

1. Introdução

O progresso da qualidade de vida da população mundial trouxe consigo uma maior preocupação com os bens essenciais. A água, como recurso que parecia inesgotável para muitas sociedades, tornou-se um bem de preservação fundamental. Desta forma surgiu também a preocupação com a qualidade da água. As fontes ou origens de água não são hoje as mesmas de há séculos atrás. O desenvolvimento industrial e as práticas agrícolas conduziram a uma alteração significativa dos parâmetros de qualidade da água.

Desde o ponto de captação da água, até ao seu consumo, processam-se diversas etapas, cujas quais têm sido continuamente melhoradas e desenvolvidas a nível tecnológico, de forma a assegurar a sua qualidade dentro de parâmetros considerados seguros para a saúde humana.

1.1 TRATAMENTO DE ÁGUA DESTINADAS AO CONSUMO HUMANO

1.1.1 Enquadramento Histórico

Os primeiros tratamentos da água eram baseados na filtração com o objetivo de remover partículas que lhe conferissem gosto e turvação.

Só já na segunda metade do século XIX, quando a natureza de doenças infecciosas foi descoberta, bem como a capacidade do sistema hidrográfico transmitir doenças (cólera e febre tifóide), é que se reconheceu a importância da limpeza e clareza da água. Constatou-se então a preocupação acerca da qualidade da água para consumo humano, no que implica doenças causadas por microrganismos habitantes no sistema de abastecimento de água.

Vários cientistas analisaram que a turvação não torna somente a água pouco apetecível, como pode também indicar risco para a saúde, dado que as partículas responsáveis pela turvação podem conter patogénicos. Como resultado, os sistemas de tratamento de água para consumo são concebidos para reduzir a turvação e, desse modo remover patogénicos.

Desta forma no início do século XX, uma maior proteção do sistema hidrográfico, aliado a métodos simples e efetivos de tratamento da água, têm reduzido consideravelmente as doenças relacionadas com a água em países desenvolvidos.

1.1.2 Requisitos de qualidade

Apesar da introdução de muitas melhorias nos sistemas de tratamento de água, os conceitos básicos não mudaram. Há cada vez mais uma necessidade de diminuir e limitar os riscos de transmissão de doenças.

As epidemias relacionadas com a água surgem após o consumo de água contaminada com microrganismos patogênicos. Contaminação essa que pode estar na razão da própria origem da água, de um tratamento inadequado ou ineficaz, ou que até pode ocorrer no sistema de distribuição após o tratamento.

O objetivo do tratamento da água para consumo humano consiste assim na produção de água salubre que preencha os requisitos fundamentais a nível da segurança microbiológica e química.

São inúmeras as técnicas disponíveis na remoção de sólidos finos, microrganismos e alguns materiais orgânicos e inorgânicos dissolvidos. Porém, a escolha do método irá depender da qualidade da água a ser tratada, custo do processo de tratamento e padrões de qualidade esperados para a água a ser processada.

A variedade de processos de tratamento é vasta. A seleção do tratamento depende das características da água, do tipo de problemas de qualidade que possam estar presentes, custos dos vários tipos de tratamento, entre outros. Embora cada um dos processos de tratamento seja capaz de reduzir o número de microrganismos, nenhum pode assegurar a sua remoção completa.

As empresas de fornecimento de água destinada ao consumo humano fazem inúmeros esforços no sentido de conseguirem uma água com boa qualidade a partir de diversas fontes contendo uma variedade de contaminantes químicos e biológicos. São aplicados múltiplos tratamentos, incluindo processos químicos, físicos e biológicos, bem como combinações destes, de modo a reduzir as concentrações dos contaminantes abaixo da concentração mínima aceitável (MAC) definida na legislação nacional.

1.1.3 Métodos de Tratamento

Dentro dos progressos mais recentes, desenvolvidos no sentido de assegurar uma maior eficiência e garantia da qualidade de água, visando uma diminuição do tempo gasto no seu tratamento e otimizando os requisitos finais de qualidade da água; etapas como o pré-tratamento, a coagulação e floculação, bem como a filtração, têm ocupado maior importância. Em simultâneo, assiste-se ao desenvolvimento tecnológico que melhore a desinfecção e promova o controlo da qualidade da água ao longo das redes de distribuição.

Pelo facto de no presente existirem fontes de água bruta, utilizadas para produção de água para abastecimento, com qualidade inferior ao que é desejável, tornou-se fundamental o desenvolvimento e criação de esquemas de tratamento que permitam cumprir os parâmetros definidos para a qualidade de água destinada ao consumo humano. Ainda que em casos de melhor qualidade de água bruta se possa assistir a um tratamento básico, como sejam a filtração e desinfecção; na generalidade, assiste-se à necessidade de tratar águas com baixa qualidade ou com qualidade variável, conduzindo ao desenvolvimento de tratamentos mais profundos e versáteis, que permitam resolver os problemas encontrados.

Existem assim uma vasta gama de processos que podem fazer parte de um esquema geral de tratamento de água, onde se incluem: pré-oxidação, coagulação e floculação, sedimentação, filtração e desinfecção.

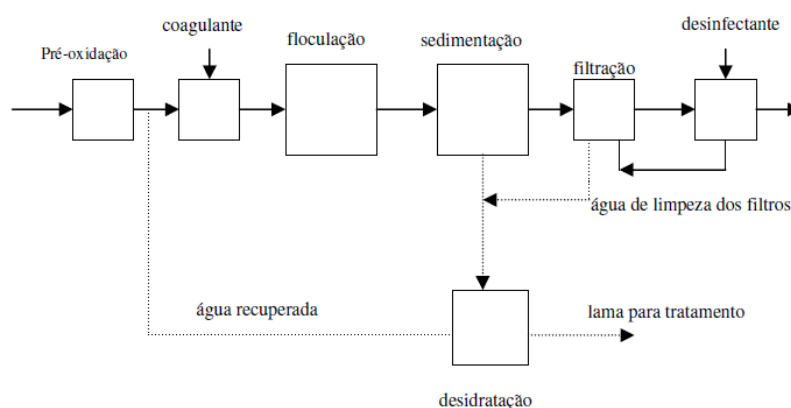


Figura 1. Diagrama resumo do tratamento convencional de água (adaptado de Tebbutt, 1973).

Ainda que seja esperado que muitos dos microrganismos sejam removidos pela coagulação e floculação e posteriormente pela sedimentação, existem sempre alguns, que, devido ao seu tamanho reduzido, conseguem ainda ultrapassar os filtros de areia.

A desinfecção é assim realizada de forma a assegurar a qualidade e segurança da água.

O agente de desinfecção normalmente utilizado é o cloro, porque:

- está disponível como gás, líquido ou sólido (hipoclorito);
- destrói uma grande parte dos agentes patogénicos;
- é fácil de aplicar;
- deixa um residual em solução, de concentração facilmente determinável,
- protege o sistema de distribuição;
- é barato.

O cloro apresenta no entanto algumas desvantagens, uma vez que é um gás venenoso e corrosivo, sendo necessário cuidado na sua utilização. Pode também causar problemas de gosto e de odor (presença de fenóis).

No entanto, existem alternativas à utilização do cloro. Na Europa é largamente utilizado o processo de desinfecção da água com ozono, que, sendo um poderoso oxidante, tem uma ação desinfetante mais intensa e mais rápida do que o cloro.

Os principais efeitos da ozonização são:

- Oxidação da matéria orgânica;
- Melhoria da cor;
- Redução do teor de ferro e manganês;
- Ação sobre os ácidos húmicos, formando produtos biodegradáveis;
- Degradação de fenóis;
- Remoção de certas substâncias orgânicas não biodegradáveis.

Para além disto, o ozono não é afetado pela amónia como é caso do cloro. Por outro lado, a dosagem de ozono é muito afetada pela presença de matéria orgânica. Uma das grandes

desvantagens é o facto do residual de ozono obtido não ser persistente, desaparecendo em pouco tempo.

