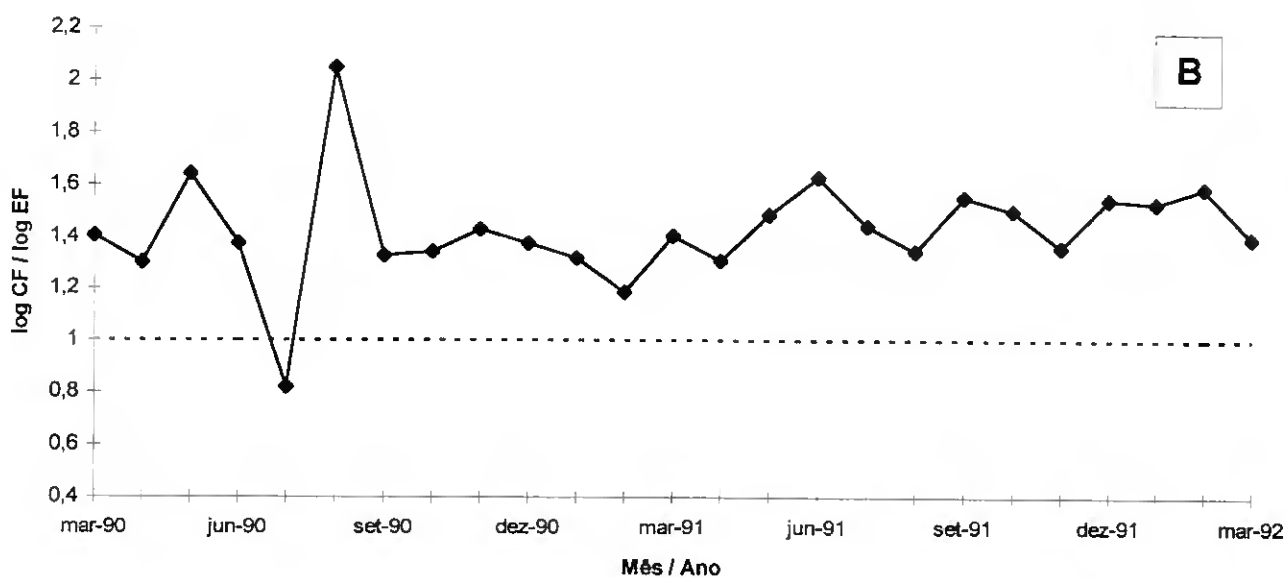
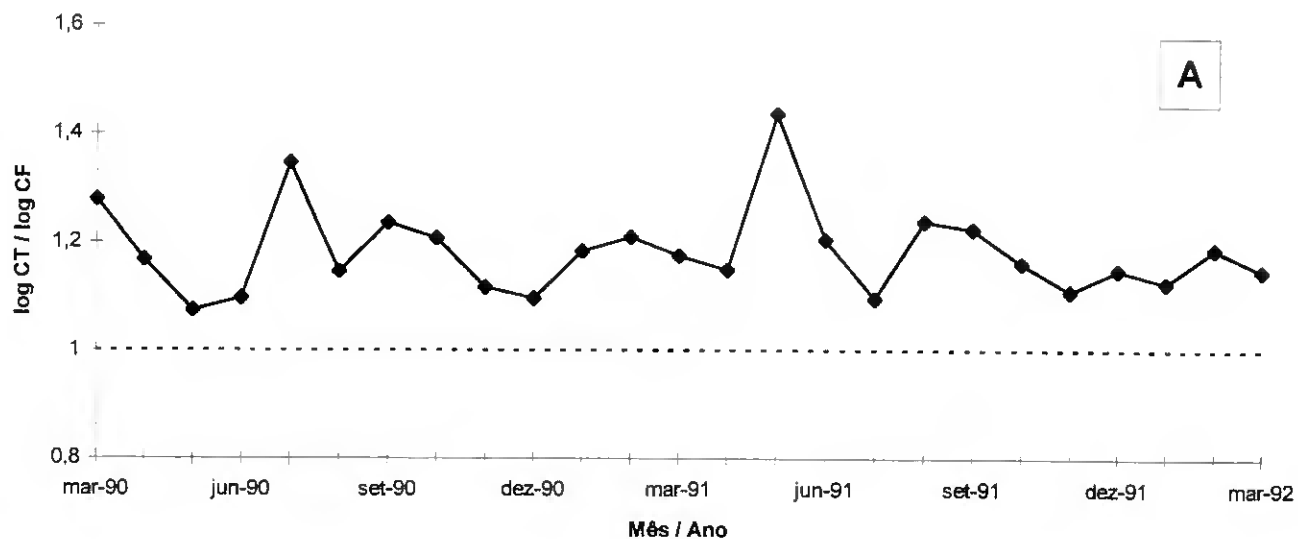


Figura 32. Relação entre coliformes totais e coliformes fecais (A), coliformes fecais e estreptococos fecais (B) e coliformes fecais e colifagos (C). Estação Portas do Mar.

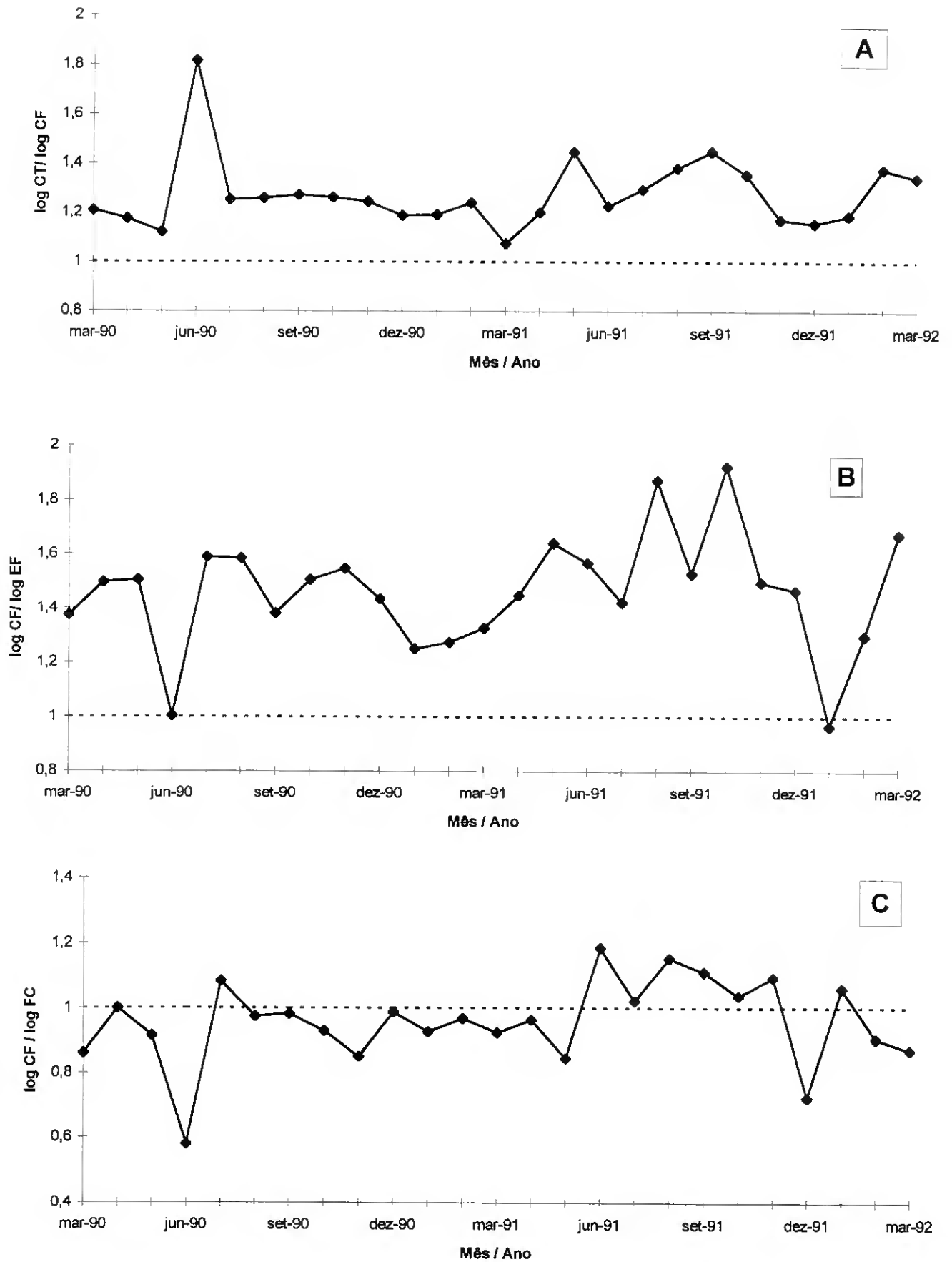


Figura 33. Relações entre coliformes totais e coliformes fecais (A), coliformes fecais e estreptococos fecais (B) e coliformes fecais e colifagos (C). Estação Ponte Cais.

das águas era baixo atendendo à concentração de coliformes fecais (10-100 CF/100 ml).

Tabela 91. Variação do quociente entre coliformes fecais e estreptococos fecais (CF/EF) em função da concentração de coliformes fecais (CF).

a - ILHA

Intervalo CF/100 ml	nº de amostras n (%)	CF/EF	
		<1	>1
10 - 100	10 (40)	4 (40)	6 (60)
100-1000	15 (60)	--	15 (100)

b - PORTAS DO MAR

Intervalo CF/100 ml	nº de amostras n (%)	CF/EF	
		<1	>1
10^3 - 10^4	1 (4)	1 (100)	--
10^4 - 10^5	16 (64)		16 (100)
$>10^5$	8 (32)	--	8 (100)

c - PONTE CAIS

Intervalo CF/100 ml	nº de amostras n (%)	CF/EF	
		<1	>1
10^2 - 10^3	11 (44)	--	11 (100)
10^3 - 10^4	13 (52)	1 (8)	12 (92)
$>10^4$	1 (4)	--	1 (100)

5.5. Moluscos bivalves como indicadores de contaminação.

Em Portugal a avaliação da qualidade microbiológica dos moluscos bivalves é feita através da análise do músculo e líquido intervalvar de acordo com o recomendado, para os países membros, pela Directiva do Conselho das Comunidades

Europeias nº 923/79. Assim do ponto de vista microbiológico é aplicado o limite de 300 CF/100 g de músculo e líquido intervalvar.

Pelo facto de serem considerados outros indicadores para além dos coliformes fecais, apresenta-se a seguir os limites recomendados por Grabow *et al.* (1989).

CF/100g	500 (90% das amostras)
EF/100g	200 (90% das amostras)
Colifagos/100g	10 (90% das amostras)
Viroses humanas /10g	0 (90% das amostras)

Os resultados obtidos nas dez amostras analisadas no presente trabalho (n=10) foram todos superiores aos limites exigidos quer pela legislação portuguesa, quer aos recomendados por Grabow *et al.* (1989).

Em relação aos coliformes totais e coliformes fecais, os valores mínimos registaram-se nas amostras de mexilhão colhidas na estação Ilha e os máximos nas amostras da estação Ponte Cais. Os valores mínimos para os estreptococos foram igualmente obtidos em amostras da estação menos poluída (Ilha). No entanto o valor máximo registado para este grupo de bactérias (estreptocococs fecais) foi registado em duas amostras, sendo uma da estação Ilha e outra da Ponte Cais. As espécies do género *Salmonella* foram também isoladas em amostras de mexilhão colhidas na estação Ponte Cais.

DISCUSSÃO

As descargas directas de águas residuais para o ecossistema marinho traz consequentemente uma alteração ecológica devido, fundamentalmente, ao fluxo de grande quantidade de matéria orgânica e substâncias tóxicas, que conduzem a um desequilíbrio das populações autóctones marinhas e podem alterar a cadeia trófica. No entanto, o meio ambiente marinho possui um grande poder depurador e renovador e, rapidamente, o sistema poderá ser de novo reequilibrado.

Contudo, em sistemas fechados como baías, estuários ou albufeiras o poder depurador e renovador das águas do mar é, às vezes, insuficiente para equilibrar as alterações produzidas por uma descarga telúrica contínua de águas residuais.

O estudo destes sistemas é importante para compreender o impacte ambiental que se produz pela descarga incontrolada de resíduos domésticos e industriais, pelo que, na presente dissertação se aborda esta temática considerando os seguintes pontos:

1. Qualidade microbiológica das águas da Ria Formosa na zona da cidade de Faro.
2. Avaliação dos moluscos bivalves como indicadores biológicos de contaminação.
3. Estudo comparativo de meios selectivos para o crescimento de estreptococos fecais.

1. QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DAS ÁGUAS DA RIA FORMOSA NA ZONA DA CIDADE DE FARO

Em condições normais os meios aquáticos naturais contêm populações de microrganismos adaptados ao longo do tempo a esse ecossistema. As contribuições externas de águas residuais aumentam a carga microbiana, mas a sua persistência no meio é local e transitória, dependendo de diversos factores físico-químicos, hidrológicos e biológicos do meio marinho tais como temperatura, pressão, nutrientes, turbidez, gases dissolvidos, luz, movimento das águas, salinidade, pH, depredação, entre outros (Colwell e Kaneko, 1974).

Estes factores fazem com que as populações de microrganismos alóctones, tendam a diminuir, em função da sua capacidade específica de resistência, com o afastamento do ponto de descarga (Baleux *et al.*, 1988; Rheinheimer, 1992).

Atendendo à grande variabilidade das condições hidrológicas, seria desejável efectuar um grande número de amostragens. Porém, o volume de trabalho requerido, particularmente na determinação dos parâmetros microbiológicos, constituiu uma das principais razões que levou à redução do esforço de amostragem. Este realizou-se o mais sistematicamente possível, sempre nas mesmas condições de maré e aproximadamente à mesma hora, de forma a reduzir ao mínimo as variações naturais que poderiam influenciar a qualidade microbiológica das águas amostradas, tomando em consideração a existência de variações pronunciadas destes parâmetros com a hora (Fuhrman *et al.*, 1985) e a maré (Stevenson *et al.*, 1974; Laanbroek e Verplanke, 1986).

Há a salientar que as relações significativas entre os parâmetros estudados foram registadas em número reduzido, o que poderá ser consequência da complexidade e diversidade do ecossistema Ria Formosa. Atendendo à interferência de muitas variáveis, não era de esperar relações lineares simples.

Em ecossistemas do tipo da Ria Formosa importa estudar a influência dos factores ambientais em populações bacterianas, as relações que se estabelecem entre si e a forma como os sistemas biológicos são afectados.

As populações bacterianas, tal como outras populações, estão fortemente interrelacionadas com o meio ambiente que as cerca, dado que as bactérias apresentam tempos de geração extremamente pequenos, é admissível que as variações no meio ambiente se reflectam rapidamente no tipo e número de bactérias presentes (Pratt e Reynolds, 1974).

Nos últimos anos, tem-se vindo a estudar profundamente os efeitos dos mais importantes factores físico-químicos sobre o desenvolvimento dos microrganismos

aquáticos. No entanto, é sempre difícil extrapolar os resultados obtidos em laboratório para os que ocorrem em ambiente natural.

1.1. Efeito da temperatura

A temperatura afecta os processos biológicos de todos os organismos mediante a regulação do seu crescimento e reprodução. Todos os organismos têm uma temperatura óptima para crescer. Assim os microrganismos classificam-se como psicrófilos, mesófilos e termófilos de acordo com as temperaturas óptimas de crescimento.

Em conformidade com as definições dadas por Henis (1987), a temperatura óptima para os microrganismos psicrófilos situa-se abaixo dos 20° C e o mínimo e máximo entre -7° e 25° C; os mesófilos, com um intervalo de temperatura óptima entre 20-30° C e limites de crescimento mínimo e máximo de 10° e 45° C respectivamente; e os termófilos, com uma temperatura óptima entre os 55° e os 60° C, um mínimo de 30° C, e um máximo variando entre 70° e 80° C. Temperaturas próximas aos valores máximos ou mínimos podem causar modificações morfológicas nos microrganismos.

No meio ambiente marinho natural, onde existe um grande número e variedade de seres vivos interactuando, o efeito da temperatura não se faz sentir isoladamente. O efeito da temperatura no microbiota aquático, somente pode ser avaliado quando se conhece bem todos os outros factores envolvidos (Rheinheimer, 1992).

Assim, por exemplo, em águas com forte contaminação por descargas de águas residuais um aumento de temperatura resulta num aumento de actividade e redução do tempo de geração dos microrganismos. No entanto, são mais frequentes os efeitos nocivos ou negativos e a autólise é acelerada a temperaturas elevadas.

Os microrganismos, para os quais as condições de vida num determinado meio são favoráveis, poderão multiplicar-se rapidamente com as temperaturas de verão; no entanto, outros que se encontrem num meio hostil, morrem rapidamente, como é o

caso das bactérias entéricas descarregadas no meio aquático (Barbosa, 1989; Rheinheimer, 1992; Pereira e Alcântara, 1993).

Alkan *et al.* (1995), através de estudos, em laboratório, de sobrevivência de bactérias entéricas, constataram que a temperatura não tem um efeito significativo na sobrevivência das bactérias no meio marinho na presença da luz, não tendo registado alterações significativas, na taxa de sobrevivência dos microrganismos estudados, com variações de temperatura de 10 a 30 ° C, tendo concluído que o efeito da luz anula o efeito da temperatura. Constataram que a turbidez, mistura vertical e efluentes são factores estatisticamente significativos na sobrevivência das bactérias entéricas na presença da luz.

Os valores da temperatura registados no presente trabalho, não apresentam diferenças significativas entre as três estações de amostragem e as suas variações estão em conformidade com os dados obtidos por outros autores, que realizaram estudos na Ria Formosa. A Figura 3 mostra que os valores máximos (26° C) foram registados em Julho (1990) e em Junho (1991), decrescendo gradualmente até Janeiro, quando se registou o valor mínimo (11° C). Barbosa (1989), em estudos realizados em condições similares às do presente trabalho quanto à amostragem, registou durante o período compreendido entre os meses de Maio a Outubro de 1988 valores de temperatura que variaram entre os 15° e os 27° C. Andrade (1992) e Sprung (1994), a partir de investigações desenvolvidas na Ria Formosa, nos anos de 1987-1988 e 1988-1989, respectivamente, descreveram também variações sazonais semelhantes, com valores máximos no verão (28° C) e mínimos no inverno na ordem de 15° e 12° C.

1.2. Efeito da salinidade

O grau de salinidade no meio aquático é um factor determinante na distribuição dos seres vivos.

Somente muito poucos seres são encontrados quer em águas doces quer em águas marinhas. A grande maioria das bactérias marinhas são halofílicas, necessitam de

uma determinada quantidade de sal, entre 25 a 40‰, para se desenvolverem. Estas bactérias contribuem com 95% dos valores obtidos para as saprófitas em mar alto. A proporção dos halotolerantes (10 a 20 ‰ de salinidade) é por conseguinte pouco representativa (Rheinheimer, 1992). No entanto, em zonas litorais a proporção das bactérias halotolerantes é maior, e em zonas poluídas do fiorde de Kiel raramente ultrapassaram os 20% (Rheinheimer, com. verbal).

Os valores extremos de salinidade, registados na amostragem durante o período de dois anos em que decorreu este estudo, situaram-se entre 25 e 37‰. O valor mínimo registou-se na estação Portas do Mar, que se encontra nas proximidades de efluentes com descargas importantes sob o ponto de vista quantitativo, com uma profundidade de aproximadamente um metro em baixa-mar, e durante o mês de Dezembro. Em estudos também realizados na Ria Formosa, Benoliel (1984), registou valores de salinidade compreendidos entre 26 e 38‰. Cachola (dados não publicados), em trabalhos desenvolvidos em estações próximas às do presente estudo e referentes a um período de cinco anos (1990-1995) também observou valores semelhantes.

Observa-se nas três estações, uma relação directa e estreita entre a temperatura e a salinidade. Na estação Ilha, observa-se uma menor influência telúrica e, em consequência, uma maior influência marinha registou-se um valor de correlação mais elevado ($r=0,726$; $p=0,01$). Nas outras estações, as correlações foram significativas para $p=0,05$ e, respectivamente iguais, a 0,465 e 0,414 para Portas do Mar e Ponte de Cais.

Através da análise global das correlações obtidas a partir dos dados registados neste estudo há a registar correlações negativas e significativas ($p=0,05$) entre o parâmetro salinidade e os estreptococos fecais e os colifagos.

Comparando os valores da salinidade observados nas três estações de amostragem e apesar de não se ter registado diferenças significativas, há que assinalar que foi na estação Ilha onde se observaram os valores de salinidade mais elevados. Pelo que se pode deduzir que nessa estação de amostragem existe uma menor

influência exógena telúrica e, em consequência, maior influência da água do oceano. Foi também nessa estação que se observou em geral um maior predomínio de bactérias halófilas, dado que em 75% das amostras as bactérias que cresceram em meios de cultura com salinidade de 35‰ apresentavam concentrações superiores, comparativamente às concentrações de bactérias halotolerantes que cresceram a 17,5‰. Esta situação verificou-se na estação Portas do Mar, em 37,5% das amostras e na estação Ponte de Cais em 58%, o que demonstra a maior contribuição de origem antropogénica nestas duas zonas.

Na estação Ilha, ao contrário do que se verificou nas outras duas estações, não se registaram correlações entre as bactérias mesófilas que cresceram a 37° e 22° C, e as bactérias saprófitas desenvolvidas a 17,5 ‰ de salinidade. Uma possível razão para este resultado poderá estar relacionada com a menor capacidade de sobrevivência das bactérias entéricas nesta estação onde se observa uma maior influência marinha.

Com excepção para os halófilos halotolerantes, como por exemplo *Vibrio* e *Staphylococcus*, a salinidade provoca a inactivação bacteriana. Contudo, a salinidade não é a principal responsável do forte poder inactivante do meio marinho (Cornax, 1986), podendo também actuar através de efeitos sinérgicos (Fujioka e Narikowa, 1982).

Ishida *et al.* (1974), em estudos de laboratório com dois tipos de bactérias, halófilas moderadas e halófilas extremas, constaram a interacção entre a temperatura e a salinidade. Estes autores verificaram que as salinidades mínimas para o crescimento de determinadas bactérias marinhas e bactérias halófilas aumentam ao incrementar-se a temperatura de incubação.

Esta relação condiciona fortemente a existência do microbiota adaptado a salinidades correspondentes ao meio marinho e que tem um ciclo de distribuição dependente da temperatura.

1.3. Efeito da turbidez

A turbidez é outro factor que afecta significativamente o destino dos microrganismos alóctonos no meio aquático, e é causado pelo material em suspensão na água.