Outra alternativa é a utilização de radiações ultra-violeta que destroem o DNA dos vírus e bactérias. Para que este método funcione corretamente é necessário que a água esteja quimicamente limpa, de forma a permitir a dispersão da radiação.

Estes métodos são, no entanto, mais dispendiosos que a utilização do cloro (se bem que atualmente os preços destas alternativas começam a baixar e a sua utilização em larga escala pode tornar esses preços bastante competitivos).

Realça-se que todos os desinfetantes químicos têm a si associados subprodutos orgânicos e/ou inorgânicos, que podem causar efeitos secundários. Porém, o risco para a saúde implicados nestes subprodutos é extremamente pequeno quando comparado com os riscos associados a uma desinfeção inadequada.

Não existe nenhum desinfetante ideal, pois cada um ostenta das suas vantagens e desvantagens. Dado que o objetivo é a proteção da saúde pública a escolha depende da qualidade de cada água e do sistema de abastecimento.

Assim sendo, os fatores chave para a seleção do sistema de desinfeção são:

- eficácia na destruição de uma gama de microrganismos;
- potencial para formar subprodutos prejudiciais;
- capacidade do agente desinfetante para permanecer disponível na água ao longo do sistema de distribuição;
- segurança e facilidade de manuseamento dos químicos e equipamentos;
- relação eficácia-custos.

1.1.4 Normas de qualidade da água

A legislação que diz respeito ao controlo da qualidade da água para consumo humano, tem sido alvo de atenção, uma vez que se entendeu a sua enorme importância, no sentido de proteger a saúde humana, bem como no sentido de preservar este importante recurso para o futuro.

As normas que regulam a água de distribuição pública, assim como a água de nascente distribuída em garrafas, são, na Europa, editadas pela Comissão das Comunidades Europeias e respeitadas pelas autoridades nacionais de saúde. Além disso, cada país pode determinar livremente as suas normas ou aceitar as propostas da Organização Mundial de Saúde (OMS), sendo múltiplos os critérios que permitem fixar as normas. Por exemplo, pode desejar-se a presença de certas substâncias como oligoelementos indispensáveis ao organismo humano (o ferro, magnésio, cobre, etc.). No Brasil, como noutros países, é introduzido flúor ou agentes fluoretantes para a redução da incidência de cárie dentária. Noutra perspetiva, é importante limitar (ou até anular) a presença de substâncias conhecidas como tóxicas, bem como vírus ou bactérias (germes patogénicos) tóxicos ou não (por exemplo *E. coli*, acompanha sempre microrganismos patogénicos de origem fecal).

Para que as normas sejam fixadas é necessário proceder a estudos e/ou testes, de modo a confirmar os efeitos e identificar os valores de segurança. O referido, pode ser feito de duas formas: a primeira é detetar os efeitos tóxicos por meio de testes biológicos aplicados a outras espécies, ou a células humanas ou animais cultivados em laboratório, sendo depois os resultados transpostos para o homem com os respetivos coeficientes de segurança; a segunda forma é através da realização de estudos epidemiológicos, para detetar se existe uma correlação estatística entre a taxa de doença numa grande população submetida a doses mais elevadas de certos elementos, em comparação com uma população base.

Em suma, deparamo-nos com a preocupação crescente da Comunidade Europeia, e países aderentes, sobre a qualidade da água e a forma como esta chega aos consumidores.

Este pensamento conduziu ao estabelecimento de normas cada vez mais rigorosas e prudentes no tratamento de água, ao mesmo tempo em que se assiste a uma melhoria dos serviços prestados, bem como a um maior apoio à investigação e desenvolvimento para que, cada vez mais, existam garantias de qualidade sobre um bem comum indispensável.

1.1.5 Controlo de qualidade da água

A qualidade da origem da água depende muitas das vezes da geologia, do tipo de solo, da vegetação natural, do clima, entre outros.

A qualidade microbiana da água está em constante transformação podendo variar rápida e vastamente.

O controlo na qualidade da água destinada ao consumo humano implica duas vertentes: o controlo contínuo da qualidade com base na rotina verificando que o tratamento e distribuição entram em conformidade com os objetivos e regulamentos propostos; bem como a monitorização periódica dos parâmetros microbiológicos em todo o sistema de abastecimento de água, desde a origem até ao consumidor.

A maior preocupação relativa às águas de consumo humano a nível da saúde pública prende-se com a tentativa de reduzir a presença de microrganismos patogénicos a quantidades insignificantes. A diminuição do seu número e a sua hipotética eliminação da água, apenas se torna possível a partir de um controlo rigoroso de vários parâmetros indicadores da qualidade da água, aliado a um processo de tratamento adequado.

Assim, estabelecem-se métodos de pesquisa rotineiros, com o intuito de obter informações ao nível organolético e microbiológico, físicos e químicos. Métodos esses aplicados nas diversas fases do sistema, a fim de detetar possíveis anomalias, ocasionais ou sistemáticas, possibilitar colocar em prática medidas preventivas adequadas e, de um modo indireto, para avaliar a eficácia do tratamento assumindo o cumprimento dos valores paramétricos.

1.1.6 Qualidade da água para consumo humano em sistemas de abastecimento

Atendendo à necessidade de melhorar a qualidade da água fornecida, torna-se essencial conhecer as alterações que ocorrem ao longo do sistema de distribuição, permitindo verificar quais as características modificadas e quais os parâmetros cuja monitorização é necessária para que o processo seja melhorado.

Segundo *Hart et al. (1992)*, os fatores que influenciam a qualidade da água, durante o seu percurso no sistema de distribuição, são:

- As características da qualidade da água (físicas, químicas e biológicas);
- As propriedades das condutas (idade, tipo, rugosidade, corrosão, formação de depósitos, etc.);
- As especificidades do sistema (curvas, inversões, saídas de água, reduções, etc.);
- As características de funcionamento do sistema (consumos, velocidade da água, perdas, tempos de residência, entre outros);
- A mistura de água de diferentes origens.

Os autores acima referidos realizaram um dos primeiros estudos, e provavelmente dos mais completos, acerca da variação da qualidade da água ao longo de um sistema de distribuição (SD). Foram assim avaliados parâmetros como: pH, temperatura, cloro residual, oxigênio dissolvido, cloretos, fosfatos, sulfatos, alcalinidade total, dureza total, turvação, alumínio, cádmio, cobre, cálcio, ferro, manganês, chumbo, zinco e microrganismos heterotróficos. A evolução destes parâmetros foi estudada em função dos seguintes aspetos:

- Local – influência da distância do ponto da rede à Estação de Tratamento de Água;
- Tubagem – influência do material das tubagens do SD;
- Movimento – influência das condições hidrodinâmicas (velocidade, caudal);
- Tempo de Residência – influência do tempo de permanência da água no SD;
- Efeitos Ambientais – influência da estação do ano e da temperatura.

Contudo, não podemos considerar estes princípios como modelos de referência para a generalidade dos casos. Designadamente no caso do cloro e dos subprodutos de desinfecção. Isto por ser fundamental a presença de matéria orgânica e a existência ou não de biofilmes. Como tal, a componente orgânica ganha aqui uma nova importância.

Têm recebido particular interesse os aspetos relativos à lixiviação das condutas (dado que a presença de materiais tóxicos (chumbo) conduzem ao mau funcionamento do sistema de distribuição, devido à ocorrência de corrosão) e aos trihalometanos (resultado da reação do cloro

livre com compostos orgânicos naturais presentes na água). Noutra perspetiva, também tem sido dada importância ao estudo dos parâmetros microbiológicos e do biofilme presente nas condutas.

Os principais fatores com influência na qualidade da água são, comumente, provocados por um controlo pouco eficiente dos processos de produção e distribuição.

Ao nível da produção podem ocorrer problemas que conduzam a uma deficiente coagulação/floculação, devido ao uso insuficiente de coagulante. Por outro lado, pode haver um arrastamento ao nível da filtração, causado pela deficiente limpeza dos filtros. Situações deste tipo podem acarretar o aumento da turvação da água, para além de uma desinfeção pouco eficaz.

A respeito de problemas ao nível do sistema de distribuição, por exemplo a presença de ferro ou cobre, pode provocar alterações no sabor e mesmo na cor da água, devido à corrosão do material das condutas.

Outro parâmetro importante trata-se da população bacteriana. Existem microrganismos capazes de resistir as fases de tratamento e recuperarem a capacidade de divisão, podendo, caso não haja controlo, tornarem-se potencialmente perigosos.

A presença de cloro residual permite prevenir o crescimento microbiano, atuando sobre os microrganismos. Contudo a ação do cloro está dependente de vários fatores, limitando a sua capacidade de atuação.

A utilização de cloro, como desinfetante mais comum, está na razão para que ocorram alterações de sabor e dificuldade em gerir concentrações de modo satisfatório, prevenindo de forma ativa o crescimento bacteriano.

1.1.7 Biofilmes em condutas de abastecimento de água

O biofilme surge em tubagens devido à capacidade que os microrganismos possuem de aderir às suas superfícies, tornando assim possível, a sua divisão, multiplicando-se e formando uma espécie de “filme”.

Tal acontece normalmente dado que o tratamento da água não a torna estéril, permitindo desta forma a sobrevivência de alguns grupos de microrganismos.

A presença de microrganismos pode ocorrer devido a 3 processos relativos a falhas não mecânicas, definidos pelos termos: “Regrowth”, “Aftergrowth”, “Breakthrough” (Momba, 2000).

O termo “Regrowth” é utilizado quando as bactérias recuperam a capacidade de se dividirem, após o tratamento da água. “Aftergrowth” designa o crescimento de microrganismos nativos do sistema de distribuição de água; enquanto que o termo “Breakthrough” é referente a um aumento do número de microrganismos, após bactérias viáveis terem escapado ao processo de desinfecção.

Outro processo de contaminação, bem mais grave, pode ser causado por contaminação externa (quando há uma rotura na conduta).

Alguns destes microrganismos podem aderir à parede da tubagem através de apêndices com origem na sua própria membrana celular, e, com condições favoráveis, desenvolvem uma camada de material orgânico aderente à parede da conduta. Esta superfície pode posteriormente ser colonizada por bactérias. Nesta altura as bactérias são capazes de começar a produzir substâncias poliméricas extracelulares, que variam segundo as diferentes espécies e segundo as condições ambientais, conferindo o aspeto comum destes filmes bacterianos, permitindo uma melhor capacidade de adesão e proteção. Os biofilmes que se formam habitualmente são finos, atingindo, no máximo, algumas centenas de micrómetros.

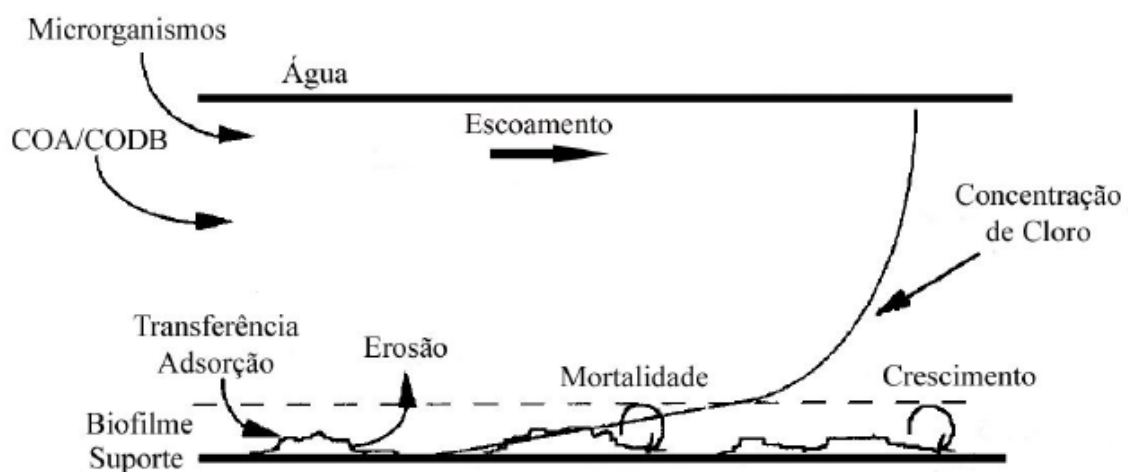


Figura 2. Esquema de formação do biofilme (adaptado de Sibille, 1998)

Geralmente os biofilmes têm uma natureza heterogênea, uma vez que são compostos por duas ou mais espécies, dependendo das condições ambientais.

No que respeita ao modo como o biofilme contribui para a transmissão de patogênicos relacionados com a água, sabe-se que à medida que os microrganismos se multiplicam no biofilmes este aumenta. Deste modo, as forças da água corrente quebram fragmentos que possam conter microrganismos, arrastando-os ao longo do sistema de distribuição da água, processos de dispersão, separação, entre outros. É perceptível assim que o biofilme atua como depósito para a libertação contínua de bactérias na água corrente.

Segundo alguns autores (*Vieira, 2002*), as tubagens constituídas por materiais de base orgânica, lixiviam para a água compostos orgânicos que irão fazer parte do carbono orgânico assimilável (AOC), tornando-se assim como nutrientes para os microrganismos. O material a nível de tubagens também pode interferir nas comunidades microbianas que aí se desenvolvem, sendo que os materiais ferrosos suportam maior índice de diversidade de populações em comparação com o plástico (PVC- policloreto de polivinila).

De acordo com *Meckes (2001)*, são poucos os organismos que habitam os sistemas de distribuição que podem ser uma ameaça para os consumidores comuns. Têm sido isolados bactérias, vírus, fungos e protozoários de biofilmes de condutas, o que comprova o que já foi referido anteriormente, ou seja, mesmo com os processos de tratamento altamente eficazes, existem sempre alguns microrganismos com a capacidade de ultrapassar esses processos, ou de ingressarem no sistema numa fase posterior ao tratamento realizado nas ETAs. Embora seja desconhecido o efeito real destes organismos na saúde pública, não têm sido revelados problemas devido à existência de biofilmes nas tubagens, sendo no entanto importante estabelecer que as normas de qualidade de água têm de ser respeitadas. A maior parte das bactérias sobrevive encontrando ou criando um ambiente propício ao seu desenvolvimento, sendo capazes de desenvolver formas de proteção, como sejam o encapsulamento, a agregação e capacidade de sobreviver em situações de falta de nutrientes ou nutrientes em quantidade reduzida.

Meckes (2001) também refere a existência de microrganismos heterotróficos capazes de provocar problemas de sabor, odor e turvação na água. No biofilme podemos encontrar grupos como *Actinomyces*, *Streptomyces*, *Nocardia* e *Arthrobacter*.

As bactérias heterotróficas utilizam o carbono orgânico para sintetizar novo material celular e também como fonte de energia. Como estas bactérias requerem normalmente carbono, azoto e fósforo numa razão de aproximadamente 100:10:1 (C:N:P), o carbono orgânico acaba por ser, normalmente, o nutriente limitante. O carbono orgânico presente em sistemas de abastecimento de água deriva essencialmente de origens naturais, podendo ter origem em compostos derivados de vegetação.

Existem vários fatores que podem limitar o crescimento do biofilme, entre os quais a presença de matéria orgânica biodegradável é o fator essencial. O carbono orgânico assimilável (cuja noção é idêntica à do carbono orgânico dissolvido biodegradável, pois são frações do carbono orgânico dissolvido que podem ser facilmente assimiladas por microrganismos) é determinante no desenvolvimento do biofilme, existindo uma correlação razoável entre o AOC e os valores da contagem de bactérias heterotróficas totais em placa (HPC), segundo *Vieira (2002)*.

Evidencia-se a importância de biofilmes na água na medida em que constituem um fator crítico no que respeita à contaminação da água de torneira, para além de que proporcionam a formação de lúmens internos nos sistemas de tubagens devido à disponibilidade de nutrientes na água e a outros fatores relacionados, tais como, a sua química, circulação, estagnação, temperatura, e até mesmo a superfície dos materiais de construção.