Os materiais em suspensão, quer sejam orgânicos quer sejam minerais, adsorvem nas suas superfícies nutrientes e microrganismos que estão presentes na água em concentrações muito pequenas. Desta forma, os microrganismos encontram uma situação mais favorável para persistir no meio ambiente aquático, em comparação com o seu estado livre (Rheinheimer, 1992).

Por outro lado, as partículas adsorvem substâncias inibidoras e tóxicas neutralizando-as. Estas partículas também protegem os microrganismos contra os efeitos da luz. Todavia, a variação dos detritos nem é sempre acompanhada por uma flutuação semelhante no teor microbiano. Pode-se considerar que um aumento na turbidez, acompanhado por um crescimento vigoroso no número de bactérias, é devido pelo menos ao aumento da quantidade de material orgânico suspenso, que pode servir de nutriente para as bactérias. Quando não se observam mudanças significativas no número de bactérias, com as variações de turbidez, este último é causado por material em suspensão de origem inorgânica (Rheinheimer, 1992).

No presente trabalho, considerando as três estações de amostragem individualmente, não se registaram correlações significativas entre a transparência e os microrganismos pesquisados. Na análise global registou-se correlação negativa significativa para a transparência e coliformes totais, coliformes fecais, estreptococos fecais, colifagos e *Salmonella*; microrganismos marcadamente alóctonos.

Alkan *et al.* (1995), em estudos em laboratório de sobrevivência de bactérias entéricas, observaram que a turbidez, mistura vertical e efluentes são factores estatisticamente significativos na taxa de inactivação das bactérias na presença da luz.

Analisando os dados registados para cada amostragem nota-se que na estação Ilha, o valor máximo obtido para as bactérias totais correspondeu a um valor de transparência muito próximo ao valor mínimo registado para essa zona de amostragem. O valor máximo de transparência (mínimo de turbidez) correspondeu ao número de bactérias totais mais baixos.

1.4. Efeito do oxigénio dissolvido

A concentração de oxigénio dissolvido na água, assim como de outros gases, influencia consideravelmente a vida dos microrganismos. A sua solubilidade decresce com o aumento da temperatura e tem como origem o ar atmosférico, assim como processos bioquímicos na água e no sedimento.

Em águas com baixos teores em oxigénio, pequenas variações podem produzir modificações importantes na população bacteriana (Rheinheimer, 1992).

Na estação de amostragem Portas do Mar, registou-se uma correlação negativa significativa entre o parâmetro temperatura e a concentração do oxigénio dissolvido. A baixa profundidade observada nesta estação contribui para que o efeito da temperatura actue de uma forma mais drástica na concentração do oxigénio dissolvido.

Cachola e Sampayo (1984), em estudos realizados na Ria Formosa, numa estação com localização semelhante à estação Portas do Mar, registaram valores em mg de oxigénio/l compreendidos entre 7,34 (preia-mar) e 12,78 (maré-baixa). Porém, no presente trabalho observou-se para a mesma estação (Portas do Mar) valores mais baixos.

Em Maio de 1991, registaram-se concentrações em oxigénio dissolvido (mg/l) que se consideram elevadas e irregulares (11,30 na estação Portas do Mar; 15,17 na Ilha e 18,75 na Ponte Cais). Apesar de se tratar de um dado obtido na Primavera, quando se verificam «blooms» fitoplanctónicos, há que considerar que este

parâmetro se registava cerca das nove horas da manhã, altura em que o consumo de oxigénio não devia estar compensado com a actividade fotossintética. Por outro lado, observou-se, nas amostras provenientes da mesma amostragem, valores na concentração microbiana muito elevados quanto a microrganismos mesófilos, que crescem a 37° e a 22° C, saprófitos a 35 e a 17,5‰ de salinidade, registados nas estações Portas do Mar e Ponte de Cais e também concentrações muito elevadas quanto a coliformes totais, na estação Portas do Mar. Esta situação algo anómala, permite suspeitar sobre a existência de uma interferência que não se pôde explicar completamente a partir dos dados disponíveis.

1.5. Microrganismos e sua relação

Cada ecossistema aquático possui um microbiota autótone, adaptado ao longo do tempo às condições ecológicas do referido meio. Os contributos exógenos de águas residuais aumentam a carga microbiana, mas a sua persistência no meio é local e transitória, dependendo de vários factores tais como a temperatura, concentração em oxigénio dissolvido, nutrientes, salinidade, pH, entre outros.

A quantidade de microrganismos descarregados no mar varia diária e estacionalmente, estando a sua dispersão dependente das correntes, marés e outros movimentos locais da massa de água.

A descarga de águas residuais urbanas não tratadas, tende a provocar situações de insalubridade que, para além de constituírem um problema para a saúde pública, põem em risco a utilização das águas para determinadas aplicações. As águas residuais transportam grandes quantidades de microrganismos, nomeadamente bactérias e vírus humanos e a sua descarga em zonas costeiras constitui um risco potencial, para banhistas e consumidores de mariscos dado que estes podem ser ingeridos crus ou ligeiramente cozinhados (Bosch *et al.*, 1994).

Para avaliar o impacte dos microrganismos descarregados no ecossistema que se pretende estudar, importa conhecer a origem e condições da poluição. Para

interpretar a origem das fontes poluidoras é necessário utilizar um sistema de indicadores, que permita avaliar e analisar qual o tipo de fonte poluidora que influencia o ecossistema estudado.

É desejável conhecer a densidade dos microrganismos indicadores assim como dos microrganismos patogénicos, a fim de se estabelecer a proximidade, natureza e importância das fontes poluidoras numa dada área. Parte da informação necessária é fornecida através da distribuição dos microrganismos coliformes, estreptococos; as suas concentrações relativas, e os níveis de microrganismos patogénicos.

Foi demonstrado que os microrganismos patogénicos podem sobreviver durante tempo suficiente e em concentrações que podem por em risco a saúde pública. Os microrganismos patogénicos *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* foram isolados em amostras de água do presente estudo. Outros autores também isolaram estes microrganismos em águas naturais contaminadas (Vicente, 1986; Moriñigo, 1987; Martinez-Manzanares, 1989; Baptista, 1993).

A possibilidade de ocorrência destes microrganismos patogénicos em águas naturais com contaminação fecal é a razão mais importante para realizar as análises microbiológicas das águas. A presença destes microrganismos patogénicos ocorre de uma forma intermitente e em baixas concentrações, o que torna injustificável a sua pesquisa laboratorial de prática constante. Para o controlo rotineiro da qualidade microbiológica das águas são escolhidos outros microrganismos que coexistem com o microrganismo patogénico no meio ambiente entérico e cuja presença na água indica contaminação fecal. Os coliformes totais e fecais têm sido os microrganismos mais utilizados como indicadores da poluição fecal (CEE, 1976; APHA, 1985).

Os resultados obtidos durante o período de amostragem de dois anos permitiram avaliar a qualidade microbiológica das águas em cada um dos pontos de amostragem seleccionado, avaliar o impacto das principais saídas de águas residuais e classificar as zonas estudadas em relação às recomendações e padrões estabelecidos quer por instituições internacionais, quer nacionais.

A contaminação bacteriana de origem fecal no meio estudado (Ria Formosa) mostra-se muito alta ao longo de todo o ano, qualquer que seja a estação de amostragem, dependendo da proximidade ou afastamento em relação às fontes poluidoras.

Os resultados das matrizes de correlação permitem obter uma aproximação dos graus de relação que existem entre os microrganismos, atendendo basicamente à sua concentração num dado momento. No entanto a actividade microbiana depende de uma série de factores que interactivam entre si. O conteúdo microbiano de uma amostra colhida na mesma estação varia significativamente com o tempo (Gameson, 1980) e a sua avaliação depende, entre outros factores, dos métodos analíticos e estatísticos utilizados (Grindas, 1978). De forma a estudar adequadamente as relações existentes entre os diferentes parâmetros, seria desejável um intervalo de amostragem mais pequeno e consequentemente um outro tipo de análise estatística.

A abundância dos microrganismos pesquisados no presente trabalho, apresenta valores muito elevados na estação Portas do Mar. Os valores intermédios registaram-se na estação Ponte de Cais; e na Ilha registaram-se os valores mais baixos. Esta variação espacial encontra-se ilustrada nas micrografias que figuram com os números 16 a 19, obtidas através do microscópio de varrimento.

Nunes (1984) e Barbosa (1989), em estudos realizados na mesma zona de amostragem (Ria Formosa), observaram um decréscimo relativamente às bactérias coliformes e saprófitas com a proximidade do oceano. Estes resultados, que reflectem o declive do número de microrganismos no meio aquático, relativamente ao ponto donde são descarregados, poderá ser devido a diferentes factores bióticos e abióticos actuando quer individualmente quer sinergicamente, nas populações de bactérias halótonas do meio aquático. Entre as causas que parecem ser determinantes na inactivação microbiana há que assinalar a diluição, dispersão, sedimentação, mortalidade biológica intrínseca das bactérias devidas à inadaptação ao meio, carência nutritiva, competição interespecífica e mortalidade por acção das radiações solares

(Gameson e Gould, 1975; Gauthier, 1980; Borrego *et al.*, 1983; Martin e Bonnefont, 1986).

A detecção, em águas, de bactérias heterotróficas totais é utilizada como indicação da quantidade de matéria orgânica degradável existente no meio. Estes microrganismos têm um papel importante na remineralização da matéria orgânica e na transformação dos compostos orgânicos dissolvidos na água.

Ao longo de todo o período de amostragem, observou-se que a densidade das bactérias que crescem em meios salinos (35 e 17,5‰) é superior relativamente à das bactérias que crescem em meios de salinidade nula (Figuras 10 a 15). Estes resultados foram também observados em estudos efectuados por Hall (1994), no estuário do Rio Sado. Rheinheimer e Schmaljohann (1983), obtiveram resultados similares em investigações efectuadas na costa atlântica portuguesa. Pode-se verificar que os microrganismos mesófilos, que crescem a temperaturas de 37° ou 22°C e os saprófitos desenvolvidos a salinidades de 35‰ ou 17,5‰ estão bem correlacionados, deduzindo-se que ambos estão sujeitos às mesmas fontes de variação, e os seus níveis provêm das mesmas origens. No entanto, estas relações não são tão claras e significativas na estação Ilha com mais influência oceânica e sujeita a menor grau de poluição.

Por outro lado, não se registaram correlações significativas entre estes microrganismos e a salinidade. Esta situação também foi mencionada por Hall (1994) para os resultados do estuário do Rio Sado. A interferência em paralelo e não individualmente dos diversos factores abióticos e bióticos poderá ser uma razão para a inexistência de correlação entre as variáveis consideradas.

A proporção de saprófitos em relação ao número total de bactérias é um bom indicador do grau de trofismo da água (Rheinheimer, 1992). No presente trabalho, os valores mais elevados foram obtidos na estação mais poluída (Figuras 7, 8 e 9). Os valores registados para a estação Ilha, oscilaram entre 0 e 1%; 0 e 28%, na Ponte de Cais e, entre 0 e 64%, nas Portas do Mar. Estes valores são inferiores aos obtidos por Barbosa (1989). Não obstante, ambos os resultados são coincidentes ao admitir que as

bactérias saprófitas, ao apresentarem variações espaciais acentuadas relativamente ao Número Total de Bactérias (NTB), poderão constituir bons indicadores sobre a qualidade do meio.

A estação Ilha (Figura 7) registou-se uma maior predominância de amostras nas quais a concentração em microrganismos saprófitos que cresceram a 35‰ de salinidade, foi superior à concentração de microrganismos que cresceram a 17,5‰ de salinidade. Essa ascendência é menor na estação Ponte Cais (Figura 9), sendo muito pequena na estação Portas do Mar (Figura 8). Estes resultados demonstram a maior influência antropogénica nas estações Portas do Mar e Ponte de Cais relativamente à estação Ilha onde predomina a influência oceânica.

Para protecção do meio ambiente assim como da saúde pública, diversos países e instituições internacionais, estabeleceram critérios e normas de qualidade microbiológica para águas de uso recreativo, que se baseiam no controlo das concentrações dos indicadores clássicos de contaminação fecal, ao longo de um determinado período de tempo. Apesar de existirem diferenças, dependendo do país ou organismo que os formulou, todos têm em comum o permitir a avaliação da aceitação das águas para o uso recreativo, sob o ponto de vista sanitário.

Os critérios e normas anteriormente referenciadas estabelecem limites para cada microrganismo neles citado. No entanto estes critérios apresentam limitações, quanto à definição e quanto ao grau de satisfação das amostras. Assim, de acordo com estes critérios, uma amostra é considerada não satisfatória desde que apresente valores superiores aos estabelecidos nos critérios, e pouco satisfatória se supera somente algum dos limites.

Nas Tabelas 71 a 74, especifica-se a classificação das zonas estudadas no presente trabalho, onde se pode verificar que existem algumas diferenças dependentes do critério utilizado. A norma comunitária é menos permissiva, aparecendo zonas com qualidade sanitária pouco satisfatória, coincidindo estas zonas com aquelas que os critérios da Organização Mundial de Saúde incluíam entre as satisfatórias. Assim, os

valores obtidos para a estação Ilha não ultrapassam os limites estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde, mas ao aplicar os critérios recomendados pela Comunidade Europeia nesta estação, observa-se que 80% das amostras ultrapassam o recomendado quanto a coliformes totais e coliformes fecais .

No que respeita à qualidade microbiológica da água, expressa mediante o desvio padrão da distribuição lognormal, observa-se que os valores dos parâmetros coliformes totais, coliformes fecais e estreptococos fecais não são muito homogêneos (Tabela 64). Mujeriego *et al.* (1980a), obtiveram, para zonas na costa de Málaga (Espanha), valores de desvio-padrão (s) para coliformes fecais/100 ml, compreendidos entre 3,75 e 4,51 em estações situadas nas proximidades de descarga urbanas e na desembocadura do rio Guadalhorce. Em zonas onde não se verificam descargas, estes autores obtiveram valores de s inferiores ou iguais à unidade. Como se pode ver na Tabela 64, dependendo dos parâmetros indicadores considerados, podem-se obter classificações distintas da distribuição relativa dos valores de s. Assim, para o parâmetro coliformes totais, todas as estações apresentam valores de $s > 3$, mas considerando os coliformes fecais e estreptococos fecais há uma melhor discriminação das estações de amostragem, funcionando portanto como melhores indicadores que os coliformes totais.

Os resultados obtidos no presente trabalho para as estações de amostragem Portas do Mar e Ponte de Cais (situadas nas proximidades de saídas importantes de descargas domésticas), apresentam valores de s para coliformes fecais/100 ml de 4,81 e 3,44, respectivamente. Para a estação Ilha, (afastada de fontes poluidoras sistemáticas e significativas quanto ao volume descarregado) os valores de s para coliformes fecais/100 ml foi inferior a 2,32.

Aplicando os critérios estabelecidos por Mujeriego *et al.* (1980a) pode-se confirmar que as estações Portas do Mar e Ponte de Cais se encontram na proximidade de uma fonte poluidora altamente variável ou apresentam interferências devidas às condições hidrográficas. O valor de s registado para a estação Ilha, encontra-se

compreendido no intervalo de comportamento típico que a qualidade microbiológica das estações de amostragem devem apresentar.

Quanto ao comportamento relativo dos três grupos indicadores na área estudada, pode-se observar nas Figuras 13 e 14, que os coliformes totais ultrapassam as concentrações dos outros microrganismos indicadores em todas as amostragens. As percentagens de detecção dos indicadores de contaminação fecal, coliformes fecais, estreptococos fecais e colifagos foram em todas as zonas estudadas de 100%. Isto sugere que a carga microbiana é principalmente de origem fecal (Martinez-Manzanares, 1989). Concentrações de coliformes totais superiores às registadas para outros indicadores que se encontram mais directamente relacionados com as descargas de origem fecal, tal como os coliformes fecais e os estreptococos fecais, indicam que a contaminação não é exclusivamente de origem fecal (Abeyta, 1983; Al-Jeboury e Trollope, 1984). Ainda que os coliformes totais e coliformes fecais apresentem tempos de inactivação muito semelhantes (Borrego *et al.*, 1983), a proporção de coliformes totais em águas litorais é sempre muito superior à dos coliformes fecais. Isto deve-se à concentração média dos coliformes totais, que nas águas residuais vertidas é superior, entre 1 e 2 ordens de magnitude, à dos coliformes fecais (Bravo, 1985). A presença tão destacada dos coliformes totais nas águas costeiras poderia classificá-los como melhores indicadores de contaminação fecal que os coliformes fecais, no entanto, o carácter tão heterogénio do grupo dos coliformes totais faz que não sejam tão específicos da matéria fecal como os coliformes fecais e, portanto, a interpretação da sua presença em águas é, em muitas ocasiões, difícil de estabelecer (Geldreich, 1978), limitando a sua validade como indicadores da qualidade da água (Dutka, 1973). A relação coliformes totais coliformes fecais usa-se como índice aproximado para estabelecer a proporção de coliformes totais com origem exclusivamente fecal. Para um valor de CT/CF de «1», deduz-se que todos os coliformes totais são de origem fecal e não de outras fontes (solo, vegetais, entre outros). Nas Figuras 31A, 32A e 33A pode-se observar que os valores resultantes deste índice foram sempre superiores à unidade. Cornax (1991), calcularam um valor de 1,4 para o quociente CT/CF em fezes e 7,1 em águas residuais.

Relativamente aos valores do quociente CF/EF, estes manifestam uma estreita correspondência com a existência ou não de descargas residuais. A concentração relativa destes microrganismos permite avaliar a origem da contaminação (Geldreich e Kenner, 1969) e a distância do foco contaminante (Borrego *et al.*, 1982b; Bravo, 1985). Este quociente excede geralmente de 4,0 em águas residuais domésticas, enquanto que nas águas residuais com descargas fecais procedentes de animais homeotérmicos distintos do homem, chega a ser menor que 1 (Geldreich e Kenner, 1969).

No presente estudo observou-se que o valor do quociente CF/EF foi superior a «1» em 84% das amostras da estação Ilha, e em 96% nas restantes duas estações. Os valores calculados para este quociente encontravam-se entre 0,40 - 10,83 (Ilha); 0,77 - 40,30 (Ponte de Cais); 0,21 - 342,31 (Portas do Mar). Ávila (1986), calculou um intervalo de valores do índice CF/EF compreendido de 0,03 a 136,50, para uma estação de amostragem situada na costa malaguenha, onde se verificam descargas provenientes de um emissário submarino.

Nas estações situadas nas proximidades de descargas importantes de águas residuais, observa-se que os coliformes fecais encontram-se em concentrações superiores à dos estreptococos fecais, dado que nas águas residuais as concentrações de coliformes fecais excedem, entre 1 e 2 ordens de magnitude, as concentrações de estreptococos fecais (Bravo, 1985).

Em conformidade com estes resultados deduzimos, que as zonas analisadas estão afectadas por descargas predominantemente urbanas e a contaminação observada depende muito da distância do foco contaminante. São muito importantes os fenómenos de diluição, dispersão e inactivação bacteriana, dado que se observou que o quociente CF/EF é muito variável.

A distribuição espacial das concentrações médias dos microrganismos indicadores de contaminação fecal está representada na Figura 15, onde se põe em evidência uma diminuição da qualidade microbiológica na estação de amostragem

Portas do Mar. As abundantes descargas residuais procedentes dos colectores da cidade explicam os altos valores de microrganismos indicadores e patogénicos nesta estação.

Cachola e Lima (1984), no estudo sobre a qualidade das águas e recursos vivos da costa algarvia (verão 1984), registaram os valores mais elevados em coliformes fecais, quer para amostras de água quer para moluscos, em zonas situadas nas proximidades de emissários, o que indica que este parâmetro microbiano somente é útil como indicador em zonas de alta contaminação fecal com descargas contínuas e/ou recentes.

Os valores de coliformes fecais observados para a estação Portas do Mar são da mesma ordem de magnitude que os observados por outros autores em estudos sobre a qualidade microbiológica das águas na mesma zona da Ria Formosa (Barbosa, 1989; Baptista, 1990).

Os valores mínimos e máximos, expressos em ufc/100ml (Tabela 21) observados para a estação Portas do Mar, foram para os coliformes totais 1×10^4 e 3×10^7 , respectivamente. O valor mínimo registado para os coliformes fecais foi $1,2 \times 10^3$ e o máximo $2,8 \times 10^5$ (Tabela 22), o que corresponde a um valor de 1/100 das concentrações destes parâmetros em águas residuais (Cornax, 1991; Hall, 1994).

Em contrapartida, a estação Ilha não apresentou variações apreciáveis na sua qualidade microbiológica, durante o período de amostragem, tal como era de esperar, devido à sua localização afastada de saídas importantes e sistemáticas de efluentes domésticos.

Diferentes autores (Evison e Tosti, 1980; Fattal *et al.*, 1983; Vicente, 1986; Moriñigo *et al.*, 1989; Cornax *et al.*, 1990a), verificaram que a luz visível produz um forte efeito inactivante sobre as populações microbianas descarregadas por efluentes residuais. O efeito inactivante da luz é proporcional à intensidade e ao tempo de radiação (Gameson e Gould, 1975), e de substâncias dissolvidas na água (Fujioka *et*

al., 1981). Há também a considerar um efeito sinérgico com factores, como por exemplo a salinidade (Fujioka e Narikawa, 1982).

Há que assinalar que a Ria Formosa, atendendo à sua localização geográfica, sofre no Verão o efeito de um período de insolação longo. Este efeito inactivante poderá ser uma explicação para os resultados obtidos neste estudo quanto às concentrações dos microrganismos indicadores de contaminação fecal. Por outro lado estimativas quanto ao número de habitantes na cidade de Faro indicam um aumento substancial na chamada época alta que corresponde ao período de Verão. Esta situação pressupõe um aumento da carga microbiana descarregada na Ria, no entanto, no presente trabalho, não se registaram variações sazonais significativas, pelo que parece existir uma maior inactivação do microbiota alóctone, possivelmente devido ao alto grau de insolação registado no período de Verão, na zona estudada. Resultados das pesquisas realizadas por Barbosa (1989) e Baptista (1993), também não indicam aumentos na concentração de coliformes na época de Verão.

Classicamente, os coliformes fecais, têm sido considerados indicadores de contaminação fecal das águas, atendendo à sua presença em fezes, e à sua relação com os patogénicos entéricos como *Salmonella*, apresentando-se, geralmente em amostras de água, em concentrações superiores à do microrganismo patogénico (Dufour, 1977; Moriñigo *et al.*, 1990).

Vários autores observaram que a perda de capacidade de crescer em meios de cultura, reduz a detecção de bactérias entéricas em meios ambientes marinhos, no entanto tem sido sugerido que esta característica não retira a validade da utilização dos coliformes como indicadores de contaminação recente nesses ambientes (Elliot e Colwell, 1985).

Os microrganismos patogénicos apresentam percentagens de detecção muito menores que as obtidas para os indicadores, nas três estações de amostragem. O microrganismo patogénico mais frequentemente isolado em amostras de água foi *Pseudomonas aeruginosa*, o que foi igualmente observado por Martinez-Manzanares

(1989). A importância de pesquisar *P. aeruginosa* em amostras de água superficial usadas para fins recreativos reside, no risco potencial que este microrganismo pode constituir quanto a diferentes tipos de infecção, particularmente otites (Hoadley e Knight, 1975; Cabelli *et al.*, 1976; Borrego e Mariño, 1995). Por outro lado este microrganismo patogénico é também considerado, por alguns autores, um indicador da qualidade da água (Kenner e Clark, 1974; Bonde, 1977; Vicente, 1986).

A quantificação de *Salmonella* a partir de amostras de água, apresenta como problemas fundamentais, a presença em números muito baixos e a diminuição na eficiência relativa de detecção e enumeração, devidos a danos sofridos no meio ambiente aquático que não implicam perda de patogenicidade (Moriñigo *et al.*, 1992).

Em relação à *Salmonella*, há que considerar que o facto de não se detectar este microrganismo poderá significar que não se encontra na amostra estudada, porém, é de aceitar a eventualidade da incapacidade de detectá-la com o procedimento utilizado ou, ainda, a ocorrência de ambas as situações (Petrili, 1979). É possível que os resultados sejam influenciados pela diferente selectividade dos meios de cultura utilizados (Hoadley, 1981). Nunes (1990), nas pesquisas de *Salmonella* em moluscos bivalves, observou alterações no comportamento face a provas bioquímicas, o que dificulta a sua enumeração e identificação. O número de *Salmonella* excretada, por grama de fezes de doentes, pode alcançar valores de 1×10^{10} (Moriñigo *et al.*, 1986). O valor máximo registado em NMP/100ml foi 4600, numa amostra da estação Portas do Mar. O facto de não se terem obtido resultados coincidentes, na enumeração deste microrganismo em amostras de água e em moluscos, poderá, também, ser devido às diferenças na capacidade de sobrevivência das distintas serovariedades.

Os serotipos encontrados com maior frequência em Portugal são, *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. virchow*, *S. saintpaul*, *S. derby* e *S. agona* (Bernardo, 1991).

Comparando os isolamentos em amostras do meio ambiente (Tabela 31) com os isolamentos em humanos em Portugal (Bernardo, 1991), constatou-se que todas as serovariedades citadas para os humanos, foram isoladas nas amostras de águas

estudadas, com exceção para *S. saintpaul* que foi isolada em amostras de molusco. Nos isolamentos feitos em águas da Ria Formosa, há que considerar as estirpes procedentes de animais homeotérmicos não humanos (efluentes de matadouros e granjas). Lafarga *et al.* (1991), identificaram 63 serovariedades de *Salmonella* nas águas residuais da cidade de Zaragoza (Espanha), sendo as mais frequentes: *S. ohio*, *S. enteritidis*, *S. infantis*, *S. panama*, *S. typhimurium*, *S. virchow*, *S. bredeney* e *S. muenchen*. Alonso *et al.* (1992) em estudos sobre a ocorrência de *Salmonella* em águas recreativas de Valencia (Espanha) referiram como mais frequentes os serotipos *S. anatum* (13,94%) e *S. bredeney* (12,98%). No presente trabalho, *S. virchow* foi a serovariedade isolada com maior frequência nas três estações de amostragem.

Candida albicans é um componente do microbiota intestinal de animais e aves e a sua ocorrência em águas naturais está associada a contaminação fecal (Buck e Bubucis, 1978). No meio aquático, leveduras do género *Candida*, encontram-se quase exclusivamente em águas com forte influência terrestre, pelo que poderão constituir bons indicadores de poluição (Van Uden, 1967).

Neste estudo não se registaram isolamentos significativos da levedura *Candida albicans*, possivelmente devido à metodologia utilizada para a confirmação deste microrganismo. É possível que a prova de formação do tubo germinativo não seja a mais adequada para microrganismos que se encontrem em meios ambientes desfavoráveis.

Vários autores observaram que os microrganismos indicadores não se apresentam, por um lado, correlacionados significativamente com os patogénicos, particularmente com os vírus entéricos e, por outro lado, a sua sobrevivência no meio aquático é baixa (Borrego *et al.*, 1983; Goyal, 1983).

Os coliformes totais e os fecais apresentam uma relação muito boa entre si, dado que estes microrganismos têm como origem comum as águas residuais.

Para a mesma zona de amostragem, outros autores obtiveram boas correlações entre estes dois parâmetros indicadores (Nunes, 1984a; Cachola e Sampayo, 1984; Baptista, 1993).

Os coliformes fecais também se correlacionam bem com os colifagos. Estas relações foram observadas por diferentes autores (Borrego *et al.*, 1983, 1987, 1990; Vicente, 1986; Martinez-Manzanares, 1989).

Há que salientar, que as correlações significativas entre os parâmetros estudados foram registadas em número reduzido, o que poderá ser consequência da complexidade e diversidade do ecossistema Ria Formosa. Atendendo à interferência de muitas variáveis não era de esperar relações lineares simples.

Igualmente, estudos precedentes (McFeters *et al.*, 1974; Vasconcelos e Shwartz, 1976) em experiências de sobrevivência em laboratório, os coliformes apresentaram um grau de inactivação superior, comparativamente com o resto dos microrganismos testados.

A baixa sobrevivência dos coliformes no meio ambiente aquático, invalida a sua possível utilização como indicadores da presença de microrganismos patogénicos bacterianos e víricos (Goyal *et al.*, 1978).

Vários autores isolaram microrganismos patogénicos em águas, nas quais as concentrações de coliformes fecais estavam em conformidade com os limites estabelecidos pelas normas (Goyal *et al.*, 1978; Moriñigo *et al.*, 1990).

Nas amostras menos poluídas da estação Ilha, obteve-se um incremento do número de amostras nas quais as contagens de estreptococos fecais e de colifagos C foram superiores às concentrações de coliformes fecais, apesar destes últimos microrganismos serem descarregados em maior concentração. Resultados similares foram também obtidos por Cornax (1991). Esta situação parece ser devida à distinta capacidade de sobrevivência (O'Keefe e Green, 1989).

Os estreptococos fecais, para além da sua maior persistência no meio ambiente aquático comparativamente com os coliformes totais e fecais, não se multiplicam em águas residuais ou em águas naturais poluídas (Geldreich e Kenner, 1969). Cabelli *et al.* (1982) relacionaram a incidência de anomalias gastrointestinais com a concentração de estreptococos na água.

No entanto, o tempo requerido para a sua enumeração selectiva e a existência de estreptococos fecais detectados em solos, vegetais e insectos (Clausen *et al.*, 1977) são os principais inconvenientes assinalados ao considerar estes microrganismos como um indicador ideal da poluição fecal.

Vários autores sugeriram a utilização de colifagos, como indicadores da presença tanto de patogénicos entéricos bacterianos como víricos (Grabow *et al.*, 1984; O' Keefe e Green, 1989). Havelaar e Hogeboom (1983) e APHA (1985), demonstraram que *Escherichia coli* C é a estirpe bacteriana mais adequada para a enumeração de colifagos em diferentes meios ambientes. Neste trabalho, os colifagos detectados sobre esta estirpe bacteriana foram isolados em todas as amostras analisadas, estando a sua concentração directamente relacionada com o nível de contaminação das águas. Em relação às concentrações de bacteriófagos específicos de *E. coli*, obtiveram-se títulos muito semelhantes aos descritos por Borrego *et al.* (1987). Verificaram-se, neste estudo, percentagens de detecção de 100% para as três zonas estudadas. Por outro lado, observou-se que o nível dos colifagos em todas as amostragens se apresentou muito estável, não apresentando flutuações dependentes da carga efluente. Resultados similares foram também observados por Borrego *et al.* (1982b). Estes autores registaram valores do quociente coliformes fecais e colifagos, que variam entre 0,09 - 65,94. Neste estudo registaram-se valores oscilando entre 0,77-19,30 (Ilha), 0,05-21,67 (Portas do Mar) e 0,20-18,97 (Ponte de Cais).

A maior sobrevivência dos colifagos em comparação com os coliformes fecais, a ubiquidade nas fezes humanas e de outros animais de sangue quente, o facto de estar presente quando o microrganismo patogénico também está e em concentrações

superiores à do microrganismo patogénico, fazem com que os colifagos possam constituir um indicador fiável da contaminação fecal no meio ambiente, apesar da sua ausência assim como a de outros indicadores clássicos não assegure a inexistência de microrganismos patogénicos oportunistas nas águas de banho (Cornax, 1991).

1.6. Métodos de enumeração

Vários autores constataram a existência de um incremento microbiano estacional, entre a temporada primaveril e a estival, em distintas áreas costeras (Gameson, 1980; Bravo, 1985). No presente trabalho, registaram-se, em relação ao Número Total de Bactérias, determinado por microscopia de epifluorescência, com alaranjado de acridina, dois «picos» anuais, um no verão e outro no inverno (Figura 10). Cunha *et al.* (1992) em estudos realizados na Ria de Aveiro (Portugal), observou um acréscimo nos meses mais quentes do ano do número total de bactérias enumeradas por microscopia de epifluorescência com alaranjado de acridina. Estes picos de abundância bacteriana podem ser devidos a um maior fluxo de nutrientes na época de inverno, devido à maior pluviosidade e, no verão, à maior temperatura da água, que contribui para a redução do tempo necessário para a formação de uma geração, e para um crescimento maior das populações fitoplanctónicas.

Em ambientes aquáticos, os microrganismos alóctones, sob a influência de vários factores, apresentam-se sob tensão (stressed) ou com danos subletais, que conduzem à incapacidade de crescer em meios selectivos utilizados rotineiramente para a sua detecção e enumeração (Borrego, 1994).

O valor predictivo das normas de salubridade, que se baseiam na avaliação quantitativa de determinados microrganismos que cresceram em placas ou em tubos múltiplos, é afectado pelo facto da enumeração por contagem directa, conduzir a resultados muitas vezes superiores aos obtidos através da enumeração de microrganismos cultiváveis em placa (Xu *et al.*, 1982; Grimes e Colwell, 1986)

Vários autores observaram que o método universalmente aceite do Número Mais Provável, não reflecte correctamente a poluição entérica das águas (Kott, 1966). Por outro lado, também se verificou um decréscimo grande no número de bactérias quantificáveis através do crescimento em placa, comparativamente aos valores obtidos por aplicação da contagem directa (Byrd *et al.*, 1991).

Assim, os métodos utilizados para determinar a qualidade sanitária de uma água deveriam permitir a recuperação das células fisiologicamente danificadas (Borrego, 1994).

A recuperação de bactérias de ambientes aquáticos é, frequentemente complicada atendendo à tendência que os microrganismos têm de se agruparem ou formarem microcolónias, em associação com detritos ou partículas de sedimento (Meadows e Anderson, 1968). Esta situação, conduz à subestimação do número de bactérias calculado através da enumeração pelo Número Mais Provável ou em placa (Wiebe e Hendricks, 1974; Sanchez *et al.*, 1994). Consequentemente, a separação destes agregados poderá resultar na recuperação de um número muito maior de microrganismos (Jannasch, 1965). Poderão assim ser obtidos melhores resultados, substituindo o processo de agitação das amostras por homogeneizador (Stevenson *et al.*, 1974). Por outro lado, as contagens de microrganismos viáveis omitem uma parte importante da população bacteriana, como por exemplo as bactérias fotossintéticas, de cultura difícil em laboratório (Esteve, 1981).

Os métodos de enumeração directa para estimar o número de bactérias são muito mais rápidos, dado que não necessitam de período de incubação para o desenvolvimento microbiano, conduzindo a estimativas mais fiáveis do número total de células, incluindo as não viáveis e as viáveis mas não cultiváveis (Kepner e Pratt, 1994).

Enumerações directas ao microscópio indicam valores superiores ao calculado através da enumeração de bactérias cultiváveis em placa. Por outro lado as técnicas de

enumeração em placas permitem examinar as propriedades e os tipos de organismos presentes.

A contagem directa com alarajado de acridina é um dos vários métodos que permite enumerar todas as células existentes numa amostra, ultrapassando as dificuldades verificadas com os métodos de cultura convencionais, mas por outro lado, não permite demonstrar a viabilidade das células enumeradas. O uso do microscópio de epifluorescência, aplicando alarajado de acridina como fluorocromo (Hobbie *et al.*, 1977) é utilizado largamente para determinar o número total de microrganismos no meio ambiente (Pettipher e Rodrigues, 1982).

A microscopia de varrimento possibilita também a enumeração de todos os microrganismos presentes na amostra examinada. Dá informações sobre a morfologia do microrganismo e ainda sobre a forma de organização, por exemplo, a presença de microcolónias e outras formas de agregação (Kolbel-Boelke *et al.*, 1988). No entanto, esta técnica tem como desvantagens a impossibilidade de identificação taxonómica e informação quanto ao seu metabolismo (Kolbel-Boelke *et al.*, 1988).

Os resultados obtidos permitem verificar uma grande diferença, entre os valores calculados para os microrganismos heterotróficos aeróbios totais, cultivados em placa e o Número Total de Bactérias, calculado através do método de coloração com alarajado de acridina. Nas três estações de amostragem, as contagens em placa apresentaram valores mais baixos em relação às contagens directas.

Neste estudo, empregou-se a microscopia de varrimento para comprovar alguns resultados obtidos na estimação do Número Total de Bactérias. As microfotografias permitem ilustrar a diferença existente entre as três estações, quanto à abundância. Através das figuras obtidas no microscópio electrónico de varrimento, foi possível observar que as amostras correspondentes a situações onde se registou, através da enumeração do Número Total de Bactérias (microscopia de epifluorescência), um número muito elevado de bactérias, correspondiam a figuras onde se detectava a presença de matéria particulada e, por consequência, um grande número

de bactérias aderidas (Figuras 12B e 12C). Uma explicação possível é a ressuspensão de material sedimentado, como se deduz do material particulado observado nas figuras registadas com auxílio do microscópio de varrimento. Os microrganismos na água residual encontram-se, geralmente, adsorvidos sobre partículas de matéria em suspensão, possibilitando a sua sedimentação (Jones, 1971; Dutka e Kwan, 1980) e acumulando-se nos sedimentos (Pellet *et al.*, 1983). As bactérias que sedimentam, ficam sujeitas a fluxos verticais e podem ser ressuspendidas na coluna de água, por uma série de forças físicas, nomeadamente tormentas, navegação, correntes, acção das ondas, pesca, bioturvações (Grimes, 1975; Duedall *et al.*, 1983).

2. MOLUSCOS BIVALVES COMO INDICADORES DE CONTAMINAÇÃO

A avaliação da qualidade microbiológica das águas onde se cultivam moluscos, como forma de garantir a salubridade dos moluscos nelas criados, é uma prática muito comum. No entanto, este procedimento garante de forma muito indirecta esta qualidade, pois não existe uma relação constante entre o conteúdo microbiológico de moluscos filtradores e da água em que vivem, devido à influência de muitos factores (Mesquita, 1989).

A Ria Formosa é uma zona muito importante para a produção de moluscos bivalves, pois já foram atingidos valores na ordem dos 95% do total da produção nacional (Cachola, 1990). Uma extensa zona de cultivo destes moluscos encontra-se sob a influência dos efluentes domésticos. Por essas razões, no presente trabalho, realizou-se um estudo comparativo da microbiologia dos moluscos com as densidades bacterianas nas águas de cultivo.

Os moluscos bivalves, especialmente os filtradores, como as ostras e mexilhões, devido à sua capacidade de filtração de grandes volumes de água, podem reter os microrganismos que se encontram na água onde vivem (Trollope, 1984).

Os moluscos bivalves que cresceram em águas poluídas podem transtimir infecções como a febre tifóide, cólera, hepatite, e várias formas de gastroenterites

(Ferreira e Cachola, 1975; Wood, 1976; Bryan, 1980; Plusquellec *et al.*, 1984) pois os microrganismos patogénicos, concentrados através da água contaminada, têm possibilidade de se manterem viáveis no músculo do molusco (Nunes, 1990) e estes organismos são habitualmente consumidos crus ou ligeiramente cozinhados.

Outro efeito da poluição por efluentes urbanos é a eventual presença, no tecido muscular do molusco, de estirpes bacterianas resistentes aos antibióticos. Cooke (1976) observou que 73% dos coliformes isolados de moluscos eram resistentes a um antibiótico pelo menos e 45% tinham a capacidade de transmitir essa resistência.

Em conformidade com as Directivas Comunitárias (CEE-79/923 e CEE-91/492) e a legislação nacional (Portugal - Decreto-lei 74/90), a avaliação do grau de contaminação dos moluscos bivalves faz-se considerando o conteúdo microbiano quanto ao número de coliformes fecais e a presença de *Salmonella* no músculo e líquido intervalvar.

Analisando os resultados obtidos neste estudo pode-se verificar que a qualidade microbiológica dos moluscos está fortemente afectada, mesmo quando se trata das amostras da estação Ilha, que se encontra mais afastada de fontes poluidoras sistemáticas. Os valores máximos foram obtidos em amostras da estação Ponte de Cais.

Baptista (1990), em estudos realizados em *Ruditapes decussatus* L., na Ria Formosa, com amostragens mensais, de Abril a Setembro de 1989, em condições de baixa-mar, registou concentrações (NMP), de coliformes totais e coliformes fecais, por 100 g de músculo e líquido intervalvar, compreendidas entre (um valor mínimo de) 4300 e (um máximo superior a) $1,1 \times 10^6$.

No presente trabalho, os valores mínimos obtidos em amostras de *Mytilus edulis*, são da mesma ordem de magnitude comparativamente com os dados registados por Baptista (1990). As concentrações máximas observadas diferem em uma e duas ordens de magnitude, respectivamente, para os coliformes totais e fecais.

Ambos os resultados indicam que os moluscos estudados eram impróprios para consumo humano directo. Trabalhos desenvolvidos por Cachola, durante o período de 1990 a 1995 (dados não publicados), em amostras de *Ruditapes decussatus* e *Cerastoderma edule*, colhidas na zona de Faro, indicam também altos níveis de contaminação, utilizando como indicadores os coliformes fecais.

A Directiva Comunitária nº 91/492, estabelece o limite de 6000 coliformes fecais em 100 g para que os moluscos sejam aceites para depuração. Verificou-se que 80% das amostras estudadas ultrapassaram este limite.

Salmonella foi isolada em 30% das amostras, o que confirma o risco potencial que constitui o consumo destes moluscos, tendo em consideração as limitações observadas quanto ao processo de depuração. Martinez-Manzanares (1989), observou que o processo de depuração de *Salmonella* depende muito da concentração acumulada pelo molusco. Se o nível é baixo a médio o processo é muito rápido. Em contrapartida para níveis altos de contaminação o processo de depuração prolonga-se por muito mais tempo. *S. saintpaul*, *S. worthington* e *S. heidelberg* foram as estirpes isoladas nas amostras de moluscos analisadas. *S. saintpaul* encontra-se entre os serotipos encontrados com maior frequência em humanos em Portugal, (Bernardo, 1990), o que confirma a origem da contaminação fecal humana das águas onde os moluscos amostrados cresceram.

A probabilidade de isolar este microrganismo patogénico aumenta quando a densidade de coliformes fecais aumenta. *Salmonella* foi isolada em amostras com concentrações elevadas em coliformes fecais. Estes resultados foram também divulgados por Jehl-Pietri *et al.* (1991) a partir de estudos em *Cassostrea gigas*, *Mytilus edulis* e *Mytilus galloprovincialis* desenvolvidos em zonas de crescimento natural ou em viveiros na costa francesa. No entanto estes autores isolaram *Salmonella* numa amostra na qual os coliformes fecais não ultrapassaram o limite de 300 coliformes fecais. Pesquisas feitas no estuário do rio Tejo por Nunes (1990) utilizando os moluscos *Cerastoderma edule*, *Scrobicularia plana* e *Mytilus edulis*, confirmam

esta relação quanto à presença de *Salmonella* em amostras com altos teores colibacilares, assinalando por outro lado que o facto deste microrganismo patogénico não ser detectado não garante que este esteja ausente nas amostras estudadas, tomando em consideração os danos sofridos pelos microrganismos alóctonos em ambientes hostis e às limitações das metodologias de pesquisa.

No presente trabalho observou-se uma grande variabilidade quanto a taxas de acumulação, conforme se pode observar nos valores máximos e mínimos registados para o factor de concentração (Tabela 61).

Mesquita (1988), registou variações no balanço da acumulação-eliminação por parte de *Mytilus edulis*, de acordo com o nível de contaminação na água. Em águas muito poluídas verifica-se uma taxa de acumulação alta e uma taxa baixa quando em contacto com águas menos poluídas.

Cabelli e Heffernan (1970), verificaram que a acumulação e a eliminação, estão dependentes do estado fisiológico dos bivalves, que por sua vez estão sob a influência de condições ambientais, como a turbidez, temperatura e salinidade.

Plusquellec *et al.* (1990) em trabalhos, realizados ao longo de um ano, na costa francesa, com *Mytilus edulis* localizados numa área sob a influência de contaminação urbana, observaram que moluscos cultivados em águas com baixo grau de poluição, menor a 100 CF/100ml apresentaram concentrações destes microrganismos na sua carne e líquido intervalvar que não permitiam a sua utilização para consumo humano directo.

Segundo se pode verificar na Tabela 61, existe um factor de concentração entre água e moluscos, no que se refere a coliformes totais, coliformes fecais e estreptococos fecais.

As concentrações bacterianas na carne do molusco são frequentemente superiores à concentração na água circundante (Martinez-Manzanares, 1989; Baptista,

1990; Nunes, 1990; Plusquellec *et al.*, 1990; Cachola, 1990-1995, dados não publicados).

As concentrações microbianas registadas, neste estudo, para os coliformes totais, coliformes fecais e estreptococos fecais foram em todas as amostragens superiores nas amostras de molusco, relativamente às amostras de água. Verificou-se que a taxa de acumulação no organismo filtrador depende do microrganismo considerado, o que foi também constatado por Plusquellec *et al.* (1983) e Martinez-Manzanares (1989) em estudos, laboratoriais, desenvolvidos no molusco *Chamelea gallina*.

Na Tabela 61 pode-se verificar que os valores médios calculados para o factor de acumulação são maiores para os estreptococos fecais, no entanto o valor máximo da concentração foi observado para os coliformes fecais. Esse valor foi observado no Verão na estação Ponte de Cais, o que poderia ser explicado pela taxa baixa de sobrevivência dos coliformes fecais em meios aquáticos (Cornax, 1991), ou pela maior taxa de filtração do molusco a altas temperaturas.

Parece que o factor de concentração é consequência de uma absorção diferencial ou uma selecção das bactérias por parte do molusco de acordo com as dimensões ds bactérias. Os estreptococos agrupados em cadeias, têm um tamanho maior que os bastonetes gram-negativos.