A formação de biofilmes está dependente de inúmeros fatores. A qualidade e quantidade de nutrientes, iões e outras substâncias presentes no ambiente influenciam o comportamento das bactérias, podendo certamente exercer uma função regulatória no que respeita à formação destas estruturas. A presença de determinados iões como o cálcio, magnésio ou zinco que quando presentes proporcionam um aumento do biofilme.

A quantidade de biofilme formado, as taxas de crescimento e desagregação e a sua composição são dependentes de fatores hidrodinâmicos, dos quais se destacam a temperatura, cloro residual, material das condutas e ainda, um dos mais importantes, as condições nutricionais.

A presença de carbono orgânico assimilável (AOC) em níveis elevados e o tipo de material do sistema de tubagens interferem no potencial da água em distribuição.

A superfície da tubagem em que se encontra o biofilme também influencia a composição e atividade microbiana das populações existentes neste ecossistema.

Por um lado, os biofilmes atuam como filtros biológicos pela mineralização de material biológico biodegradável da água e formam biomassa imobilizada localmente. Por outro lado, podem imprevisivelmente emergir no sistema de distribuição e causar problemas em termos de contaminação bacteriana. Por isso, são considerados como um importante fator na estabilidade de águas para consumo humano. Estima-se que pelo menos 95% da biomassa bacteriana total em águas para consumo se encontre nas paredes do sistema de distribuição.

As bactérias em biofilmes têm sido descritas como mais resistentes a agressões externas como a presença de agentes desinfetantes.

1.2 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO

É conhecida a crescente incidência no estudo do planeamento do solo, direção dos recursos aquáticos e tratamento e desinfeção da água no controlo da transmissão de patogénicos, porém, análises à presença de parâmetros microbiológicos continuam a mostrar-se fundamentais na verificação e controlo da qualidade da água da rede de distribuição e na sua origem.

Do ponto de vista de segurança para a saúde pública, a água devia ser analisada para todos os potenciais microrganismos patogénicos presentes de modo a determinar a sua presença/ausência.

Contudo, os diferentes tipos de atividade microbiana, bem como os diferentes métodos requeridos para o isolamento destes microrganismos, inviabilizam a análise direta destes em amostras de água, com base em métodos clássicos de rotina. Por outro lado, podem não ser detetados devido aos níveis se encontrarem abaixo do limite de deteção ou até mesmo devido à falta de um método de deteção apropriado, podendo permanecer presentes numa densidade que represente um nível de risco inaceitável.

1.2.1 Bactérias heterotróficas

As bactérias presentes em águas destinadas ao consumo humano são principalmente heterotróficas, como já referido. Estas bactérias incluem as bactérias que usam carbono orgânico para se desenvolverem. A contagem de bactérias heterotróficas (HPC) é provavelmente o método de quantificação mais comum. As bactérias plaqueadas em meio sólido são incubadas para formarem colónias visíveis a olho nu. A contagem depende da capacidade das bactérias para se desenvolverem no meio sólido utilizado e da temperatura e tempo de incubação. Quanto mais semelhantes forem as condições de incubação do ambiente natural das bactérias, maiores as percentagens de número total de bactérias detetadas como colónias. O meio R₂A apresenta um vasto espectro de substratos em baixas concentrações, tendo sido desenvolvido especialmente para a quantificação de bactérias heterotróficas em águas de consumo humano.

1.2.2 Controlo microbiológico de águas de consumo humano

A remoção de matéria orgânica durante a produção de água destinada ao consumo humano traz diversos benefícios. Não só priva as bactérias heterotróficas dos nutrientes indispensáveis para a sua sobrevivência e multiplicação, como limita a sua colonização no sistema de distribuição da água de consumo. Por outro lado, a matéria orgânica interage com o cloro (desinfetante já referido), o que pode conduzir a formação de produtos secundários de desinfecção cancerígenos ou mutagénicos.

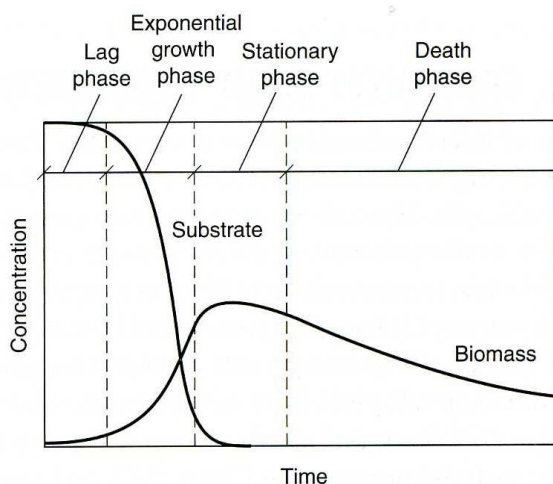
É necessário controlar (limitar) a atividade microbiana nos sistemas de distribuição para prevenir a deterioração da qualidade da água, que pode resultar em não conformidades com a regulamentação, em reclamações do consumidor, surtos de epidemias ou deteção de problemas de conceção do sistema, com subsequentes custos operacionais.

De modo a limitar a atividade microbiana podem-se adotar várias abordagens: distribuição da água de consumo biologicamente estável num sistema com materiais não reativos e biologicamente estáveis; manutenção de um teor de desinfetante residual em todo o sistema de distribuição; distribuição da água tratada com um baixo nível de desinfetante residual e um nível de estabilidade biológica relativamente elevado; e optimização do sistema de distribuição para prevenir a estagnação e a acumulação de sedimentos.

A atividade microbiana depende da disponibilidade de fontes de energia e de carbono para a formação e manutenção da biomassa. A maior fonte de energia na água tratada é o carbono orgânico, mas a amónia também pode estar presente em certos tipos de água.

A temperatura da água, a velocidade de fluxo (variações) e o tempo de residência também tem um impacto na actividade microbiana. A velocidade de fluxo (variações) afeta o fornecimento de substratos e desinfetante, o desprendimento de biofilmes e a acumulação de sedimentos. Os locais em que o tempo de residência da água é mais longo – por exemplo, partes esféricas do sistema de distribuição e reservatórios de serviço – são vulneráveis ao recrescimento devido a diminuição de desinfetante residual, ao transporte de sedimentos e ao aumento da temperatura da água no Verão.

Quando uma população de células microbianas é colocada em sistema fechado (sistema em que não há livre troca de nutrientes com o meio) num meio de cultura líquido, com composição química e condições físico-químicas favoráveis ao seu crescimento, nomeadamente, de arejamento, temperatura, pH; o crescimento da população pode ser traduzido graficamente pela designada “curva de crescimento”.



(adaptado de: *Wastewater Engineering – Treatment and reuse*, Metcalf & Eddy Inc., 4th ed.
por Tchobanoglous, G; Burton, F.L. e Stensel, H.D., McGraw-Hill, USA,2003.)

Figura 3. Curva de crescimento microbiano em sistema fechado. (*Lag phase*-Fase de adaptação; *Growth phase*- Fase exponencial; *Stationary phase*- Fase estacionária; *Death phase*- Fase de declínio).

Após um período de latência, de duração variável, em que as células se estão a adaptar ao meio, segue-se o início da multiplicação celular. A população entra na chamada fase de aceleração, onde a taxa específica de crescimento aumenta de zero até ao seu valor máximo, atingindo-se a fase exponencial do crescimento. A duração desta fase depende fundamentalmente da concentração inicial dos nutrientes limitantes para o crescimento. Quando um ou mais nutrientes se tornam limitantes e/ou ocorre a acumulação no meio de metabolitos inibidores do crescimento, segue-se a fase de desaceleração em que a taxa específica de crescimento diminui do seu valor máximo até zero. Atinge-se então a fase estacionária em que a taxa específica de crescimento é nula, correspondente ao esgotamento de um ou mais nutrientes (substrato) essenciais e, finalmente, a fase de declínio, devido a ocorrência de morte celular.