Uma outra interpretação está relacionada com a melhor adaptação dos estreptococos às condições hostis do tracto digestivo dos moluscos (Plusquellec *et al.*, 1983).

Neste estudo, registaram os valores mais elevados do factor de concentração no Verão, mas não parece que a acumulação nos moluscos seja afectada pelo decréscimo da temperatura observado nas águas da Ria Formosa nos meses de Outono e Inverno, dado que se registaram nestes meses taxas de acumulação da mesma ordem de magnitude que nos meses mais quentes, possivelmente pela capacidade de *Mytilus*

edulis se manter activo até temperaturas muito baixas. Ayres (1975) observaram que o molusco pode estar activo a temperaturas até aos 0° C.

Plusquellec *et al.* (1990), também não verificaram que a acumulação em *Mytilus edulis* fosse afectada por temperaturas da ordem de 4,5 a 9° C.

Cabelli e Heffernan (1971), observaram que a capacidade de eliminação dos microrganismos está dependente da estação do ano em que os moluscos são recolhidos.

Através duma análise de variância (Tabela 63) pode-se verificar que existem diferenças significativas entre as médias obtidas em amostras de água comparativamente com as amostras de mexilhão. Por outro lado o coeficiente de variação para as amostras de mexilhão é menor que o registado para as amostras de água. Plusquellec *et al.* (1990) também calcularam coeficientes de variação mais baixos em amostras de *Mytilus edulis* tomadas nas quatro estações do ano.

Os resultados obtidos, neste estudo, baseiam-se num número pequeno de amostras, que se referem a estações de amostragem que sofrem a influência de factores ambientais vários e complexos, no entanto, estes resultados conjuntamente com os registados por outros autores (Trollope e Al Salihi, 1984; Mesquita, 1988; Martinez-Manzanares, 1989; Baptista, 1990; Nunes, 1990; Plusquellec *et al.*, 1990), permitem avaliar o papel dos moluscos na monitorização da qualidade microbiológica das águas. Devido à sua habilidade em concentrar e reter os microrganismos presentes, na água circundante, estes organismos poderam ser utilizados na detecção de microrganismos patogénicos e para a avaliação quantitativa da poluição na água.

Adicionalmente há a assinalar a diminuição da variabilidade quando se compara os resultados obtidos na água com os do molusco (Plusquellec *et al.*, 1990).

A capacidade do molusco concentrar os estreptococos fecais parece não ser afectada pelas variações estacionais. Este resultado também observado por Plusquellec

et al. (1990), reforça a validade dos estreptococos fecais como um indicador ideal para a monitorização da poluição fecal através da análise de moluscos.

A ausência de uniformização nos métodos analíticos para estreptococos fecais é uma das dificuldades que se enfrenta no emprego deste indicador, em análises de rotina, para avaliação da qualidade das águas e moluscos.

Por conseguinte, e atendendo ao grande interesse de dispor de um indicador de eleição para determinar o grau de poluição de águas e moluscos em análises de rotina, no presente trabalho avaliaram-se comparativamente diferentes meios selectivos para estreptococos fecais.

3. ESTUDO COMPARATIVO DE MEIOS SELECTIVOS PARA O CRESCIMENTO DE ESTREPTOCOCOS FECAIS

As directivas da Comunidade Europeia (CEE, 1976; CE, 1994) referentes à qualidade microbiológica das águas de recreio, especialmente água para banho, indicam parâmetros microbianos para analisar e determinar o nível de poluição destas águas. Um deles é o estreptococo fecal, cuja utilidade como indicador tem sido repetidamente avaliada e tem sido aceite por causa da incapacidade para se multiplicar em águas naturais (Slanetz e Bartley, 1965; Evison e Tosti, 1980; Gauci, 1991). Contudo, a dificuldade de encontrar um procedimento adequado para a sua enumeração é a principal falha para o uso generalizado deste grupo microbiano.

Dos dois procedimentos recomendados pela CEE, para a quantificação dos estreptococos fecais, as técnicas dos tubos múltiplos e filtração por membrana foram comparadas no presente estudo com base nas seguintes características: crescimento qualitativo, selectividade e eficiência de recuperação. O uso da técnica dos tubos múltiplos, como recomendada pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1982) usando exclusivamente o caldo de Rothe, apresenta falta de selectividade para a análise dos estreptococos fecais, dado que este meio permite o crescimento de outros

microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos. Obtem-se um aumento na selectividade quando se usa o teste confirmativo com caldo de Litsky no decorrer da técnica dos tubos múltiplos, embora o número de resultados falsos-positivos obtidos sejam muito altos (Buck, 1969). Além disso, esta técnica usando os caldos de Rothe e Litsky apresenta uma alta eficiência de recuperação (81,2%) (Tabela 58). Porém, a técnica dos tubos múltiplos é muito demorada (mais de 4 dias) e requer um número muito grande de consumíveis de laboratório. A técnica de filtração por membrana é fácil, barata, pouco demorada (1 a 2 dias) (Volterra *et al.*, 1986), permite o processamento de amostras de grande volume e a execução imediata de testes bioquímicos a partir das colónias isoladas das membranas semeadas em meios selectivos (Sinton *et al.*, 1993a).

Por estas razões, este estudo centrou-se na comparação de meios selectivos para a enumeração de estreptococos fecais pela técnica de filtração por membrana. Pelos resultados deste e outros estudos, verifica-se que ainda não é possível utilizar um meio de cultura óptimo, para a enumeração de estreptococos fecais em amostras de água, devido à heterogeneidade taxonómica e fisiológica dos microrganismos incluídos neste grupo. Assim, o objectivo deste estudo consistiu em comparar vários meios de cultura selectivos e, com base nos resultados obtidos, propôr o método mais adequado para a enumeração de estreptococos fecais em amostras de água do mar.

Através dos resultados obtidos no estudo em laboratório, do crescimento qualitativo de culturas puras (Tabela 52), pode-se verificar que somente os meios mEnterococcus e KF são completamente selectivos, e que os meios de cultura utilizados para isolar e enumerar os estreptococos fecais, tais como os agares Bilis Esculina (BE), Kanamicina-Esculina-Azida (KEA), e Acetato de Tálio (Barne) permitem o crescimento de estirpes pertencentes aos géneros *Staphylococcus*, *Pseudomonas* e *Candida*, bem como diferentes espécies de enterobactérias. Outros autores indicam que estes meios podem permitir o crescimento de *Staphylococcus*, *Proteus*, *Corynebacterium*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Listeria* e *Candida* (Lachica e Hartman, 1968; Pavlova *et al.*, 1972; Isenberg *et al.*, 1970; D'Aoust e Litsky, 1975;

Yoshpe-Purer, 1989). Contudo, deve-se considerar, que não se pode determinar a especificidade do meio de cultura através do crescimento qualitativo de estirpes puras em diferentes meios, visto que a presença de organismos acompanhantes, que se desenvolvem em diferentes níveis de concentração em amostras naturais, pode influenciar as qualidades de isolamento dos meios testados.

Um meio de cultura é selectivo quando a sua capacidade de redução do microbiota acompanhante (background) é superior em 3 ordens de magnitude (Levin e Cabelli, 1972). Como pode ser visto na Tabela 53, os factores de redução obtidos para os meios testados é baixa, e nenhum deles preenche os requisitos de selectividade apontados por Levin e Cabelli (1972). A maioria dos meios de cultura formulados para enumeração selectiva de microrganismos do ambiente aquático, baseia a sua selectividade na incorporação na composição do meio de cultura de uma ou mais substâncias inibidoras; no caso específico dos estreptococos fecais, os inibidores mais usados são azida de sódio, violeta de etilo, acetato de tálio, Tween-80 e antibióticos, tais como ácido nalidíxico, kanamicina, para enumerar apenas alguns. Os inibidores são usados para conter o desenvolvimento do microbiota acompanhante, mas também podem inibir o desenvolvimento de estreptococos fecais alterados (Borrego, 1994). Como é referido por Levin *et al.* (1975), achamos que as variações sazonais podem influenciar os resultados de selectividade obtidos para os mesmos meios de cultura (Tabela 53). A fim de aumentar a selectividade dos meios de cultura convencionais, vários autores aumentaram a temperatura de incubação para cerca de 44° C, (Gauci, 1991; Volterra, 1991). Os resultados obtidos nestes estudos indicam que as temperaturas de incubação restrictivas (44° C) reduzem geralmente o número de colónias típicas, devido à incapacidade de algumas espécies de estreptococos fecais se desenvolverem a esta temperatura, verificando-se também uma redução no crescimento de vibrios marinhos, que têm um crescimento óptimo a 36° C (Volterra, 1991). Este autor verificou também que a incubação a 42° C melhora as qualidades do agar KF, mas não foram encontradas diferenças significativas para o agar mEnterococcus .

A percentagem de estreptococos fecais falsos-positivos encontrada, neste estudo, é alta para quando se utilizaram os agares Bilis Esculina (93,2%), Mitis-Salivarius (87%), de Barne (32,4%), Bilis Esculina Azida (31,7%) e Kanamicina Esculina Azida (19,5%) (Tabela 54). Apenas os meios mEnterococcus e KF mostraram uma boa especificidade, pois em ambos os meios mais de 90% de colónias típicas foram confirmadas como estreptococos fecais e nenhuma das colónias não típicas foram identificadas como sendo estreptococos fecais. A Tabela 55, descreve a identificação efectuada ao nível do género de colónias típicas que cresceram nos diferentes meios selectivos testados.

A percentagem de confirmação de enterococos e estreptococos fecais são semelhantes para os meios mEnterococcus e KF, e nenhum deles permitiu o desenvolvimento de microrganismos Gram-negativos. O principal microbiota de acompanhamento desenvolvido nestes meios de cultura foram *Aerococcus/Micrococcus* (1,25% para mEnterococcus) e *Staphylococcus* (1,25% para mEnterococcus e 1,5% para o agar KF). Foram divulgados resultados semelhantes por Kenner *et al.* (1961) e Volterra *et al.* (1986). As espécies identificadas a partir das colónias típicas desenvolvidas em agar mEnterococcus ou KF são *Enterococcus faecium* (42,5% para mEnterococcus e 54,5% para KF), *E. durans* (27,5% para mEnterococcus e 16,7% para KF) e *E. faecalis* (17,5% para mEnterococcus e 24,2% para KF). Percentagens semelhantes de confirmação destas espécies foram referidas por Yoshpe-Purer (1989), usando os mesmos meios de cultura e amostras de água do mar em Israel. Em complemento, Bayne *et al.* (1983), mostraram que os componentes predominantes do grupo de estreptococos fecais no meio ambiente aquático são *E. faecium* e *E. durans*.

Vários autores referiram que o agar mEnterococcus poderá permitir o desenvolvimento de lactobacilos (Volterra *et al.*, 1986) e estreptococos não fecais (Pavlova *et al.*, 1972). Além disso, existem agora algumas dúvidas se este meio permite o isolamento de estreptococos fecais ou enterococos. Slanetz e Bartley (1957) designaram originalmente este meio de cultura para a enumeração de enterococos, e é o meio actualmente recomendado nas edições 17ª e 18ª de "Standard Methods"

(APHA, 1989; 1992) para a enumeração de estreptococos fecais em águas marinhas e doces. Por outro lado, parece que os estreptococos fecais de fezes animais, tais como *Streptococcus bovis* e *E. equinus* são dificilmente isolados neste meio de cultura (Shuval *et al.*, 1973; D'Aoust e Litsky, 1975). Contudo, Pagel e Hardy (1980) indicam que mEnterococcus foi o único meio que mostrou capacidade de assegurar o crescimento de espécies de estreptococos fecais e enterococos. Estes autores sugeriram a possibilidade de usar a contagem de colónias típicas desenvolvidas nesse meio, para estimar a população de enterococcus e o número total de colónias, para obter a contagem de estreptococos fecais.

Analogamente, foi indicada a possibilidade de isolamento em agar KF de *Pediococcus* e espécies de *Lactobacillus* (Kenner *et al.*, 1960), *Staphylococcus aureus* (Mossel *et al.*, 1957), *Aerococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Escherichia coli* e estreptococos não fecais, tais como *S. cremoris* e *S. sanguis* (Volterra *et al.*, 1986; Pagel e Hardy, 1980), e *Aerococcus*, vibrios marinhos, *Pasteurella*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Moraxella*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas* e espécies de estreptococos não-fecais (Yoshpe-Purer, 1989). Por esta razão, Slanetz e Bartley (1964) e Yoshpe-Purer (1989) consideraram este meio como inadequado para recuperar estreptococos fecais de amostras de água do mar e de mariscos. É controverso o papel do agar KF no desenvolvimento de *S. bovis* e *S. equinus*, pois alguns autores indicam falhas na recuperação de estreptococos fecais provenientes de fezes de animais (Slanetz e Bartley, 1964; Switzer e Evans, 1974; Pagel e Hardy, 1980; Yoshpe-Purer, 1989), ao passo que outros isolaram *S. equinus* e *S. bovis* em agar KF (Kenner *et al.*, 1960; Geldreich e Kenner, 1969; Pavlova *et al.*, 1972; D'Aoust e Litsky, 1975; Brodsky e Schiemann, 1976).

No presente trabalho, pode-se notar que *S. equinus* se desenvolveu optimamente nos agares mEnterococcus e KF, em testes de crescimento de culturas puras (Tabela 52); contudo, quando *S. equinus* foi inoculado em água do mar filtrada, o poder inibidor destes meios (mEnterococcus e KF) impediu o crescimento destas espécies. Isto pode ser explicado pela baixa capacidade de sobrevivência desta espécie fora do tracto gastrointestinal (Kjellander, 1960) ou em meios ambientes aquáticos

naturais (Borrego *et al.*, 1983; Sinton *et al.*, 1993b), e/ou pela fraca capacidade de crescimento, em meios selectivos, das suas células subletalmente danificadas (Grimes *et al.*, 1986).

As especificidades obtidas para os agares BÍlis Esculina e Kanamicina Esculina Azida foram baixas, dado que apenas 68,3% e 80,5% respectivamente de colónias típicas, assim consideradas pela presença de densos halos pretos indicativos da hidrólise da esculina, terem sido confirmadas como sendo estreptococos fecais. Apesar de ter sido provado que a hidrólise da esculina constitui um meio digno de confiança para separar estreptococos do grupo D de outros estreptococos (Facklam e Moody, 1970; Deibel e Hartman, 1984), este teste não deve ser considerado como critério essencial de identificação, pois um grande número de microrganismos pode hidrolisar a esculina, incluindo espécies de *Vibrio*, *Pseudomonas* e *Staphylococcus* (Yoshpe-Purer, 1989). Estes meios apresentam uma baixa capacidade de discriminação entre colónias típicas e não-típicas de estreptococos fecais, e permitem o crescimento de numerosas colónias minúsculas (Pavlova *et al.*, 1972; Volterra *et al.*, 1986). O principal microbiota de acompanhamento que cresceu nestes meios foram os estreptococos não fecais, *Staphylococcus*, *Vibrio*, *Chromobacterium*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* e membros da família *Enterobacteriaceae* (Tabela 56). Foram referenciados em diversos estudos resultados semelhantes (Pavlova *et al.*, 1972, Isenberg *et al.*, 1970; D'Aoust e Litsky, 1975; Yoshpe-Purer, 1989). Também, Volterra *et al.*, (1986) detectaram, em amostras da costa mediterrânica, percentagens altas (mais de 30%) de bactérias em forma de bastonete que produziam colónias com aspecto similar ao dos estreptococos fecais (com um halo preto nas costas do filtro). Pelo contrário, Brodsky e Schiemann (1976) indicaram que o agar PSE possui uma alta selectividade para os enterococos, pois mais de 90% das colónias que cresceram nas membranas foram confirmadas como sendo estreptococos fecais e 86% foram confirmadas como enterococos. Além disso, estes autores mencionam uma vantagem adicional deste meio de cultura, baseando-se num periodo de incubação mais curto (24h). Similarmente aos resultados apresentados por Nowlan e Deibel (1967), o agar Phizer (PSE) permite o crescimento de *S. equinus* e *S. bovis* quer em culturas puras quer em amostras de água. Pelo contrário, nenhuma destas espécies puderam

desenvolver-se em agar KEA (Tabela 52 e 56). O meio mSD (agar mE e confirmação em agar esculina e ferro; EIA), proposto por Levin *et al.* (1975), baseia-se também na hidrólise da esculina como um marcador para estreptococos fecais. Este procedimento não foi testado no presente estudo por duas razões: (i) a necessidade de um método rápido sem um passo de confirmação, e (ii) a baixa especificidade apresentada por este procedimento para amostras do Mediterrâneo (Volterra *et al.*, 1986; Yoshpe-Purer, 1989).

A especificidade dos meios de Barne, BÍlis Esculina (BE) e Mitis-Salivarius é apresentada nas Tabelas 54 e 55. Todos estes meios possuem baixa especificidade, dado que apenas 6,8%, 13% e 67,6%; para os agares BE, Mitis-Salivarius e de Barne, respectivamente, das colónias típicas foram confirmadas como estreptococos fecais (Tabela 54). Os principais microrganismos de acompanhamento, ao nível do género, que se desenvolveram como colónias típicas eram Gram-negativos (52,3, 59,7 e 16,2%, respectivamente); *Staphylococcus* (40,9, 24,7 e 11,8%, respectivamente) e *Aerococcus/Micrococcus* (1,2% para agar Mitis-Salivarius) (Tabela 55). Não foi isolada nenhuma espécie de *Enterococcus* em agar BE, e foram isoladas somente três estirpes pertencentes a *Streptococcus spp.* As espécies isoladas com maior frequência através deste meio de cultura, foram *Staphylococcus spp.* (15,9%); *S. epidermidis* (9,1%) e *Vibrio parahaemolyticus* (9,1%). Na generalidade, as percentagens de detecção de cocos Gram-positivos, para além dos estreptococos, foram 40,9% , 20,4% para *Vibrio*, e 18,2% para enterobactérias. Este meio também permite o desenvolvimento de *Aeromonas*, *Moraxella*, *Pseudomonas* e *Flavobacterium* (Tabela 56). A fraca especificidade obtida é facilmente explicada dado que este meio é usado principalmente com fins confirmativos para demonstrar a hidrólise da esculina em isolamentos feitos a 37° C (APHA, 1992).

O espectro de espécies microbianas isolado a partir do agar de Barne foi mais baixo do que o obtido em agar BE, incluindo 11,8% de *Staphylococcus*, 4,4% de *Vibrio* e *Pseudomonas*, 5,9% de enterobactérias e apenas um isolamento correspondeu a *Morganella morganii* (Tabela 56). Pelo contrário o agar Mitis-Salivarius permitiu o aparecimento de vasto número de espécies de *Staphylococcus* (24,7%), incluindo

Staphylococcus spp., *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. xylosum*, *S. lentus*, e *S. cohnii*; bem como enterobactérias (42,8% dos isolamentos) tais como, *Klebsiella oxytoca*, *K. pneumoniae subsp. pneumoniae*, *K. pneumoniae subsp. ozaenae*, *Enterobacter cloacae*, *E. intermedium*, *E. agglomerans*, *E. sakazakii*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *E. adecarboxylata* e *Yersinia intermedia* (Tabela 56). Outro microbiota acompanhante, que se desenvolveu neste meio, era composto por estreptococos não fecais (6,5%), *Pseudomonas* (6,5%), *Vibrio* (5,2%), *Pasteurella* (2,6%), *Achromobacter* (2,6%) e *Micrococcus* (1,3%). Por outro lado, neste mesmo meio, quer as espécies de enterococos quer as estreptococos fecais foram isoladas em percentagens baixas (7,8% e 6,5%, respectivamente). Estes resultados podem ser justificados pela composição do meio, pois foi concebido para o isolamento de estreptococos viridans (Deibel, 1964; Clausen *et al.*, 1977). Alguns autores consideram *S. mitis* e *S. salivarius* como espécies de estreptococos fecais, por terem sido encontrados em grandes concentrações em fezes humanas (Moore e Holdeman, 1974). Contudo, há que ter em atenção que estas espécies são habitantes de tracto nasofaríngeo e usualmente agrupados com os estreptococos orais (Holt *et al.*, 1993).

A relação existente entre substâncias inibidoras e indicadoras contidas nos meios testados, a sua selectividade e especificidade parece clara. Os meios contendo azida de sódio e cloreto de trifetil *tetrazolium* foram mais selectivos do que os que continham antibióticos e baseiam o seu poder de diferenciação colonial na hidrólise da esculina. Easterbrook e West (1987) confirmaram as mesmas conclusões, quando procederam a um detalhado estudo comparativo para o isolamento de estreptococos do grupo D em mariscos.

A comparação dos métodos para enumeração de estreptococos fecais foram conduzidos estudando a sua eficiência relativa de recuperação, onde o título máximo obtido entre os métodos aplicados à mesma amostra foi considerado como valor de referência (100%). Na Tabela 58, expressa-se a eficiência relativa de recuperação de 6 métodos de enumeração, utilizando 13 amostras de água do mar. Os valores médios mais altos encontrados para o isolamento de estreptococos fecais foram obtidos no

meio de agar mEnterococcus, pelo método de filtração por membrana (84,7%); e nos caldos Rothe-Litsky, com a técnica do NMP (81,2%). A hierarquização ("ranking") dos métodos testados foi a seguinte: mEnterococcus > NMP (Rothe-Litsky) > Barne > KF > KEA > BE. Contudo, se aplicarmos as taxas de especificidade dos meios (Tabela 54) e considerando a especificidade NMP (Rothe-Litsky) obtida por Volterra *et al.*, (1986) (86,7%), a hierarquização fica estabelecida como se segue : mEnterococcus (82,6%) > NMP (Rothe-Litsky) (70,4%) > KF (69,0%) > KEA (53,0%) > Barne (48,2%) > BE (40,3%). Resultados semelhantes foram obtidos por Volterra *et al.* (1986), que detectou que NMP (Rothe-Litsky) e o agar mEnterococcus seriam os métodos que consentiam os isolamentos mais elevados em amostras de água do mar Adriático, sendo os meios mSD e PSE os que apresentam valores mais baixos. Pelo contrário, nas amostras de água do mar Tirreno, os isolamentos mais baixos foram alcançados usando o método do NMP (Rothe-Litsky). Levin *et al.* (1975), comparando a eficiência de recuperação do meio mSD com as de PSE e KF, em amostras de água, revelam que nem os isolamentos em meio PSE, nem em KF se aproximam daqueles obtidos com o método mSD, apesar dos isolamentos por PSE e KF se aproximarem entre si. Gauci (1991) usando amostras de água do mar Mediterrâneo, concluiu que os isolamentos em agar mEnterococcus conduzem a contagens de estreptococos fecais mais altas comparando com os obtidos em agar KF (médias de 88 contra 11). Porém, Pagel e Hardy (1980) analisando em paralelo amostras de várias proveniências e tendo utilizado cinco meios de cultura (PSE, mEnterococcus, KF, mSD e SB), encontraram para esgoto bruto, a ordem de eficiência de recuperação que se apresenta a seguir: KF > mEnterococcus > SB > PSE > mSD; e para amostras de efluente primário: mEnterococcus > SB > KF > PSE > mSD; para os 'descarregadores de tempestade': KF > mEnterococcus > PSE > mSD. Portanto, a hierarquização global foi: mEnterococcus = KF > SB > PSE > mSD. Estas discordâncias entre os resultados obtidos em relação à eficiência de recuperação foram apontados anteriormente por diferentes autores (D'Aoust e Litsky, 1975, e Brodsky e Schiemann, 1976), que mencionaram isolamentos significativamente maiores de estreptococos fecais em agar KF comparando com o agar PSE. Contudo, Dutka e Kwan (1978) não encontram diferenças significativas entre as contagens nos meios PSE e KF em amostras de lagoas e esgotos. Estas diferenças podem ser resultado de

diferentes proveniências das amostras originais ou motivadas por variações sazonais, tais como a temperatura da água ou chuvas (Levin *et al.*, 1975). Noutros estudos, em amostras de água de mar Mediterrâneo, PSE e mEnterococcus consentiram a mais alta contagem de colónias, enquanto as contagens mais baixas foram detectadas pelo método do NMP e em membranas colocadas em meio de agar KF (Volterra *et al.*, 1985).

A precisão num método de enumeração microbiológica tem duas fontes de erro, erros experimentais que dependem da manipulação e erros na amostragem. Os primeiros são facilmente resolvidos por padronização dos métodos associada a uma manipulação cuidadosa (Avila *et al.*, 1989). Os erros na amostragem, contudo, podem só ser minimizados aumentando o número de amostras e o número de replicados (El-Shaarawi e Pipes, 1982). O teste de precisão, para os métodos de enumeração calculado pelos valores do índice de dispersão de Fisher (D^2), encontra-se expresso na Figura 19. Mais de 80% dos valores de mEnterococcus ficam contidos dentro do limite $P=0,5$ e apenas uma amostra excede o limite $P=0,05$. Isto indica que a variabilidade experimental de amostras é menor do que o esperado, pelo acaso devido às alterações na preparação do meio de cultura, à natureza dos agentes inibidores ou outras causas de diferentes origens (Dutka *et al.*, 1979). Os outros meios testados mostraram precisões mais baixas, compreendidas desde BE (77%), KF (62%) e KEA, Mitis-Salivarius e Barne com 61,5% das amostras incluídas dentro do limite $P=0,5$. Todas estas percentagens são mais altas do que aquelas obtidas por Levin *et al.* (1975) para agar mSD, pois apenas 39% das amostras ficaram compreendidas dentro do limite $P=0,5$. De modo a ordenar os meios de cultura, avaliando a precisão, foram consideradas as percentagens de amostras que excederam os limites de 0,05, 0,025 e 0,005, obtendo a seguinte ordem: mEnterococcus > BE > KF > KEA > Mitis-Salivarius > Barne.

A exactidão dos quatro meios (mEnterococcus, KF, BE e KEA) foi avaliada em paralelo, usando culturas puras de três estirpes de referência, sob duas condições experimentais (água do mar e água doce) (Tabelas 58 e 59). As contagens médias nos meios de cultura testados variaram, para os diferentes tipos de amostra e estirpes, de

74,3 a 116,3% para o agar mEnterococcus; de 68,3 a 111,7% para o agar KF; de 66,7 a 114,7% para o agar BE; de 71,3 e 87,4% para o agar KEA. Analisando os resultados por tipo de suspensão e stress submetido, apenas se registou para o agar BE uma diferença significativa ($p \leq 0,01$), entre a suspensão de água do mar (91,5%) e a suspensão de água doce (77,1%). Nas suspensões de água do mar (Tabela 58), o meio mais eficiente para a recuperação de estreptococos fecais foi o agar mEnterococcus (95%) e o pior foi KEA (84%), apesar de todos terem atingido os requisitos de exactidão propostos por Levin e Cabelli (1972), estabelecidos numa recuperação mínima de 75%. Nas piores condições de tensão (stress), o crescimento de estreptococos fecais no meio de cultura de referência (não selectivo) foi maior do que em meio de cultura selectivo. Contudo, houve situações nas quais as contagens, nos meios de cultura testados, aumentaram com tempo de exposição a um ambiente de tensão. Estes resultados sugerem que os danos para as células ocorrem durante a fase lag e que a percentagem de células danificadas é baixa depois de uma longa exposição a condições adversas. A diminuição na percentagem de células danificadas pode ser explicada tanto por recuperação como pelo fenómeno de inactivação subsequente ao dano celular (Hoadley, 1981; Borrego, 1994).

Em suspensões de água doce (Tabela 59), o meio de cultura mais eficiente foi o KF (92,2%), enquanto que o agar BE mostrou as piores aptidões (77,1%). Uma vez mais, todos os meios testados demonstraram possuir uma percentagem de recuperação superior a 75%. Contudo, se apenas considerarmos as estirpes de enterococos, o grau de eficiência altera-se, quer para as suspensões de água do mar quer para as de água doce, obtendo-se a seguinte ordenação: mEnterococcus > BE > KF > KEA para suspensão de água do mar; e KF > mEnterococcus > KEA > BE para as suspensões de água doce. Estas alterações na capacidade de recuperação pode ser causada pela influência da composição química da suspensão, pois que a eficiência de recuperação dos meios de cultura é afectada pela origem e natureza da amostra (Dufour *et al.*, 1981; Grabow *et al.*, 1981). As eficiências dos meios testados para a recuperação de *S. mitis* a partir de suspensões de água do mar e de água doce são muito semelhantes, variando entre 71,6 e 78,5% .

Na escolha do melhor método para enumerar os estreptococos fecais em amostras de água, foram considerados todos os atributos obtidos nos testes utilizados (Tabela 92). Num simples esquema de ordenação, o agar mEnterococcus apresenta o melhor conjunto de atributos, dado que apresentou a melhor exactidão, precisão e eficiência de recuperação. Por outro lado, este meio é bom na base da selectividade e especificidade. O uso do método de filtração por membrana com sementeira em agar mEnterococcus ou o método do NMP, utilizando conjuntamente os caldos de Rothe-Litsky, constituem os melhores procedimentos para a enumeração de estreptococos fecais em amostras de água.

TABELA 92. Avaliação das características dos meios selectivos testados através da aplicação do coeficiente de concordância de Kendall

Características	m Enterococcus	KF	BEA	KEA	Barnes'	BE	Mitis-Salivarius	Rothe-Litsky
-Crescimento qualitativo								
Estreptococos fecais	3	3	6	3	NT ^a	NT	3	
Outros	1,5	1,5	5	4	6	NT	NT	3
<u>Global</u>	<u>2,25</u>	<u>2,25</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>4,5</u>	<u>NT</u>	<u>NT</u>	<u>3</u>
-Selectividade	<u>3</u>	<u>2</u>	<u>6</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>7</u>	<u>8</u>	<u>1</u>
-Especificidade								
Falso-positivo	2,5	2,5	5	6,5	2,5	2,5	6,5	NT
Falso-negativo	2	1	4	3	5	6	7	NT
<u>Global</u>	<u>2,25</u>	<u>1,75</u>	<u>4,5</u>	<u>4,75</u>	<u>3,75</u>	<u>4,25</u>	<u>6,75</u>	<u>NT</u>
-Eficiência de recuperação								
Colónias típicas	1	4	6	5	3	NT	NT	2
Colónias verificadas	1	3	6	4	5	NT	NT	2
<u>Global</u>	<u>1</u>	<u>3,5</u>	<u>6</u>	<u>4,5</u>	<u>4</u>	<u>NT</u>	<u>NT</u>	<u>2</u>
-Precisão								
Ao limite 0,5	1	3	2	5	5	5	NT	NT
Ao limite 0,005	1	3	2	4	6	5	NT	NT
<u>Global</u>	<u>1</u>	<u>3</u>	<u>2</u>	<u>4,5</u>	<u>5,5</u>	<u>5</u>	<u>NT</u>	<u>NT</u>
-Exactidão								
Água do mar	1	3	2	4	NT	NT	NT	NT
Água doce	2	1	4	3	NT	NT	NT	NT
<u>Global</u>	<u>1,5</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>3,5</u>	<u>NT</u>	<u>NT</u>	<u>NT</u>	<u>NT</u>
-Global geral	11	14,5	25,5	26,25	22,75	16,25	14,75	6
-Média	1,83	2,42	4,25	4,37	4,55	5,42	7,37	2
-Ordenação ^b	<u>1</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>7</u>	<u>8</u>	<u>2</u>

^aNT: Não testado

Sublinhado: Média aritmética dos valores

^bOrdenação corresponde à palavra inglesa "ranking".

CONCLUSÕES

De acordo com os objectivos estabelecidos para os trabalhos experimentais e os resultados obtidos no presente estudo, desenvolveram-se as seguintes conclusões:

1. A concentração das bactérias indicadoras de contaminação nas águas estudadas simulam adequadamente o nível de contaminação das águas, sendo máxima na estação Portas do Mar e mínima na estação Ilha que apresenta uma menor contribuição de carácter antropogénico e uma maior influência marinha. Atendendo às elevadas percentagens de detecção de indicadores de contaminação fecal deduz-se que a origem da contaminação destas águas são as descargas de águas residuais sem tratamento prévio.

2. Os estudos de enumeração de bactérias totais por epifluorescência, indicam que o grau de poluição não incide no desequilíbrio do microbiota autóctone marinho.

3. A ausência de correlações estatisticamente significativas entre os distintos parâmetros físico-químicos e microbiológicos estudados reflectem a variabilidade inerente à natureza dinâmica observada em ecossistemas como a Ria Formosa, assim como às complexas interacções microbianas que se estabelecem no ecossistema marinho.

4. A forte contaminação de origem fecal observada nesta zona não se correlaciona com as concentrações de bactérias entéricas patogénicas. No entanto, a presença de *Pseudomonas aeruginosa* foi muito frequente em todas as amostragens realizadas. Nesta base, e atendendo à patogénese deste microrganismo relativamente aos banhistas, propõe-se que esta bactéria patogénica seja considerada como análise complementar em programas de vigilância da qualidade das águas recreativas.

5. A qualidade microbiológica das águas costeiras, em termos de coliformes totais, coliformes fecais e estreptococos fecais pode ser interpretada adequadamente por um modelo de distribuição de probabilidades lognormal. O desvio padrão da

concentração de um microrganismo indicador, numa estação de amostragem, é um parâmetro útil e sensível para a detecção de fontes de poluição descontínuas.

6. Em relação aos indicadores de contaminação fecal, pode-se concluir que apesar de não existir nenhum que cumpra todos os requisitos necessários para ser um indicador ideal da poluição fecal, os bacteriófagos de *E. coli* C, constituem um indicador alternativo pelas seguintes razões:

- As técnicas de detecção e quantificação de colifagos são simples, económicas e os resultados obtêm-se num período de 12-18 h.
- Os colifagos correlacionam-se bem com os coliformes fecais.
- Atendendo à sua maior sobrevivência são indicadores mais adequados de contaminação fecal remota.

7. Os resultados obtidos no estudo comparativo de meios de enumeração de estreptococos fecais indicam que nenhum dos meios selectivos permite ter uma boa segurança. No entanto, recomenda-se a utilização do meio mEnterococos para o método de filtração por membrana (incubação a 36° C, 72 h) e para o método do NMP o caldo de Rothe na prova presuntiva e o de Litsky na confirmativa.

8. O molusco bivalve *Mytilus edulis* tem uma capacidade importante em concentrar bactérias, o que pode ser útil para a detecção de níveis baixos de poluição que seriam fracamente avaliados por análise directa da água. O risco potencial para a saúde humana devido ao consumo de moluscos contaminados, não pode ser deduzido por testes indirectos através de amostras de água, somente as análises directas do molusco poderão proporcionar um conhecimento adequado sobre o seu estado sanitário.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abeyta Jr., C. (1983) - Bacteriological quality of fresh seafood products from Seattle retail markets. *Journal of Food Protection* **46**: 901-909.
- Abeyta Jr., C., Kaysner, C. A., Wekell, M. M., Sullivan, J. J. e Stelma, G. N. (1986) - Recovery of *Aeromonas hydrophila* from oysters implicated in an outbreak of foodborne illness. *Journal of Food Protection* **49**: 643-646.
- Ackermann, H-W. (1987) - Bacteriophage taxonomy in 1987. *Microbiological Sciences* **4**: 214-219.
- Ackermann, H-W. (1991) - Phagentaxonomie 1990: Stand und probleme. *BIOforum* **11**: 419-426.
- Ackermann, H-W. e Eisenstark, A. (1974) - The present state of phage taxonomy. *Intervirology* **3**: 210-219.
- Al-Jebouri, M. M. e Trollope, D. R. (1984) - Indicator bacteria in freshwater and marine molluscs. *Hydrobiologia* **3**: 93-102.
- Alkan, U., Elliot, D. J. e Evison, L. M. (1995) - Survival of enteric bacteria in relation to simulated solar radiation and other environmental factors in marine waters. *Water Research* **29**: 2071-2080.
- Alonso, J. L., Alonso, M. A., Usera, M. A. e Echeita, A. (1992) - The occurrence of *Salmonella* serotypes in marine recreational waters of Valencia, Spain. *Microbiologia SEM* **8**: 44-48.
- American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation (eds.) (1985) - Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 16th ed. APHA, AWWA, WPCF, Washington, D.C.
- American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation (1989) - Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 17th ed. (Clesceri, L.S., Greenberg A.E. e Trussel, R.R., eds.), APHA, AWWA, WPCF, Washington, D.C.

- American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation (1992)** - Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 18th ed. (Greenberg A.E., Clesceri L.S. e Eaton A.D., eds.), APHA, AWWA, WPCF American Public Health Association, Washington, D.C.
- Andrade, J. P. (1990)** - A importância da Ria Formosa no ciclo biológico de *Solea senegalensis* Kaup 1858, *Solea vulgaris* Quensel 1806, *Solea lascaris* (Risso, 1810) e *Microchirus azevia* (Capello, 1868). Dissertação apresentada à Universidade do Algarve para obtenção do grau de Doutor. Universidade do Algarve.
- Andrade, J. P. (1992)** - Age, growth and population structure of *Solea senegalensis* Kaup, 1858 (Pisces, Soleidae) in the Ria Formosa (Algarve, Portugal). *Science Marine* **56**: 35-41.
- Arcos, M. L., Martinez-Manzanares, E., Egea, F., Borrego, J. J. e Romero, P. (1986)** - Study of *Aeromonas hydrophila* in a marine environment: its presence in seawater, shellfish and sediments. *Rapport Committee International Pollution Mer Mediterranee* **30**: 146.
- Assis, M. E., Sampayo, M. A. M. e Vilela, M. H. (1984)** - A Ria de Faro-Olhão. I : Pigmentos e formas planctónicas predominantes (Maio 1972 - Maio 1973). *Cuadernos da Area de Ciencias Mariñas* **1**: 217-236.
- Ataíde, J. C. e Benoliel, M. J. (1979)** - Contribuição para o estudo da poluição da água na Ria de Faro/Olhão. 1º Simpósio Nacional de Estuários. LNEC/CNA, Lisboa. Comunicação nº 5, 4 p.
- Aubert, M. (1990)** - Les risques en matière de pollution microbologique de la Méditerranée. *Revue Internationale de Océanographie* **LXXXXVII-LXXXXVIII**: 6-20.
- Audicana, A., Perales, I. e Borrego, J. J. (1995)** - Modification of kanamycin-esculin-azide agar to improve selectivity in the enumeration of fecal streptococci from water samples. *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 4178-4183.
- Avila, M. J. (1986)** - Polución bacteriana del agua de playas de la Costa del Sol Occidental. Estudio comparativo de medios selectivos para el aislamiento y cuantificación de coliformes. Tesis de Licenciatura. Universidad de Málaga.

- Avila, M. J., Moriñigo, M. A., Cornax, R., Romero, P. e Borrego, J. J. (1989)** - Comparative study of coliform-enumeration media from seawater samples. *Journal of Microbiological Methods* **9**: 175-193.
- Ayres, P. A. (1975)** - The quantitative bacteriology of some commercial bivalve shellfish entering British markets. *Journal of Hygiene (Cambridge)* **74**: 431-440.
- Baleux, B., Troussellier, M., Got, P., Monfort, P., Alibou, J. e Mezrioui, N-e. (1988)** - Devenir des bacteries «Temoins de contamination» et des germes pathogenes d'origine continentale dans les eaux, les sediments et les productions conchylicoles d'un etang saumatre. *Océanis* **14**: 61-70.
- Baptista, T. M. C. (1990)** - Avaliação da contaminação de ordem fecal na ameijoia boa da costa Algarvia. Relatório de Estágio do Curso de Licenciatura em Biologia Marinha e Pescas. Universidade do Algarve.
- Baptista, T. M. C. (1993)** - Comparison of microbiological observations on the water quality in the Ria Formosa basin. A dissertation submitted to the University of Wales in part fulfilment of the requirements for the degree of Master of Philosophy. University of Wales, Bangor.
- Barbosa, A. M. B. (1989)** - Variação espaço-temporal da abundância e biomassa bacterianas no sistema lagunar Ria Formosa. Relatório de Estágio do Curso de Licenciatura em Biologia Marinha e Pescas Universidade do Algarve.
- Barceló, J. P. e Magalhães, J. E. S. (1988)** - O estudo em modelo reduzido da Ria de Faro. 5º Congresso do Algarve. Comunicações. Montechoro **2**: 747-758.
- Barnes, E. M. (1959)** - Differential and selective media for the faecal streptococci. *Journal of Science Food and Agriculture* **10**: 656-659.
- Barrow, G. I. (1977)** - Bacterial indicators and standards of water quality in Britain. *In*: Bacterial Indicators/Health Hazards Associated with Water. (Hoadley, A. W. e Dutka, B. J., eds.), American Society for Testing and Materials, Philadelphia.
- Baylor, E. R., Baylor, M. B., Blanchard, D. C., Syzdek, L. D. e Appel, C. (1977)** - Virus transfer from surf to wind. *Science* **198**: 575-580.
- Bayne, S., Blankson, M. e Thirkell, D. (1983)** - Enumeration and speciation of group D Streptococci from above and below a sewer outfall, their susceptibilities to six antibiotics and a comparison with clinical isolates. *Antonie van Leeuwenhoek* **49**: 399-410.

- Benoiel, M. J. (1984)** - Vigilância em contínuo da qualidade da água na Ria Formosa (Ria de Faro/Olhão). Instituto Hidrográfico, Direcção Técnica, Divisão de Química e Poluição, Lisboa.
- Bernardo, F. M. (1991)** - Significado epidemiológico da incidência de *Salmonella* em alguns alimentos de origem animal em Portugal. Dissertação de Doutoramento apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária Universidade Técnica de Lisboa.
- Bissonnette, G. K., Jezeski, J. J., McFeters, G. A. e Stuart, D. G. (1975)** - Influence of environmental stress on enumeration of indicator bacteria from natural waters. *Applied Microbiology* **29**: 186-194.
- Bonde, G. J. (1962)** - Bacterial indicators of water pollution: a study of quantitative estimation. 2nd ed. Teknisk Forlag, Copenhagen.
- Bonde, G. J. (1977)** - Bacterial indication of water pollution. *In: Advances in Aquatic Microbiology* (Droop, M. R. e Jannasch, H. W., eds.), vol. 1, Academic Press Inc., London, pp. 273-364.
- Bonde, G. J. (1981)** - *Salmonella* and other pathogenic bacteria. *In: Water Supply and Health* (Van Lelyveld, H. e Zoeteman, B. C. J., eds.), Elsevier, Amsterdam, pp. 1-12.
- Borrego, J. J. (1982)** - Estudio de los bacteriofagos de *Escherichia coli* en el agua de mar: su relación con la polución de dicho medio. Tesis Doctoral. Universidad de Málaga.
- Borrego, J. J. (1994)** - Diseño de medios de enumeración de bacterias patógenas alóctonas de aguas naturales. *Microbiología SEM* **10**: 169-180.
- Borrego, J. J. e Mariño, F. J. (1995)** - Estudio Epidemiológico de Zonas de Baño de la Provincia de Málaga. Consejería de Salud, Junta de Andalucía, Sevilla.
- Borrego, J. J. e Romero, P. (1985)** - Coliphage survival in seawater. *Water Research* **19**: 557-562.
- Borrego, J. J., Arrabal, F. e Romero, P. (1982a)** - Study of the microbial pollution of a Málaga litoral area. I. Relationship between faecal coliforms and coliphages. *Journées Études Pollution* **4**: 551-560.
- Borrego, J. J., Arrabal, F. e Romero, P. (1982b)** - Study of the microbiological pollution of a Málaga litoral area: II. Relationship between faecal coliforms and faecal streptococci. *Journées Études Pollution* **4**: 561-564.

- Borrego, J. J., Arrabal, F., Vicente, A. de, Gomez, L. F. e Romero, P. (1983)** - Study of microbial inactivation in the marine environment. *Journal of Water Pollution Control Federation* **55**: 297-302.
- Borrego, J. J., Moriñigo, M. A., Vicente, A. de, Cornax, R. e Romero, P. (1987)** - Coliphages as an indicator of faecal pollution in water. Its relationship with indicator and pathogenic microorganisms. *Water Research* **21**: 1473-1480.
- Borrego, J. J., Cornax, R., Moriñigo, M. A., Martínez-Manzanares, E. e Romero, P. (1990)** - Coliphages as an indicator of faecal pollution in water: their survival and productive infectivity in natural environments. *Water Research* **24**: 111-116.
- Bosch, A., Abad, F. X., Gajardo, R. e Pintó, R. M. (1994)** - Should shellfish be purified before public consumption. *The Lancet* **344**: 1024-1025.
- Bowden, W. B. (1977)** - Comparison of two direct-count techniques for enumerating aquatic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **33**: 1229-1232.
- Bravo, J. M. (1985)** - Análisis y evaluación de la calidad microbiológica de las aguas costeras. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Bravo, J. M. e Vicente, A. de (1992)** - Bacterial die-off from sewage discharge through submarine outfalls. *Water Science and Technology* **25**: 9-16.
- Brisou, J. (1976)** - An environmental sanitation plan for the Mediterranean seaboard: Pollution and Human Health Publication. *Health Papers*, nº **62**. WHO, Geneve.
- Brodsky, M. H. e Schiemann, D. A. (1976)** - Evaluation of Pfizer selective enterococcus and KF media for recovery of fecal streptococci from water by membrane filtration. *Applied and Environmental Microbiology* **31**: 695-699.
- Bryan, F. L. (1980)** - Epidemiology of foodborne diseases transmitted by fish, shellfish and marine crustaceans in the United States, 1970-1978. *Journal of Food Protection* **43**: 859-875.
- Buck, J. D. (1969)** - Occurrence of false-positive most probable number tests for fecal streptococci in marine waters. *Applied Microbiology* **18**: 562-565.
- Buck, J. D. (1982)** - No staining KOH methods for determination of gram reactions of marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **44**: 992-993.
- Buck, J. D. e Bubucis, P.M. (1978)** - Membrane filter procedure for enumeration of *Candida albicans* in natural waters. *Applied and Environmental Microbiology* **35**: 237-242.
- Byrd, J. J., Xu, H-S. e Colwell, R. R. (1991)** - Viable but nonculturable bacteria in drinking water. *Applied and Environmental Microbiology* **57**: 875-878.