Um dos primeiros critérios de qualidade microbiológica da água foi definido como 100 cfu/mL em 1914 como padrão em águas de consumo nos Estados Unidos. No entanto, verificou-se que o

armazenamento das amostras de água tratada resultava num aumento da contagem de colónias em placa e descobriu-se que as bactérias que contribuem para os valores de contagem em placa de bactérias heterotróficas (HPC) eram capazes de crescer em águas tratadas com concentrações muito baixas de compostos orgânicos.

Apesar dos desenvolvimentos na avaliação da segurança higiénica da água tratada, o método de HPC permaneceu como um parâmetro da qualidade da água tratada e os seus critérios estão incluídos na legislação de muitos países relacionada com a qualidade da água destinada ao consumo humano. Os valores de HPC fornecem informação acerca do nível de actividade microbiana na água e portanto podem ser usados para controlar e otimizar os processos de tratamento, procedimentos e boas práticas de engenharia relacionadas com o tratamento e distribuição da água.

No entanto, estes valores de HPC não são adequados para a identificação de problemas na qualidade da água. O recrescimento bacteriano causa alguns problemas em águas de consumo: aumenta a turvação, odor, sabor e cor da água; causa proliferação indesejável de organismos visíveis a olho nu; diminui o significado da contagem de bactérias heterotróficas como indicador de contaminação externa; promove a depleção do cloro residual e promove a corrosão dos materiais das condutas e possibilita a multiplicação de microrganismos patogénicos.

Um dos métodos para controlar o recrescimento bacteriano é a limitação de nutrientes necessários à sobrevivência dos microrganismos. A quantidade de substrato consumida pelos microrganismos foi designado como carbono orgânico assimilável (AOC).

1.3 MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DO CARBONO ORGÂNICO ASSIMILÁVEL (AOC)

A matéria orgânica biodegradável (BOM) apresenta uma elevada diversidade na sua natureza química, grande parte não identificada, estando presente em águas naturais em concentrações muito baixas. As formas de matéria orgânica biodisponíveis são apenas uma pequena fracção da matéria orgânica total nos ecossistemas aquáticos. Existem duas abordagens principais e conceptualmente diferentes para a medição da BOM. Uma abordagem tem em conta o aumento da biomassa bacteriana (tradicionalmente as unidades formadoras de colónias, cfu) como consequência do crescimento dos microrganismos. Normalmente assume-se que a BOM é o nutriente limitante na resposta de crescimento das bactérias heterotróficas. No seu conjunto estes métodos são referidos como medições do carbono orgânico assimilável, ou AOC. A outra abordagem baseia-se na mineralização do carbono orgânico dissolvido (DOC) como resultado da actividade bacteriana, e fornece uma medição da fracção de carbono orgânico dissolvido biodegradável (BDOC) da amostra.

O AOC é uma fracção da concentração total de carbono orgânico (TOC) presente na água e tipicamente a fracção mais facilmente degradável, que inclui compostos de baixo peso molecular. O AOC normalmente contempla apenas uma pequena fracção (0,1-9%) do TOC que pode ser utilizada por estirpes específicas ou misturas definidas de bactérias, resultando num aumento da concentração que é quantificado. O AOC representa a fracção BDOC/BOM mais rapidamente degradável, que é convertida em biomassa. O inóculo para o ensaio de AOC pode ser composto por uma mistura de estirpes bacterianas puras cultivadas em condições laboratoriais (*Pseudomonas fluorescens P-17* e *Spirillum sp. NOX*) ou por uma mistura de bactérias ambientais caracterizadas por uma grande versatilidade nutricional.

Os ensaios de medição de AOC são morosos e requerem um grande nível de perícia. O crescimento bacteriano é monitorizado nas amostras de água por contagem de colónias e o crescimento médio observado durante a incubação é convertido em unidades de AOC como μg acetato-C/L, usando para tal o rendimento de crescimento das bactérias heterotróficas derivado das curvas de calibração obtidas usando concentrações padrão de compostos orgânicos (por exemplo, acetato ou oxalato).

Verifica-se uma significativa correlação entre a concentração de AOC e a densidade de bactérias heterotróficas na distribuição das águas. *Van der Kooij (1992)* mostrou que num sistema não clorado as bactérias heterotróficas não aumentavam quando o conteúdo em AOC era inferior a 10 µg/L, enquanto *LeChevallier et al. (1987)* sugeriram que o recrescimento de coliformes podia ser limitado por níveis de AOC inferiores a 50-100 µg/L em sistemas com 3-6 mg/L de cloro residual. *Kaplan et al. (1993)* consideram que uma água é estável quando apresenta valores de 10 a 50 µg de AOC/L. A concentração de AOC pode ser considerada como uma medida da estabilidade biológica da água para crescimento de microrganismos heterotróficos. No entanto, dado que o AOC é tipicamente quantificado por duas estirpes específicas de bactérias, *Pseudomonas fluorescens P-17* e *Spirillum sp. NOX*, este ensaio pode também ser visto como um indicador de um grupo específico de compostos orgânicos simples (por exemplo, ácidos carboxílicos e dicarboxílicos), coincidindo com as capacidades metabólicas destes organismos.

O AOC depende das unidades formadoras de colónias (contagem de células), que é um método sensível a pequenas variações nos níveis de BOM.

O AOC em amostras de água é determinado convencionalmente por medição do crescimento de *Pseudomonas fluorescens P-17* que utiliza uma variedade de compostos que incluem aminoácidos e carboidratos e não pode metabolizar ácidos carboxílicos e o ácido oxálico, um dos compostos frequentemente produzidos durante a ozonização. Por isso, a estirpe *Spirillum sp. NOX*, que se sabe crescer principalmente em ácidos carboxílicos e é capaz de utilizar oxalato, foi introduzida neste procedimento. Esta estirpe não assimila carboidratos, álcoois ou ácidos aromáticos e não utiliza aminoácidos quando cresce em misturas de compostos.

De facto, estudos mostram que a maioria do AOC determinado deve-se ao crescimento da estirpe NOX.

A análise de AOC convencional é efectuada através de um ensaio que foi originalmente desenvolvido por *Van der Kooij (1982)* e posteriormente adaptado por outros.

As amostras colhidas em frascos tratados são suplementadas com tiosulfato de sódio, para inactivar o cloro residual que possa estar presente e inibir o crescimento das bactérias, e

pasteurizadas para inactivar a microbiota. Após a pasteurização, as amostras de água são inoculadas (normalmente com 500 cfu/mL) com as estirpes teste *P-17* e *NOX* e incubadas a 15 °C durante 9 dias. O crescimento microbiano é quantificado nos 7º, 8º e 9º dias por plaqueamento em agar nutritivo. O resultado está portanto relacionado com o crescimento dos organismos teste em soluções puras de acetato (*P-17*) ou oxalato (*NOX*) por meio de valores de rendimento determinados empiricamente e o resultado final é dado como equivalentes de C-acetato. O número de organismos em fase estacionária é assumido ser o número de organismos máximo que pode ser suportado pelos nutrientes na amostra e o rendimento em acetato é assumido ser igual ao rendimento em AOC natural.

O pressuposto presente no ensaio do AOC é que os organismos do bioensaio representam as capacidades fisiológicas da microbiota do sistema de distribuição. Em algumas águas, os nutrientes inorgânicos regulam o crescimento bacteriano. Portanto, para garantir que o carbono é limitante do crescimento bacteriano, são adicionados nutrientes inorgânicos em excesso à amostra de água testada.

Elevadas concentrações de metais, especificamente alumínio e cobre, são tóxicas para a estirpe *P-17*, o que torna este procedimento inadequado para águas contaminadas com estes metais.

Águas não tratadas, especialmente as que apresentam elevadas concentrações de sólidos e turvação, podem conter elevada concentração de bactérias formadoras de esporos que podem sobreviver à pasteurização, crescer e interferir com a enumeração de *P-17* e *NOX* nas placas.

Estas águas normalmente têm um elevado teor de AOC. Por outro lado, águas que foram desinfectadas e que ainda apresentam um teor de desinfectante residual, inibem o crescimento dos organismos teste, pelo que o desinfectante deve ser neutralizado.