- Cabelli, V. J. (1977)** - Indicators of recreational water quality. *In: Bacterial Indicators/Health Hazards Associated with Water* (Hoadley, A. W. e Dutka, B. J., eds.), American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp. 222-238.
- Cabelli, V. J. (1978)** - New standards for enteric bacteria. *In: Water Pollution Microbiology* (Mitchell, R., ed.), vol. 2, John Wiley e Sons, Inc., NewYork, pp. 233-271.
- Cabelli, V. J. (1979)** - Evaluation of recreational water quality, the EPA approach. *In: Biological Indicators of Water Quality* (James, A. e Evison, L., eds.), John Wiley, NewYork, pp. 141-163.
- Cabelli, V. J. (1982)** - Health effects criteria for marine recreational waters. Final report. Environmental Protection Agency, EPA 600/1-82-031, Cincinnati.
- Cabelli, V. J. (1983)** - Water-borne viral infections. *In: Viruses and Desinfection of Water and Wastewater* (Butler, M., Medlen, A. R. e Morris, R., eds.), University of Surrey Press, Guilford, pp. 107-130.
- Cabelli, V. J. e Heffernan, W. P. (1970)** - Accumulation of *Escherichia coli* by the northern quahaug. *Applied Microbiology* **19**: 239-244.
- Cabelli, V. J. e Heffernan, W. P. (1971)** - Seasonal factors relevant to coliform levels in the northern quahaug. *Proceedings of the National Shellfish Association* **61**: 95-101.
- Cabelli, V. J., Levin, M. A., McCabe, L. J. e Haberman, P. B. (1976)** - Relationship of microbial indicators to health effects at marine bathing beaches. Abstracts Annual Meeting of American Public Health Association. Chicago, pp. 304.
- Cabelli, V. J., Dufour, A. P., Levin, M. A., McCabe, L. J. e Haberman, P. B. (1979)** - Relationship of microbial indicators to health effects at marine beaches. *American Journal of Public Health* **69**: 690-696.
- Cabelli, V. J., Dufour, A. P., McCabe, L. J. e Levin, M. A. (1982)** - Swimming-associated gastroenteritis and water quality. *American Journal of Epidemiology* **115**: 606-616.
- Cabelli, V. J., Dufour, A. P., McCabe, L. J. e Levin, M. A. (1983)** - A marine recreational water quality criterion consistent with indicator concepts and risk analysis. *Journal of Water Pollution Control Federation* **55**: 1306-1314.
- Cachola, R. (1990)** - Depuração de moluscos bivalves. 6º Congresso do Algarve. Comunicações. Montechoro **2**: 421-425.

- Cachola, R. e Lima, C. (1984)** - Qualidade da água e dos recursos vivos da costa algarvia (verão 1984). Relatórios do Instituto Nacional de Investigação das Pescas **38**, 15 p. (Relatório Preliminar).
- Cachola, R. e Nunes, M. C. (1974)** - Quelques aspects de la pollution bacteriologique des centres producteurs de mollusques de l'Algarve (1963-1972). Boletim informativo do Instituto de Biologia Marítima nº 13.
- Cachola, R. e Nunes, M. C. (1985)** - Controle bacterien des eaux dans les zones de Faro/Olhão (1981-1984). Séminaire «Systemes Lagunaires, Ria Formosa». Institut Franco-Portugais, Lisboa.
- Cachola, R. e Nunes, M. C. (1986)** - Alguns aspectos da contaminação bacteriológica nos principais centros produtores de moluscos bivalves do Algarve. 4º Congresso do Algarve. Textos das Comunicações **1**: 519-524.
- Cachola, R. e Sampayo, M. A. A. (1984)** - Contaminação bacteriana na doca de Faro. *Pesca e Navegação* **45**: 24-27.
- Carlucci, A. F. e Pramer D. (1960a)** - An evaluation of factors affecting survival of *Escherichia coli* in seawater. II: salinity, pH, and nutrients. *Applied Microbiology* **8**: 247-250.
- Carlucci, A. F. e Pramer, D. (1960b)** - An evaluation of factors affecting the survival of *Escherichia coli* in sea water. IV: bacteriophages. *Applied Microbiology* **8**: 254-256.
- Chamberlain, C. e Mitchell, R. (1978)** - A decay model for enteric bacteria in natural waters. *In*: Water Pollution Microbiology (Mitchell, R., ed.), vol 2, John Wiley e Sons, Inc., New York, pp. 325-348.
- Clausen, E. M., Green, B. L. e Litsky, W. (1977)** - Fecal streptococci: indicators of pollution. *In*: Bacterial Indicators: Health Hazards Associated with Water (Hoadley, A. W. e Dutka, B. J., eds.), American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp. 247-264
- Clutter, R. I. (1972)** - Subtle effects of pollution on inshore tropical plankton. *In*: Marine Pollution and Sea Life (Ruivo, M., ed.), Fishing News (Books) Limited, London, pp. 435-439.
- Coelho, P. S. e Hall, L. B. (1988)** - Caracterização microbiológica da Ria do Alvor. 5º Congresso do Algarve **1**: 407-412.

- Collins, M. D., Jones, D., Farrow, J. A. E., Kilper-Balz, R. e Schleifer, K. H. (1984)** - *Enterococcus avium* nom. rev., comb. nov.; *E. casseliflavus* nom. rev., comb. nov.; *E. durans* nom. rev., comb. nov.; *E. gallinarum* comb. nov.; e *E. malodoratus* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **34**: 220-223.
- Collins, M. D., Farrow, J. A. E. e Jones, D. (1986)** - *Enterococcus mundtii* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **36**: 8-12.
- Collins, M. D., Facklam, R. R., Farrow, J. A. E. e Williamson, R. (1989)** - *Enterococcus raffinosus* sp. nov., *Enterococcus solitarius* sp. nov., and *Enterococcus pseudoavium* sp. nov. *FEMS Microbiology Letters* **57**: 283-288.
- Colwell, R. R. (1978)** - Bacterial and viruses-indicator of environmental changes occurring in estuaries. *Environment International* **1**: 223-231.
- Colwell, R. R. e Kaneko, T. (1974)** - Ecological studies of *Vibrio parahaemolyticus*. In: Effect of the Ocean Environment on Microbial Activities (Colwell R.R. e Morita R. Y., eds), University Park Press, Baltimore, pp. 536 - 545.
- Colwell, R. R. e Kaper, J. B. (1981)** - *Vibrio* and *Aeromonas*. In: Membrane Filtration: Applications, Techniques and Problems (Dutka, B. J., ed.), Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 161-188.
- Colwell, R. R., Kaper, J. B. e Joseph, S. W. (1977)** - *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and other vibrios: occurrence and distribution in Chesapeake Bay. *Science*, **198**: 394-396.
- Comunidade Económica Europeia (1976)** - Directiva 76/160/CEE do Conselho de 8 de Dezembro de 1975, relativa à qualidade da água em zonas balneares. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*. nº L 31/1. Edição Especial **15**: 133-139.
- Comunidade Económica Europeia (1979)** - Directiva 79/923/CEE do Conselho de 30 de Outubro de 1979, relativa à qualidade exigida às águas conquícolas. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias* L **281**: 47-52.
- Comunidade Económica Europeia (1991)** - Directiva 91/492/CEE do Conselho de 15 de Julho de 1991, que estabelece as normas sanitárias que regem a produção e a colocação no mercado de moluscos bivalves vivos. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*. nº L **268**: 1-14.
- Comunidade Europeia (1994)** - Proposta de directiva 94/C 112/03 do Conselho das Comunidades Europeias, relativa às águas balneares. COM (94): **36**, 48 p.

- Consultores de Engenharia Sanitária, Lda CESL (1986)** - Sistema interceptor e estação de tratamento nascente das águas residuais da cidade de Faro. Projecto de execução. Sistema interceptor. Volume I - Memória Geral I. Memória Descritiva. Lisboa.
- Cooke, M. D. (1976)** - Antibiotic resistance among coliform and fecal coliform bacteria isolated from sewage, seawater and marine shellfish. *Antimicrobial Agents Chemotherapeutic* 9: 879-884.
- Cornax, R. (1986)** - Estudio de la supervivencia de microorganismos alóctonos en el medio ambiente marino. Tesis de Licenciatura. Universidad de Málaga.
- Cornax, R. (1991)** - Distribución y dinámica de bacteriófagos entéricos en heces humanas, agua residual y aguas naturales contaminadas: su validez como indicadores de la polución fecal. Tesis Doctoral. Universidad de Málaga.
- Cornax, R., Moriñigo M. A., Romero, P. e Borrego, J. J. (1990a)** - Survival of pathogenic microorganisms in seawater. *Current Microbiology* 20: 293-298.
- Cornax, R., Moriñigo, M. A., Dionisio, L., Martinez-Manzanares, E. M., Muñoz, M. A. e Borrego, J. J. (1990b)** - Comparative survival of fecal indicators in seawater. *Rapports Commission Internationale Mer Méditerranée* 32 (1): 138.
- Cornax, R., Moriñigo, M. A., Muñoz, M. A. e Borrego, J. J. (1990c)** - Application of direct assay for detection and enumeration of bacteriophages of *Bacteroides fragilis* from contaminated-water samples. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 3170-3173.
- Cortez, L. e Gonçalves, M. L.** - «Distribuição de nutrientes na Ria Formosa na zona de Faro-Olhão». In: Actas do 1º Encontro sobre a Ria Formosa. PNR/UAL/INIP. Quinta de Marim, Olhão (em publicação).
- Costa, J. R. da, Costa, J. Pinto da, Fonseca, V., Rocha, F. e Rodrigues, R. (1992)** - Rio Guadiana: Reconhecimento e caracterização geral. COVEPLAM. MEDSPA. UNINOVA. Direcção-Geral do Ambiente. Lisboa.
- Craun, G. F. (1981)** - Outbreaks of waterborne disease in the United States: 1971-1978. *Journal of American Water Works Association* 73: 360-369.
- Craun, G. F. (1986)** - Statistics of waterborne outbreaks in the U. S. (1920-1980). In: Waterborne Diseases in the United States (Craun, G. F., ed.), CRC Press Inc., Boca Raton, pp. 73-159.
- Cruickshank, R., Duguid, J. P., Marmion, B. P. e Swain, C. H. A. (1973)** - Microbiologia Médica. 4ª ed., vol. I, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.

- Cruickshank, R., Duguid, J. P., Marmion, B. P. e Swain, C. H. A. (1975)** - Microbiologia Médica. 4ª ed., vol. II, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.
- Cunha, M. E. e Massapina, M. C. (1984)** - Contribution to the zooplankton community analyses of the Ria de Faro/Olhão. Seminário de Estudos Galegos. *Separata do Cuaderno da Area de Ciencias Mariñas* 1: 237-250.
- Cunha, A., Pereira, M. G., Rodrigues, R. e Alcântara, F. (1992)** - Flutuações anuais e tidais de parâmetros microbiológicos, físicos e químicos no Canal de Mira (Ria de Aveiro). Comunicação apresentada na «III Conferência Nacional sobre a Qualidade do Ambiente». Universidade de Aveiro.
- Curtis, T. P., Mara, D. D. e Silva, S. A. (1992)** - Influence of pH, oxygen, and humic substances on ability of sunlight to damage fecal coliforms in waste stabilization pond water. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 1335-1343.
- Daley, R. (1979)** - Direct epifluorescence enumeration of native aquatic bacteria: uses, limitations and comparative accuracy. *In: Native Aquatic Bacteria: Enumeration, Activity and Ecology* (Costerton, J. W. e Colwell, R. R., eds.), American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp. 29-45.
- D'Aoust, R. A. e Litsky, W. (1975)** - Pfizer selective enterococcus agar overlay method for enumeration of fecal streptococci by membrane filtration. *Applied Microbiology* 29: 584-589.
- Dawe, L. L. e Penrose, W. R. (1978)** - «Bactericidal» property of seawater: death or debilitation?. *Applied and Environmental Microbiology* 35: 829-833.
- Deetz, T. R., Smith, E. R., Goyal, S. M., Gerba, C. P., Vollet, J. V., Tsai, L., DuPont, H. L. e Keswick, B. H. (1984)** - Occurrence of rota and enteroviruses in drinking and environmental waters in a developing nation. *Water Research* 18: 567-572.
- Deibel, R. H. (1964)** - The group D streptococci. *Bacteriology Review* 28: 330-366.
- Deibel, R. H. e Hartman, P. A. (1984)** - The enterococci. *In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 2nd ed. (Speck, M. L., ed.), American Public Health Association, Washington, D. C., pp. 405-410.
- Devriese, L. A., Hommez, J., Wyffels, R. e Haesebrouck, F. (1991)** - Composition of the enterococcal and streptococcal intestinal flora of poultry. *Journal of Applied Bacteriology* 71: 46-50.

- Devriese, L. A., Laurier, L., de Herdt, P. e Haesebrouck, F. (1992)** - Enterococcal and streptococcal species isolated from faeces of calves, young cattle and dairy cows. *Journal of Applied Bacteriology* **72**: 29-31.
- Dionisio, L. P. C. e Borrego, J. J. (1995)** - Evaluation of media for the enumeration of faecal streptococci from natural water samples. *Journal of Microbiological Methods* **23**: 183-203.
- Direcção de Serviços de Experimentação e Fomento da Produção Agro-Pecuária (1990)** - Agrometeorologia: informação. Direcção Regional da Agricultura do Algarve.
- Direcção de Serviços de Experimentação e Fomento da Produção Agro-Pecuária (1991)** - Agrometeorologia: informação. Direcção Regional da Agricultura do Algarve.
- Dronkers, J. e Zimmerman, J. T. F. (1982)** - Some principles of mixing in tidal lagoons. *Oceanologica Acta*, SP: 107-117.
- Duedall, I. W., Ketchum, B. H., Park, P. K. e Kester, O. R. (1983)** - Waste in the ocean. *In: Industrial and Sewage Wastes in the Ocean*, vol. 1 (Ketchum, B. H. e Kester, O. R., eds.) John Wiley and Sons, Inc., New York, pp. 143-167.
- Dufour, A. P. (1977)** - *Escherichia coli* the fecal coliform. *In: Bacterial Indicators/Health Hazards Associated with Water* (Hoadley, A. W. e Dutka B. J., eds.), American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp. 48-58.
- Dufour, A. P. (1984)** - Health effects criteria for fresh recreational waters. U.S. Environmental Protection Agency, EPA-600/1-84-004, Washington, D.C.
- Dufour, A. P., Strickland, E. R. e Cabelli, V. P. (1981)** - Membrane filter method for enumerating *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* **41**: 1152-1158.
- Dutka, B. J. (1973)** - Coliforms are an inadequate index of water quality. *Journal of Environmental Health* **36**: 39-46.
- Dutka, B. J. (1981)** - *Pseudomonas aeruginosa*: a controversial indicator pathogen. *In: Membrane Filtration: Applications, Techniques and Problems*, (Dutka, B. J., ed.), Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 119-128.
- Dutka, B. J. e Kwan, K. K. (1978)** - Comparison of eight media-procedures for recovering faecal streptococci from water under winter conditions. *Journal of Applied Bacteriology* **45**: 333-340.

- Dutka, B. J. e Kwan, K. K. (1980)** - Bacterial die-off and stream transport studies. *Water Research* **14**: 909-915.
- Dutka, B. J., Kuchman, S. e Kwan, K. K. (1979)** - Fecal coliforms and *Escherichia coli* estimates: tip of the iceberg. *Water Air and Soil Pollution* **11**: 348-362.
- Easterbrook, T. J. e West, P. A. (1987)** - Comparison of most probable number and pour plate procedures for isolation and enumeration of sulphite-reducing *Clostridium* spores and Group D faecal streptococci from oysters. *Journal of Applied Bacteriology* **62**: 413-419.
- Edel, W. e Kampelmacher, E. H. (1969)** - *Salmonella* isolation in nine european laboratories using a standardized technique. *Bulletin of World Health Organization* **41**: 297-306.
- Egea, F. (1987)** - Estudio de clostridios sulfitorreductores en agua de mar, moluscos y sedimentos. Tesis de Licenciatura. Universidad de Málaga.
- Eisenhart, C. e Wilson, P. C. (1943)** - Statistical methods and control in bacteriology. *Bacteriology Review* **7**: 57-72.
- El-Shaarawi, A. H. e Pipes, W.O. (1982)** - Enumeration and statistical interferences. In: *Bacterial Indicators of Pollution* (Pipes, W.O., ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 43-66.
- Elliot, E. L. e Colwell, R. R. (1985)** - Indicator organisms for estuarine and marine waters. *FEMS Microbiology Reviews* **32**: 61-79.
- Encontro sobre a Ria Formosa - 1º - Conclusões e Recomendações.** In: *Actas do 1º Encontro sobre a Ria Formosa (1992)*. Parque Natural da Ria Formosa/Universidade do Algarve/Instituto Nacional das Pescas. Quinta de Marim, Olhão (em publicação).
- Enzinger, R. M. e Cooper, R. C. (1976)** - Role of bacteria and protozoa in the removal of *Escherichia coli* from estuarine waters. *Applied and Environmental Microbiology* **31**: 758- 763.
- Esrey, S. A., Feachem, R. G. e Hughes, J. M. (1985)** - Interventions for the control of diarrhoeal diseases among young children: improving water supplies and excreta disposal facilities. *Bulletin of the World Health Organization* **63**: 757-772.
- Esteve, I. (1981)** - Caracterización morfológica y ultraestructural de poblaciones de bacterias fotosintéticas planctónicas. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Barcelona.

- Evans, T. M., LeChevalier, M. W., Waarwick, C. E. e Seidler, R. J. (1981)** - Coliform species recovered from untreated surface water and drinking water by the membrane filter, standard and modified most-probable-number techniques. *Applied and Environmental Microbiology* **41**: 657-663.
- Evison, L. M. e Tosti, E. (1980)** - An appraisal of bacterial indicators of pollution in seawater. *Progress in Water Technology* **12**: 591-599.
- Facklam, R. R. e Collins, M. D. (1989)** - Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. *Journal of Clinical Microbiology* **27**: 731-734.
- Facklam, R. R. e Moody, M. D. (1970)** - Presumptive identification of group D streptococci: the bile esculin test. *Applied Microbiology* **20**: 245-250.
- Facklam, R. R. e Washington, J. A. (1991)** - *Streptococcus* and related catalase-negative gram-positive cocci (Part I). In: Manual of Clinical Microbiology. 5th ed. (Balows, W.J., Hausler, W. J. Jr., Herrman, K.L., Isenberg, H.D. e Shadomy, H.J., eds.), American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp. 238-257.
- Facklam, R. R., Thacker, L. G., Fox, B. e Enriquez, L. (1982)** - Presumptive identification of streptococci with a new test system. *Journal of Clinical Microbiology* **15**: 987-990.
- Falcão, M. e Vale, C. (1990)** - Study of the Ria Formosa ecosystem: benthic nutrient regeneration and tidal variability of nutrients in water. *Hidrobiologia* **207**: 137-146.
- Fattal, B., Vals, R. J., Katzenelson, E. e Shuval, H. I. (1983)** - Survival of bacterial indicator organisms and enteric viruses in the Mediterranean coastal waters off Tel-Aviv. *Water Research* **17**: 397-402.
- Ferreira, P. S. e Cachola, R. (1975)** - *Vibrio cholerae* El Tor in shellfish beds of the south coast of Portugal. *International Council for the Exploration of the Sea. Shellfish and Benthos Comitee*, C. M. K:18.
- Fluharty, D. M. e Packard, W. L. (1967)** - Differentiation of gram- positive and gram-negative bacteria without staining. *American Journal of Veterinary Clinical Pathology* **1**: 31-35.
- Fugate, K. J., Cliver, D. O. e Hatch, M. T. (1975)** - Enteroviruses and potential bacterial indicators in Gulf Coast oysters. *Journal of Milk and Food Technology* **38**: 100-104.

- Fuhrman, J. A., Eppley, R. W., Hagstrom, A. e Azam, F. (1985)** - Diel variations in bacterioplankton, phytoplankton, and related parameters in the Southern California Bight. *Marine Ecology Progress Series* **27**: 9-20.
- Fujioka, R. S. e Narikawa, O. T. (1982)** - Effect of sunlight on enumeration of indicator bacteria under field conditions. *Applied and Environmental Microbiology* **44**: 395-401.
- Fujioka, R. S., Hashimoto, H. H., Siwak, E. B. e Young, R. H. F. (1981)** - Effect of sunlight on survival of indicator bacteria in sea water. *Applied and Environmental Microbiology* **41**: 690-696.
- Gameson, A. L. H. (1980)** - Variability of bacterial counts in coastal waters. *Progress in Water Technology* **12**: 481-489.
- Gameson, A. L. H. e Gould, D. J. (1975)** - Effects of solar radiation on the mortality of some terrestrial bacteria in sea water. *In: Discharge of Sewage from Sea Outfalls* (Gameson, A. L. H., ed.), Pergamon Press, pp. 209-219.
- Gauci, V. (1991)** - Enumeration of faecal streptococci in seawater. *In: Development and Testing of Sampling and Analytical Techniques for Monitoring of Marine Pollutants (Activity A): final reports on selected microbiological projects. Mediterranean Action Plan (MAP) Technical Reports Series n° 54, United Nations Environment Programme (UNEP), Athens.*
- Gauthier, M. J. (1980)** - Poluciones bacterianas en el medio marino. *In: La Polución de las Aguas Marinas* (Pérès, J. ed.), Omega, S.A., Barcelona, pp. 127-141.
- Gauthier, M. J., Munro, P. M. e Breittmayer, V. A. (1991)** - Adaptation des enterobacteries pathogenes a l'eau de mer (Modele *Escherichia coli*). *MAP Technical Reports Series n° 49, UNEP, pp. 33-42.*
- Geldreich, E. E. (1966)** - Sanitary Significance of Fecal Coliforms in the Environment. F.W.P.C.A. *Water Pollution Control Publication WP-20-3.*
- Geldreich, E. E. (1978)** - Bacterial populations and indicator concepts in feces, sewage, stormwater and solid wastes. *In: Indicators of Viruses in Water and Food* (Berg, G., ed.), Ann Arbor Science Publishers Inc., Ann Arbor, pp. 51-97.
- Geldreich, E. E. (1981)** - Current status of microbiological water quality criteria. *ASM News* **47**: 23-27
- Geldreich, E. E. e Kenner, B. A. (1969)** - Concepts of fecal streptococci in stream pollution. *Journal of Water Pollution Control Federation* **41**: R336-R352.

- Gerba, C. P. (1987)** - Phage as indicators of fecal pollution. *In: Phage Ecology* (Goyal, S. M., Gerba, C. P. e Bitton, G., eds.), Wiley, New York, pp. 197-209.
- Gerba, C. P. e Goyal, S. M. (1978)** - Detection and occurrence of enteric viruses in shellfish: a review. *Journal of Food Protection* **41**: 743-754.
- Gerba, C. P., Stagg, C. H. e Abadie, M. G. (1978)** - Characterization of sewage solid-associated viruses and behavior in natural waters. *Water Research* **12**: 805-812.
- Gerba, C. P., Goyal, S. M., LaBelle, R. L., Cech, I. e Bodgan, G. F. (1979)** - Failure of indicator bacteria to reflect the occurrence of enteroviruses in marine waters. *American Journal of Public Health* **69**: 1116-1119.
- Gliesche, C. G., Holm, N. C., Beese, M., Neumann, M., Volker, H., Gebers, R. e Hirsch, P. (1988)** - New bacteriophages active on strains of *Hyphomicrobium*. *Journal of General Microbiology* **134**: 1339-1353.
- Goyal, S. M. (1983)** - Indicators of viruses. *In: Viral Pollution of the Environment*, vol. 1 (Berg, G., ed.), CRC Press Inc., Boca Raton, pp. 211-230.
- Goyal, S. M. (1984)** - Viral pollution of the marine environment. *CRC Critical Reviews Environmental Control* **14**: 1-32.
- Goyal, S. M., Gerba, C. P. e Melnick, J. L. (1978)** - Prevalence of human enteric viruses in coastal canal communities. *Journal of Water Pollution Control Federation* **50**: 2247-2256.
- Goyal, S. M., Gerba, C. P. e Melnick, J. L. (1979)** - Human enteroviruses in oysters and their overlying waters. *Applied and Environmental Microbiology* **37**: 572-581.
- Goyal, S. M., Keswick, B. H. e Gerba, C. P. (1984)** - Viruses in groundwater beneath sewage irrigated cropland. *Water Research* **18**: 299-302.
- Grabow, W. O. K. (1986)** - Indicator systems for assessment of the virological safety of treated drinking water. *Water Science and Technology* **18**: 159-165.
- Grabow, W. O. K., Hilner, C. A. e Coubrought, P. (1981)** - Evaluation of standard and modified mFC, MacConkey and Teepol media for membrane filtration counting of fecal coliforms in water. *Applied and Environmental Microbiology* **4**: 192-199.
- Grabow, W. O. K., Coubrough, P., Nupen, E. M. e Bateman, B. W. (1984)** - Evaluation of coliphages as indicators of the virological quality of sewage-polluted water. *Water South Africa* **10**: 7-14.

- Grabow, W.O.K., Idema, G. K., Coubrough, P. e Bateman, B. W. (1989)** - Selection of indicator systems for human viruses in polluted seawater and shellfish. *Water Science and Technology* **21**: 111-117.
- Granai, C. e Sjogren, R. E. (1981)** - In situ and laboratory studies of bacterial survival using a microporus membrane sandwich. *Applied and Environmental Microbiology* **41**: 190-195.
- Grasshoff, K. (1976)** - Methods of Seawater Analysis. Verlag Chemie, Weinheim.
- Grimes, D. J. (1975)** - Release of sediment-bound fecal coliforms by dredging. *Applied Microbiology* **29**: 109-111.
- Grimes, D. J. e Colwell, R. R. (1986)** - Viability and virulence of *Escherichia coli* suspended by membrane chamber in semitropical ocean water. *FEMS Microbiology Letters* **34**: 161-165.
- Grimes, D. J., Attwell, R. W., Brayton, P. R., Palmer, L. M., Rollins, D. M., Roszak, D. B., Singleton, F. L., Tamplin, M. L. e Colwell, R. R. (1986)** - The fate of enteric pathogenic bacteria in estuarine and marine environments. *Microbiological Sciences* **3**: 324-329.
- Grindas, L. (1978)** - Le problème de l'évaluation de la pollution marine. *Revue Internationale Oceanographie Medicale* **50**: 31-34.
- Grindley, A. (1972)** - Pollution of the Sea. *South African Journal of Science* **6**: 162-170.
- Gross, K. C., Houghton, M. P. e Senterfit, L. B. (1975)** - Presumptive speciation of *Streptococcus bovis* and other Group D streptococci from human sources by using arginine and pyruvate tests. *Journal of Clinical Microbiology* **1**: 54-60.
- Hall, L. B. M. F. B. G. (1994)** - Estuário do Rio Sado. Estudo bacteriológico (1986 - 1990), vol. 1. Provas de acesso à categoria de Investigador Auxiliar. Instituto Nacional de Engenharia e Tecnologia Industrial, Lisboa.
- Havelaar, A. H. (1987)** - Bacteriophages as model organisms in water treatment. *Microbiological Sciences* **4**: 362- 364.
- Havelaar, A. H. e Hogeboom, W. M. (1983)** - Factors affecting the enumeration of coliphages in sewage and sewage-polluted waters. *Antonie van Leeuwenhoek* **49**: 387-397.
- Havelaar, A. H. e Hogeboom, W. M. (1984)** - A method for the enumeration of male-specific bacteriophages in sewage. *Journal of Applied Bacteriology* **56**: 439-447.

- Havelaar, A. H., Hogeboom, W. M. e Pot, R. (1984)** - F-specific RNA bacteriophages in sewage: methodology and occurrence. *Water Science and Technology* **17**: 645-655.
- Hejkal, T. W., Keswick, B. H., Labelle, R., Gerba, C.P., Sánchez, Y., Dreesman, G., Hafkin, B. e Melnick, J. L. (1982)** - Viruses in a community water supply associated with an outbreak of gastroenteritis and infectious hepatitis. *Journal of the American Water Works Association* **74**: 318-321.
- Helmer, R., Hespanhol, I. e Saliba, L. J. (1991)** - Public health criteria for the aquatic environment. Recent WHO guidelines and their application. *Water Science and Technology* **24**: 35-42.
- Henis, Y. (1987)** - Survival and dormancy of bacteria. *In: Survival and Dormancy of Microorganisms* (Henis, Y., ed.), Jonh Wiley & Sons, New York, pp. 3-108.
- Herbert, R. A. (1990)** - Methods for enumerating microorganisms and determining biomass in natural environments. *Methods in Microbiology* **22**: 1-40.
- Hernandez, J. F., Guibert, J. M., Delattre, J. M., Oger, C., Charriere, C., Hughes, B., Serceau, R. e Sinigre, F. (1991)** - Miniaturized fluorogenic assays for enumeration of *E. coli* and enterococci in marine water. *Water Science and Technology* **24**: 137-141.
- Hoadley, A. W. (1977)** - Potencial health hazards associated with *Pseudomonas aeruginosa* in water. *In: Bacterial Indicators/Health Hazards Associated with Water* (Hoadley A. W. e Dutka, B. J., eds), American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp. 80-114.
- Hoadley, A. W. (1981)** - Effect of injury on the recovery of bacteria on membrane filters. *In: Membrane Filtration: Applications, Techniques and Problems* (Dutka, B. J. ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, pp. 413-450.
- Hoadley, A. W. e Knight, D. E. (1975)** - Outer (external otitis) ear infections among swimmers and nonswimmers. *Archives of Environmental Health*, **30**: 445-448.
- Hobbie, J. E., Daley, R. J. e Jasper, S. (1977)** - Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Applied and Environmental Microbiology* **33**: 1225-1228.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T. e Williams, S. T. (eds.) (1993)** - *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed., Williams and Wilkins, Baltimore.

- Hood, M. A., Ness, G. E. e Blake, N. S. (1983)** - Relationship among fecal coliforms, *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in shellfish. *Applied and Environmental Microbiology* **45**: 122-126.
- Hoppe, H. G. (1976)** - Determination and properties of actively metabolizing heterotrophic bacteria in the sea, investigated by means of microautoradiography. *Marine Biology* **36**: 291-302.
- Huq, A., Small, E. B., West, P. A., Huq, M. I., Rahman, R. e Colwell, R. R. (1983)** - Ecological relationships between *Vibrio cholera* and planktonic crustacean copepods. *Applied and Environmental Microbiology* **45**: 275-283.
- Hussong, D., Damare, J. M., Limpert, R. J., Sladen, W. J. L., Weiner, R. M. e Colwell, R. R. (1979)** - Microbial impact of Canada geese (*Branta canadensis*) and whistling swans (*Cygnus columbianus columbianus*) on aquatic ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology* **37**: 14-20.
- Ignazzitto, G., Volterra, L., Aulicino, F. A. e d'Agnelo, A. M. (1980)** - Coliphages as indicators in a treatment plant. *Water, Air and Soil Pollution* **13**: 391-398.
- Instituto Nacional de Investigação das Pescas (INIP) (1979)** - Projecto de trabalho para o conhecimento de alguns aspectos do ciclo biológico da Ria de Faro/Olhão, sobretudo visando o seu aproveitamento no sentido da aquacultura, particularmente da piscicultura: relatório final da 1ª fase. Relatório Técnico Administrativo. INIP 2.
- Instituto Nacional de Estatística (1993)** - Censos 91: resultados definitivos: Região do Algarve.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) (1978)** - Microbiología de los Alimentos. Vol. 1. Técnicas de análisis microbiológicos. Editorial Acribia, Zaragoza.
- Isenberg, H.D., Goldberg, D. e Sampson, J. (1970)** - Laboratory studies with a selective enterococcus medium. *Applied Microbiology* **20**: 433-436.
- Ishida, Y., Nakayama, A. e Kadota, H. (1974)** - Temperature-salinity effects upon the growth of marine bacteria. In: Effect of the Ocean Environment on Microbial Activities (Colwell, R. R. e Morita, R. Y., eds.), University Park Press, Baltimore, pp. 80-91.
- Jannasch, H. W. (1965)** - Biological significance of bacterial counts in aquatic environments. *Proceedings Atmosphere Biology Conference*, pp. 127-131.

- Jannasch, H. W. (1979)** - Microbial ecology of aquatic low nutrient habitats. *In: Strategies of Microbial Life in Extreme Environments* (Shilo, M. ed.), Verlag Chemie, Berlin.
- Jehl-Pietri, Ch., Dupont, J. e Munro, J. (1991)** - Viral and bacterial contamination of shellfish harvested in the natural environment. *Kieler Meeresforsch., Sonderh. 8*: 297-302.
- Jones, G. E. (1971)** - The fate of freshwater bacteria in the sea. *Developments in Industrial Microbiology 12*: 141-151.
- Jones, G. E. e Cobert, A. B. (1975)** - Heavy metal ions as the principal bactericidal agent in Caribbean sea water. *In: Discharge of Sewage from Sea Outfalls* (Gameson, A. L. H. ed.), Pergamon Press, London, pp. 199-208.
- Jones, F. e Watkins, J. (1985)** - The water cycle as a source of pathogens. *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement 59*: 27s-36s.
- Kapuscinski, R. B. e Mitchell, R. (1981)** - Solar radiation induces sublethal injury in *Escherichia coli* in seawater. *Applied and Environmental Microbiology 41*: 670-674.
- Kendall, M. G. e Stuart, A. (1963)** - The advanced theory of statistics. 2nd ed., vol. 1. Charles Griffin & Co., Ltd., London.
- Kennedy Jr, J. E., Bitton, G. e Oblinger, J. L. (1985)** - Comparison of selective media for assay of coliphages in sewage effluent and lake water. *Applied and Environmental Microbiology 49*: 33-36.
- Kenner, B. A. e Clark, H. F. (1974)** - Detection and enumeration of *Salmonella* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Water Pollution Control Federation 46*: 2163-2171.
- Kenner, B. A., Clark, H. F. e Kabler, P. W. (1960)** - Faecal streptococci, (Part II): Quantification of streptococci in faeces. *American Journal of Public Health 50*: 1553-1559.
- Kenner, B. A., Clark, H. F. e Kabler, P. W. (1961)** - Faecal streptococci (Part I): Cultivation and enumeration of streptococci in surface waters. *Applied Microbiology 9*: 15-20.
- Kepner, R. L. Jr. e Pratt, J. R. (1994)** - Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present. *Microbiological Reviews 58*: 603-615.

- Ketchum, B. M. e Kester, D. R. (1983)** - Ocean dumping of industrial wastes. *In: Industrial and Sewage Wates in the Ocean*, vol.1 (Ketchum, B. M. e Kester, D. R. eds.), Jonh Wiley & Sons, New York, pp. 19-44.
- Kfir, R., Coubrough, P. e Grabow, W. O. K. (1990)** - The occurence of male-specific and somatic bacteriophages in South African polluted waters. *Abstract International Symposium on Health-Related Waters Microbiology*, **53**.
- Kjellander, J. (1960)** - Enteric streptococci as indicators of faecal contamination of water. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica* **48** (suppl. 136): 1-133.
- Knudtson, L. M. e Hartman, P. A. (1992)** - Routine procedures for isolation and identification of enterococci and fecal streptococci. *Applied and Environmental Microbiology* **58**: 3027-3031.
- Kolbel-Boelke, J., Tienken, B. e Nehrkorn, A. (1988)** - Microbial communities in the saturated groundwater environment I: methods of isolation and characterization of heterotrophic bacteria. *Microbial Ecology* **16**: 17-29.
- Kogure, K., Simidu, U. e Taga, N. (1979)** - A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* **25**: 415-420.
- Kott, Y. (1966)** - Estimation of low numbers of *Escherichia coli* bacteriophages by use of Most Probable Number method. *Applied Microbiology* **14**: 141-144.
- Kott, Y. (1977)** - Current concepts of indicator bacteria. *In: Bacterial Indicators/Health Hazards Associated with Water* (Hoadley, A. W. e Dutka, B. J., eds.), American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp. 3-14.
- Kott, Y. (1981)** - Viruses and bacteriophages. *Science of the Total Environment* **18**: 13-23.
- Kott, Y., Roze, N., Sperber, S. e Betzer, N. (1974)** - Bacteriophages as viral pollution indicators. *Water Research* **8**: 165-171.
- Kuznetsov, S. I. (1977)** - Trends in ecological microbiology. *In: Advances in Aquatic Microbiology*, vol.1 (M. R. Droop e H. W. Jannasch, eds.), Academic Press, London, pp. 53-71.
- Laanbroek, H. J. e Verplanke, J. C. (1986)** - Tidal variations in bacterial biomass, productivity and oxygen uptake rates in a shallow channel in the Oosterschelde basin, the Netherlands. *Marine Ecology Progress Series* **29**: 1-5.

- LaBelle, R. L., Gerba, C. P., Goyal, S. M., Melnick, J. L., Cech, I. e Bogdan, G. F. (1980)** - Relationships between environmental factors, bacterial indicators, and the occurrence of enteric viruses in estuarine sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **39**: 588-596.
- Lachica, R.V. F. e Hartman, P. A. (1968)** - Two improved media for isolating and enumerating enterococci in certain frozen foods. *Journal of Applied Bacteriology* **31**: 151-156.
- Lafarga, M. A., Castillo, J., Navarro, M. e Gómez-Lus, R. (1991)** - Serotipos de *Salmonella enterica* en aguas residuales de Zaragoza. Comparación con aislamientos clínicos. 1982-1989. *Microbiologia SEM* **7**: 23-36.
- Leclerc, H., Mossel, D. A., Trinel, P. A. e Gavini, F. (1977)** - Microbiological monitoring - a new test for fecal contamination. *In*: Bacterial Indicators/Health Hazards Associated with Water (Hoadley, A. W., e Dutka, B. J., eds.), American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp. 21-31.
- Lembke, J., Krusch, U., Lompe, A. e Teuber, M. (1980)** - Isolation and ultrastructure of bacteriophages of group N (lactic) streptococci. *Zentralblatt fur Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene (Abteilung I, Originale C)* **1**: 79-91.
- Lessard, E. J. e Sieburth, J. McN. (1983)** - Survival of natural sewage populations of enteric bacteria in diffusion and batch chambers in the marine environment. *Applied and Environmental Microbiology* **45**: 950-959.
- Levin, M. A. e Cabelli, V. P. (1972)** - Membrane filter technique for enumeration of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology* **24**: 864-870.
- Levin, M. A., Fischer, J. R. e Cabelli, V. J. (1975)** - Membrane filter technique for enumeration of enterococci in marine waters. *Applied Microbiology* **30**: 66-71.
- Lima, C. e Vale, C. (1977)** - Ria de Faro-Olhão: aspectos físicos, químicos e bacteriológicos. MAP, Secretaria de Estado das Pescas. Direcção Geral de Investigação e Protecção dos Recursos Vivos e do Ambiente Aquático, Lisboa.
- Lima, C. e Vale, C. (1980)** - Alguns dados físico-químicos e bacteriológicos sobre a Ria Formosa. *Boletim do Instituto Nacional de Investigação das Pescas* **3**: 5-25.
- Lin, S. D. (1974)** - Evaluation of streptococci tests for chlorinated secondary sewage effluents. *Journal of Environmental Engineering* **100**: 253-267.
- Lord, D. A., Grabow, W. O. K. e Roberts, M. J. (1989)** - Dispersion of sewage wastes in nearshore coastal waters: applicability of water quality criteria. *Water Science and Technology* **21**: 77-81.

- Lucena, F., Finance, C., Jofre, J., Sancho, J. e Schwartzbrod, L. (1982)** - Viral pollution determination of superficial waters (river water and sea water) from the urban area of Barcelona (Spain). *Water Research* **16**: 173-177.
- Mariño, M. G., Hernández, M. e Fernández, M. (1986)** - Relación entre la calidad microbiológica de las aguas de baño y efectos sanitarios y aceptación estética de los bañistas. Sistema Integrado del Ebro, Madrid.
- Martin, Y. P. e Bonnefont, J. L. (1986)** - Conditions de décroissance en milieu marin des bacteries fecales des eaux usees urbaines. *Océanis* **12**: 403-418.
- Martinez-Manzanares, E. (1989)** - Estudio microbiológico de los moluscos de la desembocadura del Río Guadalhorce. Relación con las toxi-infecciones alimentarias. Tesis doctoral. Universidad de Málaga.
- Martinez-Manzanares, E., Moriñigo M. A., Cornax, R., Egea, F. e Borrego, J. J. (1991)** - Relationships between classical indicators and several pathogenic microorganisms involved in shellfish-borne diseases. *Journal of Food Protection* **54**: 711-717.
- Martinez-Manzanares, E., Moriñigo, M. A., Castro, D., Balebona, M. C., Sánchez, J. M. e Borrego, J. J. (1992)** - Influence of fecal pollution of marine sediments on the microbial content of shellfish. *Marine Pollution Bulletin* **24**: 342-349.
- Massapina, M. C. (1982)** - Contribuição para o estudo das comunidades zooplanctónicas da Ria de Faro-Olhão. Relatório de Estágio de Licenciatura. Faculdade de Ciências. Universidade Clássica de Lisboa.
- McCambridge, J. e McMeekin, T. A. (1980)** - Effect of the temperature on activity of predators of *Salmonella typhimurium* and *E. coli* in estuarine water. *Australian Journal Marine Freshwater Research* **31**: 851-855.
- McCoy, J. H. (1971)** - Sewage pollution of natural waters. In: *Microbial Aspects of Waters Pollution* (Sykes, G. e Skinner, F.A., eds.), Academic Press, Inc., London, pp. 33-50.
- McFeters, G. A. e Camper, A. K. (1983)** - «Enumeration of coliform bacteria exposed to chlorine». In: *Advances in Applied Microbiology* (Laskin, A. I., ed.) **29**: 177-193, Academic Press, New York.
- McFeters, G. A. e Singh, A. (1991)** - Effects of aquatic environmental stress on enteric bacterial pathogens. *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement* **70**: 115S-120S.

- McFeters, G. A., Bissonnette, G. K., Jezeski, J. J., Thomson, C. A. e Stuart, D. G. (1974)** - Comparative survival of indicator bacteria and enteric pathogens in well water. *Applied Microbiology* **27**: 823-829.
- Meadows, P. S. e Anderson, J. G. (1968)** - Microorganisms attached to marine sand grains. *Journal of the Marine Biological Association* **48**:161-175.
- Mesquita, M. M. F. de (1988)** - Bacterial and bacteriophage investigations using the mussel *Mytilus edulis*. PhD. Thesis, University of Newcastle upon Tyne, U. K.
- Mesquita, M. M. F. de (1989)** - Bacteriófagos como modelos virais em estudos de qualidade de águas e marisco. *Revista Brasileira Biologia*, **49**: 923-931.
- Mesquita, M. M. F. de, Evison, L. M. e West, P. A. (1991)** - Removal of faecal indicator bacteria and bacteriophages from the common mussel (*Mytilus edulis*) under artificial depuration conditions. *Journal of Applied Bacteriology* **70**: 495-501.
- Metcalf, T. G. (1978)** - Indicators for viruses in natural waters. In: Water Pollution Microbiology, vol. 2 (Mitchell, R., ed.), Wiley-Interscience Publ., New York, pp. 301-326.
- Miescier, J. J. (1977)** - The occurrence and variability of bacterial indicator organism in raw and treated sewage. M. S. Thesis, University of Rhode Island, Kingston.
- Mitchell, R. e Chamberlain, C. (1975)** - Factors influencing the survival of enteric microorganisms in the sea: an overview. In: Discharge of Sewage from Sea Outfalls (Gameson, A. L. H., ed.), Pergamon Press, London, pp: 237-251.
- Monteiro, C. L. C. (1989)** - La faune ichthyologique de la lagune Ria Formosa (sud Portugal). Repartition et organization spatio-temporelle des communautés: application à l'aménagement des ressources. Thèse de Doctorat. Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier.
- Moore, W. E. C. e Holdeman, L.V. (1974)** - Human faecal flora: the normal flora of 20 Japanese Hawaiians. *Applied Microbiology* **27**: 961-979.
- Moriñigo, M.A. (1987)** - Estudio bacteriológico de especies del género *Salmonella* aisladas a partir de aguas naturales. Tesis Doctoral. Universidad de Málaga.
- Moriñigo, M. A., Borrego, J. J. e Romero, P. (1986)** - Comparative study of different methods for detection and enumeration of *Salmonella* spp. in natural waters. *Journal of Applied Bacteriology* **61**: 169-176.