Águas superficiais tratadas com sulfato de cobre podem também ser inibitórias quando um agente quelante não é adicionado à amostra. Estas águas com elevado pH devem sofrer um ajuste de pH.

Para reduzir o tempo do ensaio de AOC para 5 dias, pode-se aumentar a densidade celular do inoculo ou aumentar a temperatura de incubação (20 °C).

Como já referido, são vários os estudos que relacionam o AOC directamente com o recrescimento microbiano e com a formação de biofilmes nos sistemas de distribuição da água de consumo. A tendência dos tratamentos da água de consumo é no sentido da combinação de tratamentos que removam completamente os nutrientes que suportam o crescimento microbiano, nomeadamente carbono, azoto e fósforo.

Os tratamentos a que a água é sujeita afectam a composição de compostos orgânicos presentes na água e, deste modo, a concentração de AOC presente nesta.

O método de contagem de colónias de bactérias heterotróficas em placas (HPC) é um procedimento para estimar o número de bactérias heterotróficas na água e para medir as alterações durante o tratamento e distribuição da água ou em piscinas.

As colónias podem aparecer nas placas como pares, cadeias, agregados ou células isoladas, todas incluídas no termo “unidades formadoras de colónias” (cfu). Este método está sujeito a numerosas fontes de possíveis erros (preparação das diluições, marcação de placas, contagem, entre outras) e requer, além de um longo tempo de ensaio, um trabalho intensivo de plaqueamento em meio de crescimento e contagem, fornecendo uma informação limitada pelo uso de duas estirpes seleccionadas para medir um conjunto complexo de compostos de carbono biodisponíveis.

A ligação das células a partículas em suspensão (elevada turvação) pode resultar numa subestimativa dos níveis bacterianos neste método.

O método convencional de contagem em placas com meio de cultura é um processo moroso e que requer um elevado nível de perícia para preparar amostras e ler resultados. Dado o tempo necessário para que o método esteja completo, pode ocorrer que os produtos testados já tenham chegado ao consumidor antes de se puderem tomar acções correctivas caso seja necessário.

Em águas de consumo tratadas, as bactérias são expostas a desinfectantes tornando-as debilitadas. Também se podem encontrar bactérias debilitadas em águas salinas, águas naturais poluídas, e em superfícies relativamente limpas. Um elevado número de bactérias debilitadas pode estar associado a uma desinfecção parcial ou inadequada ou a presença de iões metálicos ou outras substâncias tóxicas. Outros factores que podem causar stress ou danos nas bactérias

incluem temperaturas, pH extremos e radiação solar. Estas bactérias continuam viáveis mas não são capazes de formar colónias nas placas de agar, conduzindo a subestimativas significativas do número de bactérias viáveis.

Outra questão a ter em atenção é a utilização de culturas puras no método convencional de AOC. De facto, embora a estirpe *P-17* fosse inicialmente reconhecida e usada como uma estirpe típica heterotrófica representativa das bactérias da água de consumo, posteriormente foi adicionada a estirpe *Spirillum sp. NOX* para o método de determinação de AOC quando se descobriu que a estirpe *P-17* não detectava adequadamente produtos de ozonização. Também se sugeriu adicionar *Flavobacterium sp. estirpe 12* para águas específicas (tendo como alvo açúcares em particular). Contudo, dado que o AOC cobre uma vasta gama de substratos assimiláveis, desde ácidos orgânicos, açúcares, álcoois e aminoácidos de vários tamanhos moleculares, uma cultura pura provavelmente nunca será suficiente para detectar todos estes compostos. O uso de combinações destas culturas puras como um inóculo misto tem sido estudado mas apresenta problemas experimentais em termos de quantificação e interpretação de resultados.

1.4 EMPRESA ÁGUAS DO ALGARVE, S.A

Os Sistemas Multimunicipais de Abastecimento de Água e de Saneamento do Algarve são dos investimentos mais importantes dos últimos trinta anos no Algarve, do ponto de vista do desenvolvimento sustentável, económico, ambiental, de diversidade e complexidade técnica, bem como da dimensão e extensão do investimento.

Até ao início do funcionamento do Sistema Multimunicipal de Abastecimento de Água do Algarve, a Região algarvia debatia-se com problemas quantitativos e qualitativos da água para abastecimento público sendo as respetivas origens quase exclusivamente subterrâneas. A qualidade de vida das populações e as atividades económicas, com destaque para o turismo, encontravam-se fortemente limitadas.

A Águas do Algarve SA resulta da fusão de duas Empresas, a Águas do Barlavento Algarvio SA e a Águas do Sotavento Algarvio SA.

A Águas do Algarve, S.A., é criada em Agosto de 2000 em resultado da fusão destas duas Empresas, sendo concessionária, por um período de 30 anos dos Sistemas Multimunicipais de Abastecimento de Água e de Saneamento do Algarve, abrangendo todos os 16 concelhos da região, servindo cerca de 450 mil habitantes em época baixa e perto de um milhão e meio em época alta, nas áreas de tratamento e distribuição de água, bem como no tratamento dos efluentes domésticos. A empresa tem por objetivo principal o fornecimento de água potável em quantidade e qualidade durante todo o ano, bem como munir a nossa Região com um sistema seguro, do ponto de vista da saúde pública dos cidadãos, melhorando os níveis de atendimento e promovendo a qualidade ambiental, designadamente a qualidade da água das praias e rios do Algarve, que são fator essencial para o bem-estar da população e para o desenvolvimento económico e turístico da Região.



Figura 4. Mapa do sistema multimunicipal de abastecimento de água do Algarve.

(fonte: <http://www.aquasdoalgarve.pt>)

2. Objetivo

Partindo de uma técnica de determinação de AOC previamente conhecida, o objetivo primordial deste trabalho foi, melhorar, otimizar e adaptar a técnica aos meios existentes.

Presumiu-se também, simplificar e rentabilizar o método utilizado, de forma a torná-lo de maior viabilidade ao nível da sua aplicação no quotidiano.

Após o período de adaptação às alterações testadas na referida técnica, esta foi aplicada à determinação de AOC em estudos sobre o potencial de amostras de água da AdA para sustentarem o crescimento microbiano.

Estes estudos visaram tornar o método de determinação de AOC mais simples, rápido e mais rentável a nível de tempo despendido e material utilizado.

3. Materiais e Métodos

3.1 TÉCNICA PARA A DETERMINAÇÃO DE CARBONO ORGÂNICO ASSIMILÁVEL EM AMOSTRAS DE ÁGUA

Todo o procedimento técnico que se segue teve como base o método convencional descrito em “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (SMEWW)” (2005), contudo adaptado às condições do presente trabalho.

3.1.1 Princípio da Técnica

O bioensaio para determinação de carbono orgânico assimilável (AOC), usando as estirpes *Pseudomonas fluorescens P-17* e *Spirillum sp. NOX* baseou-se na quantificação da concentração celular máxima obtida numa cultura, sendo a própria amostra o meio de cultura.

A pasteurização das amostras inativa a microbiota presente na água a ser analisada. Os referidos microrganismos usados neste método, foram enumerados pelo método de contagem em placa (inoculação por espalhamento) e a densidade de células viáveis é convertida em concentração de AOC através de um fator de conversão empírico, usando como padrões o crescimento de *Pseudomonas fluorescens P-17* em acetato e *Spirillum sp. NOX* em oxalato ou acetato. Estes valores empíricos, determinados por van der Kooij (1982, 1984) são, respetivamente, $4,1 \times 10^6$ cfu P-17/ μg C-acetato e $2,91 \times 10^6$ cfu NOX/ μg C-oxalato a 15°C para as estirpes P-17 e NOX, respetivamente. Assume-se que o número de microrganismos em fase estacionária corresponde ao número máximo de células que pode ser suportado pelo carbono presente na amostra e que o crescimento das estirpes em acetato e em oxalato é correlacionável com o AOC presente nas amostras.