- Moriñigo, M. A., Cornax, R., Muñoz, M. A., Romero, P. e Borrego, J. J. (1989)** - Viability of *Salmonella* species in natural waters. *Current Microbiology* **18**: 267-273.
- Moriñigo, M. A., Cornax, R., Muñoz, M., A., Romero, P. e Borrego, J. J. (1990)** - Relationships between *Salmonella spp* and indicator microorganisms in polluted natural waters. *Water Research* **24**: 117-120.
- Moriñigo, M. A., Wheeler, D., Berry, C., Jones, C., Muñoz, M. A., Cornax, R. e Borrego, J. J. (1992)** - Evaluation of different bacteriophage groups as faecal indicators in contaminated natural waters in Southern England. *Water Research* **26**: 268-271.
- Mosley, J. (1964)** - Clams-associated epidemics of infectious hepatitis. Center for Diseases Control Reports, Nº 18-19.
- Mosley, J. W. (1975)** - Epidemiological aspects of microbial standards for bathing beaches. *In: Discharges of Sewage from Sea Outfalls* (Gameson, A. L. H., ed.), Pergamon Press, Oxford, pp. 85-94.
- Mossel, D. A. A. (1982)** - Marker (index and indicator) organisms in food and drinking water. Semantics, ecology, taxonomy and enumeration. *Antonie van Leeuwenhoek* **48**: 609-611.
- Mossel, D. A. A., Diepen, H. M. von e De Bruin, A. S. (1957)** - The enumeration of faecal streptococci in foods, using Packer's crystal violet sodium azide blood agar. *Journal of Applied Bacteriology* **20**: 265-272.
- Mossel, D. A. A., Harrewijin, G.A. e Berdien, J. M. (1973)** - Recommended routine monitoring procedures for the microbiological examination of foods and drinking water. UNICEF, Geneve.
- Motes Jr, M. L. (1982)** - Effect of chlorinated wash water on *Vibrio cholerae* in oyster meats. *Journal of Food Science* **47**: 1028-1029.
- Mujeriego, R., Bravo, J. M., Canovas, F., Vicente, A. de, Piñas, M., Grane, S., Hernández, A. e Feliú, M. T. (1980 a)** - Calidad de aguas costeras y vertido de aguas residuales en el mar: sus aspectos sobre la salud pública. Comité Conjunto
- Mujeriego, R. , Bravo, J. M., Pinas, M. e Sanchez Murias, B. (1980 b)** - Statistical variation of microbiological quality of coastal waters: regulatory implications. *Journées Études Pollution* **5**: 49-60.
- Mundt, J. O. e Graham, W. F. (1968)** - *Streptococcus faecium* var. *cassiliflavus*, non var. *Journal of Bacteriology* **95**: 2005-2009.

- Munro, P. e Bianchi, M. (1986)** - Comparaison de méthodes directes (microscopiques) et indirectes (par mise en culture) dans l'évaluation d'une pollution bactérienne d'origine fécale. Étude préliminaire. GERBAM - Deuxième colloque international de bactériologie marine. IFREMER, Actes de Colloques 3: 515-520.
- Murray, B. E. (1990)** - The life and times of the *Enterococcus*. *Clinical Microbiology Reviews* 3: 46-65.
- Muzavor, S. (1986)** - Lagunas costeiras: o caso particular da Ria Formosa. In: Os Sistemas Lagunares do Algarve. Actas Seminário Comemorativo do Dia Mundial do Ambiente, Universidade do Algarve, pp. 5-10.
- Muzavor, S., Arruda, L. M. e Andrade, J. P. A. S. (1993)** - Roteiro ecológico da Ria Formosa. II - Peixes. Algarve em Foco Editora, Faro.
- Niemi, M., Sibakov, M. e Niemela, S. (1983)** - Antibiotic resistance among different species of fecal coliforms isolated from water samples. *Applied and Environmental Microbiology* 45: 79-83.
- Norkrans, B. (1966)** - Studies on marine occurring yeasts: Growth related to pH, NaCl concentration and temperature. *Archives of Microbiology* 54: 374-392.
- Nowlan, S. S. e Deibel, R. H. (1967)** - Group Q streptococci (Part I): ecology, serology, physiology and relationship to establish enterococci. *Journal of Bacteriology* 94: 291-296.
- Nunes, M. C. (1984a)** - Contaminação bacteriana na Ria Formosa. 3º Congresso do Algarve. Textos das comunicações. Montechoro 1: 459-467.
- Nunes, M. C. (1984b)** - «Ria de Faro-Olhão». II - Estudo bacteriológico da água (Maio de 1972 - Maio de 1973). Seminario de Estudos Galegos, Vigo, *Cuadernos da Area de Ciencias Mariñas* 1: 357-364.
- Nunes, M. C. (1990)** - Contribuição para o estudo da contaminação bacteriana de moluscos bivalves do Estuário do Tejo. Dissertação apresentada para acesso à categoria de Investigador Auxiliar, na área científica de Microbiologia, do INIP. Instituto Nacional de Investigação das Pescas, Lisboa.
- Nunes, M. C.** - Exigências comunitárias e a qualidade bacteriológica dos moluscos bivalves da Ria Formosa. Actas do 1º Encontro sobre a Ria Formosa. Parque Natural da Ria Formosa / Universidade do Algarve / Instituto Nacional de Investigação das Pescas. Quinta de Marim. Olhão (em publicação).

- O' Keefe, B. e Green, J. (1989)** - Coliphages as indicators of faecal pollution at three recreational beaches on the Firth of Forth. *Water Research* **23**: 2696-2701.
- Olivieri, V. P. (1982)** - Bacterial indicators of pollution. *In*: Bacterial Indicators of Pollution (Pipes, W. O., ed.), CRC Press, Inc., Boca Raton, pp. 21-41.
- Pagel, J. E. e Hardy, G. M. (1980)** - Comparison of selective media for the enumeration and identification of fecal streptococci from natural sources. *Canadian Journal of Microbiology* **26**:1320-1327.
- Pavlova, M. F., Brezenski, F. T. e Litsky, W. (1972)** - Evaluation of various media for isolation, enumeration and identification of faecal streptococci from natural sources. *Health Laboratory Science* **9**: 289-298.
- Pavlova, A. M., Devriese, L. A., J. Hernandez, F. e Delattre, J. M. (1991)** - Enumeration by a miniaturized method of *Escherichia coli*, *Streptococcus bovis* and enterococci as indicator of the origin of faecal pollution of waters. *Journal of Applied Microbiology* **70**: 525-530.
- Pellet, S., Bigley, D. V. e Grimes, D. J. (1983)** - Distribution of *Pseudomonas aeruginosa* in a riverine ecosystem. *Applied Environment Microbiology* **45**: 328-332.
- Pera, M. T. (1986)** - Algumas considerações sobre o sistema lagunar algarvio. *In*: «Os sistemas lagunares do Algarve». Actas do Seminário Comemorativo Dia Mundial do Ambiente, Universidade do Algarve, pp. 18-21.
- Pereira, M. G. e Alcântara, F. (1993)** - Culturability of *Escherichia coli* and *Streptococcus faecalis* in batch culture and "in situ" in estuarine water (Portugal). *Water Research* **27**: 1351-1360.
- Petrili, F. L. (1979)** - Survey of the pollution in a coastal area of the Tyrrhenian Sea. *Water Research* **13**: 895-904.
- Pettipher, G. L. e Rodrigues, U. M. (1982)** - Rapid enumeration of microorganisms in food by the direct epifluorescent filter technique. *Applied and Environmental Microbiology* **44**: 809-813.
- Phleger, F. B. (1969)** - Some general features of coastal lagoons. *In*: Lagunas Costeras (Castañares, A.A. e Phleger, F. B., eds.), UNAM-UNESCO, México D. F., pp. 5-26.
- Pipes, W. O. (1982a)** - Introduction. *In*: Bacterial Indicators of Pollution (Pipes, W. O., ed.), CRC Press Inc., Boca Raton, pp. 2-16.

- Pipes, W. O. (1982b)** - Indicators and water quality. *In: Bacterial Indicators of Pollution* (Pipes, W. O., ed.), CRC Press Inc., Boca Raton, pp. 83 - 95
- Plusquellec, A., Beucher, M. e Le Gal, Y. (1983)** - Enumeration of the bacterial contamination of bivalves in monitoring the marine bacterial pollution. *Marine Pollution Bulletin* **14**: 260-263.
- Plusquellec, A., Beucher, M. e Le Gal, Y. (1984)** - Bivalves: indicateurs de pollution microbienne des eaux littorales. *In: Actes des Colloques. Deuxième Colloque International de Bacteriologie Marine* (Groupe d'étude et de recherche en bacteriologie marine, GERBAM, IFREMER, ed.), CNRS **3**: 541-548.
- Plusquellec, A., Beucher, M., Prieur, D. e Le Gal, Y. (1990)** - Contamination of the mussel, *Mytilus edulis* Linnaeus, 1758, by enteric bacteria. *Journal of Shellfish Research* **9**: 95-101.
- Pomroy, A. J. (1984)** - Direct counting of bacteria preserved with lugol iodine solution. *Applied and Environment Microbiology* **47**: 1191-1192.
- Portugal. Ministério da Habitação e das Obras Públicas. Secretaria de Estado do Ordenamento Físico e Ambiente (1978)** - Decreto 45/78. *Diário da República* **100** (1ª Série): 798- 800.
- Portugal. Ministério do Planeamento e da Administração do Território (1987)** - Decreto lei 373/87. *Diário da República* **282** (1ª Série): 4257- 4262.
- Portugal. Ministério do Planeamento e da Administração do Território (1990)** - Decreto lei 74/90. *Diário da República* **55** (1ª Série): 981-1024.
- Pourcher, A.-M., Devriese, L. A., Hernandez, J. F. e Delattre, J. M. (1991)** - Enumeration by a miniaturized method of *Escherichia coli*, *Streptococcus bovis* and enterococci as indicators of the origin of faecal pollution of waters. *Journal of Applied Bacteriology* **70**: 525-530.
- Pratt, D. e Reynolds J. (1974)** - Selective media for characterizing marine bacterial populations. *In: Effect of the Ocean Environment on Microbial Activities* (Colwell R.R. e Morita R. Y., ed.), University Park Press, Baltimore, pp. 258 - 267.
- Rheinheimer, G. (1977)** - Regional and seasonal distribution of saprophytic and coliform bacteria. *In: Microbial Ecology of a Brackish Water Environment. Ecological Studies V. 25* (Rheinheimer, G., ed.), Springer-Verlag, Berlin, pp. 121-137.
- Rheinheimer, G. (1992)** - Aquatic Microbiology. 4th ed. John Wiley & Sons, London.

- Rheinheimer, G. e Schmaljohann, R. (1983)** - Investigations on the influence of coastal upwelling and polluted rivers on the microflora of the Northeastern Atlantic of Portugal. I. Size and composition of the bacterial populations. *Botanica Marina* **26**: 137-152.
- Rheinheimer, G., Gocke, K. e Hoppe, G. (1989)** - Vertical distribution of microbiological parameters in different areas of the Baltic Sea. *Marine Ecology Progress Series* **52**: 55-70.
- Rodier, J. (1984)** - L'Analyse de l'Eau: Eaux Naturelles, Eaux Residuares, Eaux de Mer. 7^{ème} ed. Dunod, Paris.
- Ruoff, K. L. (1990)** - Recent taxonomic changes in the genus *Enterococcus*. *European Journal Clinical Microbiology of Infectious Diseases* **9**: 75-79.
- Rutkowsky, A. A. e Sjogren, R. E. (1987)** - Streptococcal population profiles as indicators of water quality. *Water, Air and Soil Pollution* **34**: 273-284.
- Sampayo, M. A. A.** - Estão os blooms de microalgas a intensificar-se na Ria Formosa?. Actas do 1º Encontro sobre a Ria Formosa. Parque Natural da Ria Formosa/Universidade do Algarve/Instituto Nacional de Investigação das Pescas. Quinta de Marim. Olhão (em publicação).
- Sanchez, J. M., Arijo, S., Muñoz, M. A., Moriñigo, M. A. e Borrego, J. J. (1994)** - Microbial colonization of different support materials used to enhance the methanogenic process. *Applied Microbiology and Biotechnology* **41**: 480-486.
- Santiago, G., (1986)** - L'épuration des mollusques: méthodologie au controle sanitaire: culture de mollusques en Méditerranée. MEDRAP. Tunis.
- Schirnding, Y. E. R. von, Strauss, N., Robertson, P., Kfir, R., Fattal, B., Mathee, A., Franck, M. e Cabelli, V. J. (1993)** - Bather morbidity from recreational exposure to sea water. *Water Science and Technology* **27**: 183-186.
- Schleifer, K. H. e Kilpper-Balz, R. (1984)** - Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **34**: 31-34.
- Seeley, N. D. e Primrose, S. B. (1980)** - The effect of temperature on the ecology of aquatic bacteriophages. *Journal of General Virology* **46**: 87-95.

- Serafim, M. A. e Bebiano, M. J.** - Acumulação e distribuição de alguns metais pela ameijoia *Ruditapes decussata*. Actas do 1º Encontro sobre a Ria Formosa. Parque Natural da Ria Formosa / Universidade do Algarve / Instituto Nacional de Investigação das Pescas. Quinta de Marim. Olhão (em publicação).
- Shuval, H. I. (1975)** - «The case for microbial standards for bathing beaches». *In: Discharges of Sewage from Sea Outfalls* (Gameson, A. L. H., ed.), Pergamon Press, Oxford, pp. 95-101.
- Shuval, H. I. (1986)** - Thalassogenic Diseases. *In: UNEP Regional Sea Reports and Studies N° 79*, United Nations Environment Programme, Nairobi, pp. 1-40.
- Shuval, H.I., Cohen, J. e Kolodney, R. (1973)** - Regrowth of coliforms and fecal in chlorinated wastewater effluent. *Water Research* 7: 537-546.
- Silva, E. S. e Assis, M. E. (1970)** - Pigments and predominant plankton in sea-water samples «Ria de Faro-Olhão» from May 1967 to May 1968. *Notas e Estudos do Instituto de Biologia Marítima, Lisboa*, 38: 14 p.
- Sinclair, J. L. e Alexander, M. (1984)** - Role of resistance to starvation in bacterial survival in sewage and lake water. *Applied and Environmental Microbiology* 48: 410-415.
- Sinton, L. W., Donnison, A. M. e Hastie, C. M. (1993a)** - Faecal streptococci as faecal pollution indicators: a review (Part I): Taxonomy and enumeration. *New Zealand Journal Marine Freshwater Research* 27: 101-115.
- Sinton, L. W., Donnison, A. M. e Hastie, C. M. (1993b)** - Faecal streptococci as faecal pollution indicators: a review (Part II): Sanitary significance, survival and use. *New Zealand Journal Marine Freshwater Research* 27: 117-137.
- Slanetz, L. W. e Bartley, C. H. (1957)** - Numbers of enterococci in water, sewage and feces determined by the membrane filter technique with an improved medium. *Journal of Bacteriology* 74: 591-595.
- Slanetz, L. W. e Bartley, C. H. (1964)** - Detection and sanitary significance of faecal streptococci in water. *American Journal of Public Health* 54: 609-614.
- Slanetz, L. W. e Bartley, C. H. (1965)** - Survival of fecal streptococci in seawater. *Health Laboratory Science* 2: 142-148.
- Smibert, R. M. e Krieg, N. R. (1981)** - General characterization. *In: Manual of Methods for General Bacteriology* (Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Costillow, R. N., Nester, E. W., Wood, W. A., Krieg, N. R., e Phillips, G. B., eds.). American Society of Microbiology, Washington, D.C, pp. 409-433.

- Sokal, R. R., e Rholf, F. J. (1980)** - Introducción a la Bioestadística. Editorial Reverté, Barcelona.
- Sokal, R. R., e Rholf, F. J. (1981)** - Biometry. W. H. Freeman and Company, New York.
- Sprung, M. (1994)** - High larval abundances in the Ria Formosa (Southern Portugal)-methodological or local effect?. *Journal of Plankton Research* **16**: 151-160.
- Stevenson, L. H. (1978)** - A case for bacterial dormancy in aquatic systems. *Microbial Ecology* **4**: 127-133.
- Stevenson, L. H., Millwood, C. E. e Hebel B. H. (1974)** - Aerobic, heterotrophic bacterial populations in estuarine water and sediments. *In: Effect of the Ocean Environment on Microbial Activities* (Colwell R.R. e Morita R. Y., eds.), University Park Press, Baltimore, pp. 268-285.
- Suzuky, M. T., Sherr, E. B. e Sherr, B. F. (1993)** - DAPI direct counting underestimates bacterial abundances and average cell size compared to AO direct counting. *Limnology and Oceanography* **38**: 1566-1570.
- Switzer, R.E. e Evans, J. B. (1974)** - Evaluation of selective media for enumeration of Group D streptococci in bovine feces. *Applied Microbiology* **28**: 1086-1087.
- Tartera, C. e Jofre, J. (1987)** - Bacteriophages active against *Bacteroides fragilis* in sewage-polluted water. *Applied and Environmental Microbiology* **53**: 1632-1637.
- Trollope, D. R. (1984)** - Use of molluscs to monitor bacteria in water. *In: Microbiological Methods for Environmental Biotechnology* (Grainger, J. M. e Lynch, J. M., eds.), Academic Press, London, pp. 393-408.
- Trollope, D. R. e Al Salihi, S. B. S. (1984)** - Sewage derived bacteria monitored in a marine water column by means of captive mussels. *Marine Environment Research* **12**: 311-322.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA) (1986)** - Ambient water quality criteria for bacteria. EPA 440/5-84-002, Office of Regulations and Standards, US Environmental Protection Agency, Washington, D. C.
- Van Uden, N. (1967)** - Occurrence and origin of yeasts. *In: Estuaries* (Lauff, G. H., ed.), AAAS **83**: 306-310.
- Vasconcelos, G. J. e Swartz, R. G. (1976)** - Survival of bacteria in seawater using a diffusion chamber apparatus in situ. *Applied and Environmental Microbiology* **31**: 913-920.

- Vaughn, J. M. e Metcalf, T. G. (1975)** - Coliphages as indicators of enteric viruses in shellfish and shellfish raising estuarine waters. *Water Research* **9**: 613-616.
- Vicente, A. de (1986)** - Estudio de *Pseudomonas aeruginosa* en aguas naturales contaminadas. Tesis Doctoral. Universidad de Málaga.
- Vicente, A. de, Borrego, J. J., Arrabal, F. e Romero, P. (1986)** - Comparative study of selective media for enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* from water by membrane filtration. *Applied and Environmental Microbiology* **51**: 832-840.
- Volterra, L. (1991)** - Comparison of methods for enumeration of faecal in seawater. In: Development and Testing of Sampling and Analytical Techniques for Monitoring of Marine Pollutants (Activity A): final reports on selected microbiological projects. UNEP, Athens, *MAP Technical Reports series* N° **54**, pp. 61-73.
- Volterra, L., Aulicino, F. A., Tosti, E. e Zicarelli, M. (1979)** - Microbial monitoring of pollution in shellfish from the Napolitan areas. *I. A. W. P. R. Specialised Conference on the Mediterranean pollution*. Palma de Mallorca.
- Volterra, L., Bonadonna, L. e Aulicino, F. A. (1985)** - Comparison of methods to detect fecal streptococci in marine waters. *Water, Air and Soil Pollution* **26**: 201-210.
- Volterra, L., Bonadonna, L. e Aulicino, F. A. (1986)** - Fecal streptococci recoveries in different marine areas. *Water, Air and Soil Pollution* **29**: 403-413.
- Wallis, I. G. (1977)** - Initial dilution with deep water diffusers. *Journal of the Water Pollution Control Federation* **17**: 1621-1626.
- White, W. R. e Godfree, A. F. (1986)** - Pollution of freshwater and estuaries. *Society for Applied Bacteriology Symposium* **14**: 67S-79S.
- Wiebe W. J. e Hendricks C. W. (1974)** - Distribution of heterotrophic bacteria in a transect of the Antarctic Ocean. In: Effect of the Ocean Environment on Microbial Activities (Colwell R.R. e Morita R. Y., eds.), University Park Press, Baltimore, pp. 524-535.
- Wood, P. C. (1976)** - Guide to shellfish hygiene. *WHO, Publication* n° **31**. World Health Organization. Geneva.
- Wood, P. C. (1979)** - Enfermedades transmitidas por los mariscos. In: Manual de Higiene de los Mariscos. Acribia. Zaragoza, pp: 23-32.

- World Health Organization (1977a)** - Health criteria and epidemiological studies related to coastal water pollution. Report of a group of experts jointly convened by WHO and UNEP (Rovinj, Yugoslavia). WHO Regional Office for Europe, Copenhagen.
- World Health Organization (1977b)** - Guidelines for health related monitoring of coastal water quality. Report of a group of experts jointly convened by WHO and UNEP, Rovinj, Yugoslavia. WHO, Copenhagen.
- World Health Organization (1979a)** - Evaluation and interpretation of microbiological data from coastal and shellfish growing waters. Exercise d' interrelationage, project conjoint WHO and UNEP. WHO, Barcelona.
- World Health Organization (1979b)** - Coastal monitoring of recreational and shellfish areas (MED. II). Report of a workshop jointly convened by WHO and UNEP (Rome, Italy). WHO, Copenhagen.
- World Health Organization (1982)** - Examination of water for pollution control: biological, bacteriological and virological examination, vol. 3 (M.J. Suess, ed.), Pergamon Press, Oxford.
- World Health Organization (1994)** - Guidelines for health-related monitoring of coastal recreational and shellfish areas: Part IV. Statistical Methods. *EUR/ICP/CEH 04 (5)*. WHO and UNEP. Copenhagen.
- Xu, H. S., Roberts, N., Singleton, F. L., Attwell, R. W., Grimes, D. J. e Colwell, R. R. (1982)** - Survival and viability of nonculturable *E. coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microbial Ecology* **8**: 313-323.
- Yoshpe-Purer, Y. (1989)** - Evaluation of media for monitoring fecal streptococci in seawater. *Applied and Environmental Microbiology* **55**: 2041-2045.
- Zimmermann, R. (1977)** - Estimation of bacterial number and biomass by epifluorescence microscopy and scanning electron microscopy. In: *Microbial Ecology of a Brackish Water Environment* (Rheinheimer, G. ed.), Ecological Studies **25**, Springer-Verlag, Berlin, pp. 103-120.
- Zimmermann, R. e Meyer-Reil, L.-A. (1974)** - A new method for fluorescence staining of bacterial populations on membrane filters. *Kieler Meeresforsch.* **30**: 24-27.
- ZoBell, C. E. e Grant, C. W. (1943)** - Bacterial utilization of low concentrations of organic matter. *Journal of Bacteriology* **45**: 555-564.