3.1.2 Interferências

As amostras de água superficiais não tratadas, com elevada concentração de sólidos suspensos ou muito turvas, podem conter um número considerável de bactérias esporuladas que poderão resistir ao processo de pasteurização e, conseqüentemente interferir com as contagens em placa das estirpes P-17 e NOX. Nesses casos, pode diluir-se a amostra com água isenta de carbono e suplementada com minerais ou proceder à sua filtração recorrendo a filtros isentos de carbono. As amostras de água potável contendo desinfetante residual, deverão ser tratadas de modo a neutralizar o desinfetante com tiosulfato de sódio.

As amostras de água tratada com sulfato de cobre, poderão inibir o crescimento microbiano. Nestes casos, deve-se tratar a amostra com um agente quelante.

3.1.3 Limite de deteção

Este método permite detetar concentrações inferiores a $1\mu\text{g C/L}$. Na prática, e devido à contaminação de carbono orgânico associada à manipulação do material de vidro e das amostras, esse limite é de $5\text{-}10\mu\text{g C/L}$.

3.1.4 Equipamento e Material

O material necessário para o ensaio compreende a seguinte listagem:

- Frascos Schott de 1L com tampa azul, Duran[®];
- Frascos Schott de 50 mL, Duran[®];
- Tampas de rosca vermelhas de Politereftalato de etileno (PTB), Duran[®];
- Provetas de 50 mL e 500 mL;
- Estufas a 15°C e 60°C ;
- Banho termoestatizado a 70°C ;
- Micropipetas de volume ajustável ($10\text{-}100\mu\text{L}$ e $100\text{-}1000\mu\text{L}$) e pontas adequadas;
- Tubos Eppendorfs de 1,5 mL para preparação das diluições das culturas;
- Tubos de ensaio de 5 mL;
- Caixas de Petri;
- Espalhadores esterilizados descartáveis;
- Parafilme;
- Papel de alumínio;
- Câmara de segurança biológica;
- Mufla a 550°C .

3.1.5 Reagentes

- **Solução stock de acetato de sódio** (400 mg C-acetato/L)

Dissolver 2,267 g de acetato de sódio tri-hidratado ($\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$) em 1 L de água desionizada isenta de carbono (água mili-Q). Para o volume necessário de 50 mL, dissolver 0,113 g de $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Fechar hermeticamente o frasco, autoclavar e armazenar a 5°C , até seis meses.

- **Solução stock de tiosulfato de sódio**

Dissolver 30 g de tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) em 1L de água desionizada. Para um volume suficiente de 50 mL, dissolver 1,5 g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ e proceder conforme na preparação do reagente anterior.

- **Solução de Ringer 1:4**

Preparar a solução de acordo com as indicações do rótulo da embalagem- uma pastilha para 500 mL de água destilada. Distribuir a solução por tubos de ensaio de 5 mL, uma vez que esta solução é utilizada para efetuar as diluições. Esterilizar e guardar a solução na estufa a 5°C.

- **Solução de persulfato de sódio 10% (p/v)**

Dissolver 100 g de persulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$) em 1 L de água desionizada,

- **Solução de sais minerais**

Dissolver 171 mg de hidrogenofosfato de di-potássio (K_2HPO_4), 767 mg de cloreto de amónia (NH_4Cl) e 1,444 g de nitrato de potássio (KNO_3) em 1L de água mili-Q. Para um volume de 50mL, serão necessários dissolver 8,55 mg de K_2HPO_4 , 38,35 mg de NH_4Cl e 0,0722g de KNO_3 .

- **Meio R_2 Agar (Oxoid)**

Preparar o meio de acordo com as instruções descritas na embalagem- dissolver 18,12 g de meio em 1 L de água destilada. Autoclavar e plaquear antes que o meio solidifique.

- **Solução de ácido clorídrico 1N**

Pipetar 4,18 mL de HCl (37%). Numa proveta de 500 mL colocar uma certa quantidade de água destilada, juntar o volume de pipetado referido e perfazer o volume de 500mL com água destilada.

- **Culturas de microrganismos**

Foram usadas culturas puras de *Pseudomonas fluorescens* P-17 e *Spirillum* sp. NOX.

3.1.6 Amostras

Analisaram-se as amostras de água provenientes dos pontos de entrega da rede de abastecimento de água do Algarve, da zona do Barlavento: Bensafrim (Lagos), Colinas Verdes

(Lagos), Bemparece (Albufeira) e Pinhal de Albufeira (Albufeira); e da zona do Sotavento: Brancanes (Olhão), Fonte de Pipa (Loulé), Pé de Outeiro (Faro), Universidade do Algarve (Faro).

Tabela I. Amostras de água testadas: locais e datas de recolha em diferentes pontos do Algarve.

Local de Recolha	Data de Recolha	Sub-região Algarve
Pinhal de Albufeira	22/03/2011	Barlavento
Bemparece		
Bensafrim	30/03/2011	
Colinas Verdes		
Brancanes	11/04/2011	Sotavento
Pé de Outeiro		
Fonte de Pipa		
Universidade do Algarve		

3.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.2.1 *Preparação dos frascos schott para incubação*

Retirar as tampas dos frascos, lavá-los com detergente e enxaguar com água quente. Passar duas vezes por HCl 0,1 N e três vezes por água mili-Q. Secar os frascos à temperatura ambiente, tapar com papel de alumínio e colocar na muffla a 550°C durante 6 horas. Proceder da mesma forma para a preparação do restante material de vidro.

No que respeita à preparação das tampas, imergir as mesmas em persulfato de sódio 10% (p/v) a 60°C durante 1 hora. Após o devido arrefecimento das tampas, enxaguar três vezes com água mili-Q.

3.2.2 *Preparação dos inóculos (stock)*

Preparar suspensões individuais de cada uma das culturas P-17 e NOX. Para tal, adicionar 2-3 mL de água filtrada em membrana 0,2 µm às placas de culturas puras em meio R₂A. A água filtrada deve ser previamente autoclavada, contendo 50 µL de tiosulfato de sódio por cada 50 mL de amostra, a fim de se neutralizar o cloro residual. Usar um espalhador para libertar as colónias das placas para a solução adicionada previamente. Transferir 100 µL da suspensão para frascos com 50 mL de água destilada e adicionar 125 µL de acetato de sódio. Incubar os frascos inóculados durante cinco dias a 22°C. A limitação em carbono orgânico assegura a utilização total do acetato, evitando a transferência de carbono pelo inóculo. A fase estacionária é atingida quando o número de células viáveis atinge um valor máximo. Para avaliar se o inóculo se encontra em fase estacionária de crescimento, determinar o número de unidades formadoras de colónias pelo método de contagem em placa em três dias consecutivos (7^º, 8^º e 9^º dias de incubação). Para tal, preparar uma série de diluições decimais em solução de Ringer 1:4 (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) para ambos os inóculos. Considera-se que a cultura está em fase estacionária se não ocorrerem variações significativas no número de colónias durante os 3 dias. As culturas stock podem ser guardadas durante um período máximo de 6 meses, a 5°C. Antes de usar o inóculo num ensaio, proceder à determinação do número de células viáveis na cultura por contagem do número de colónias (cfu/mL de inóculo stock), para definir o volume apropriado de inóculo stock a utilizar no ensaio.

3.2.3 Preparação das amostras e controlo

Recolher as amostras para frascos Schott de 1 L devidamente tratados. Adicionar 1 mL de solução de tiosulfato de sódio, a fim de neutralizar qualquer desinfetante residual. Distribuir 50 mL de cada amostra por 9 frascos Schott que são usados como amostra (triplicados para os 7º, 8º e 9º dias). Transferir 50 mL de água mili-Q para um frasco Schott para ser usado como ensaio em branco, e suplementar o frasco de acordo com a seguinte tabela:

Tabela II. Suplementos adicionados ao branco

Suplemento	Branco
125µL de solução mineral 1:10	+
50µL de solução de tiosulfato de sódio	+
125µL de solução de acetato de sódio 1:10	-

Identificar todos os frascos nas respetivas tampas, usando lápis de carvão, fechá-los hermeticamente e pasteurizar num banho de água a 70°C durante 1 hora.

3.2.4 Inoculação e incubação

Após o arrefecimento dos frascos, inocular com 500 cfu/mL das estirpes P-17 e/ou NOX. Os volumes de inóculo correspondentes à concentração para cada estirpe são determinados de modo a ter uma contagem em placa dentro dos limites considerados aceitáveis (30-300 colónias), de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Volume de inóculo} = \frac{500 \text{ cfu/mL} \times 50 \text{ mL/frasco}}{\text{cfu/mL inóculo stock}}$$

Manter os frascos no escuro (forrados com papel de alumínio) durante uma semana na estufa a 15°C.

3.2.5 Contagem de colónias

Retirar 3 frascos de amostras da estufa para a determinação do AOC ao fim de 7, 8 e 9 dias, para proceder à contagem das colónias e avaliar se a densidade celular máxima foi atingida. Para tal, agitar vigorosamente os frascos, e como o auxílio da pipeta estéril preparar uma série de diluições decimais em solução de Ringer 1:4. Proceder ao método de contagem em placa. Pipetar 10 μL de cada diluição (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) em duplicado para cada setor da placa. No 9º dia, retirar da estufa os frascos correspondentes aos controlos e efetuar o mesmo procedimento descrito para as amostras. Incubar todas as placas a 25°C durante 3 a 5 dias e registar o número de colónias de cada estirpe. As colónias de P-17 aparecem primeiro, apresentando tons amarelo claro e diâmetro de 3-4 mm. As colónias NOX apresentam-se mais pequenas e de tonalidade branca, com 1-2 mm de diâmetro. Poderão ser necessárias diferentes diluições para contar as colónias das duas estirpes.

Caso não se verifiquem variações significativas nos valores da contagem de colónias nos 7º, 8º e 9º dias de incubação, poder-se-á considerar que a cultura se encontra em fase estacionária.

3.2.6 Determinação do rendimento de P-17 e NOX

O rendimento do crescimento das estirpes P-17 e NOX em compostos de carbono modelo, deve ser constante para as condições de carbono orgânico limitante e temperatura e incubação constante.

É conveniente usar valores empíricos $4,1 \times 10^6$ cfu P-17 / μg C-acetato e $2,91 \times 10^6$ cfu NOX / μg C-oxalato, para temperatura de 15°C .

3.2.7 Tratamento de resultados

O número de unidades formadoras de colónias é determinado a partir da equação que se segue, tendo em conta a soma de todas as colónias contadas nas placas de Petri para as várias diluições (N), o número de placas por diluição (n_i), as diluições (F_i), os volumes das tomas para ensaio das diluições (V_i) e o volume de referência escolhido para exprimir a concentração de microrganismos na amostra (V_s).

$$cfu_s = \frac{N}{(n_1 V_1 F_1) + (n_2 V_2 F_2) + \dots + (n_i V_i F_i)}$$

Determina-se a média dos resultados obtidos nos 3 dias de contagem de células viáveis e cultiváveis e calcula-se a concentração de carbono orgânico assimilável (AOC), através da seguinte equação, caso se utilizem os fatores de rendimento estabelecidos por *van der Kooij (1982, 1984)* no método original.

$$\mu g AOC/L = \left[\left(\frac{\text{média } cfu_{P-17}}{mL} \times \frac{\mu g C - \text{acetato}}{4,1 \times 10^6} \right) + \left(\frac{\text{média } cfu_{NOX}}{mL} \times \frac{1 \mu g C - \text{oxalato}}{2,91 \times 10^6} \right) \right] \times 1000 mL/L$$

Em termos práticos, a densidade celular varia ao longo da fase estacionária. A utilização do valor médio das contagens realizadas no período de três dias garante uma melhor estimativa da densidade máxima real. Desta forma, assume-se que o crescimento celular, tendo como fontes de carbono, o acetato e o oxalato, é equivalente ao crescimento em AOC existente na amostra.

Para se comparar os resultados, é necessário considerar a temperatura de incubação, a contribuição de cada uma das estirpes na determinação do AOC, bem como os fatores de rendimento usados.

3.3 ALTERAÇÕES TESTADAS NA TÉCNICA PARA A DETERMINAÇÃO DE AOC EM AMOSTRAS DE ÁGUA

Na técnica original anteriormente descrita, foram preparados frascos de amostras para os três dias (7º, 8º e 9º) em triplicado (7A, 7B, 7C; 8A, 8B, 8C e 9A, 9B, 9C). Realizou-se a técnica para a determinação de AOC numa amostra primeiramente com a estirpe de P-17. Em seguida, pasteuriza-se esta mesma amostra e volta-se a repetir o procedimento com a estirpe NOX. Designa-se assim este procedimento como um ensaio seguido com 9 frascos.

Contudo, para além do referido ensaio seguido, é possível optar por um ensaio em paralelo, onde são utilizadas as diferentes estirpes de P-17 e NOX na mesma amostra, contudo em ensaios “paralelos”. Desta forma, economiza-se no tempo de duração do ensaio.

Noutra perspetiva, também foi testada a utilização de apenas um frasco, em triplicado (A, B, C), que era usado repetidamente nos dias 7, 8 e 9; ao invés dos três frascos por dia conforme o procedimento original. Denomina-se assim este procedimento como um ensaio com 3 frascos. O objetivo desta alteração destina-se a reduzir o dispêndio e quantidade de material utilizado.

Como tal, pretende-se assim, verificar, se ao reduzir o número de frascos de amostra, e proceder a um ensaio em paralelo, os resultados são coerentes e concordantes com o método original de determinação de AOC em amostras de água.

No que respeita a diluições preparadas para a contagem de cfu em cada ensaio, alteraram-se também as estipuladas, pelo que se realizaram novas diluições de 1:100, 1:250, 1:500 e 1:1000, com o intuito de se obterem melhores resultados.

O método de contagem de colónias em placa foi substituído pelo método de Miles & Misra (inoculação com gotas). Neste método, começa-se por dividir a placa de Petri (previamente plaqueada com meio R₂A) em 6 partes. Pipeta-se 10 µL de cada diluição (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) em duplicado para cada setor da placa. É de notar que esta alteração no método de contagem original diminui o dispêndio de material, de trabalho experimental e tem a vantagem de realização da leitura em tempo menor em relação ao método de contagem em placas.

4. Resultados e Discussão

Os primeiros ensaios e respetivos resultados a serem discutidos são os que, comparam as diferentes variações da técnica de determinação de AOC numa mesma amostra, com o objetivo de testar as tentativas de otimização ensaiadas. Como tal, foi testada uma amostra de água da corrente que abastece o laboratório da Universidade do Algarve (Faro, Sotavento), cujos resultados se encontram tabelados em seguida.

Tabela II. Resultados obtidos no ensaio seguido com 9 frascos - Amostra Ualg (Faro, Sotavento) - Média de contagem de colónias P-17 e NOX.

Caixa	F.Diluição	Contagem		Média	Total (cfu/mL)
7A	100	26	27	26,5	2,65E+05
	250	9	21	15	---
	500	8	11	9,5	4,75E+05
	1000	4	4	4	---
7B	100	28	30	29	2,90E+05
	250	16	17	16,5	4,13E+05
	500	11	7	9	4,50E+05
	1000	7	3	5	---
7C	100	30	31	30,5	3,05E+05
	250	13	17	15	3,75E+05
	500	13	12	12,5	6,25E+05
	1000	7	2	4,5	---
8A	100	43	34	38,5	3,85E+05
	250	28	19	23,5	5,88E+05
	500	19	13	16	8,00E+05
	1000	5	3	4	---
8B	100	36	38	37	3,70E+05
	250	22	23	22,5	5,63E+05
	500	16	13	14,5	7,25E+05
	1000	3	7	5	---
8C	100	32	24	28	---
	250	14	17	15,5	3,88E+05
	500	12	11	11,5	5,75E+05
	1000	6	3	4,5	---
9A	100	31	30	30,5	3,05E+05
	250	20	14	17	4,25E+05
	500	10	7	8,5	4,25E+05
	1000	4	6	5	---
9B	100	36	31	33,5	3,35E+05
	250	23	7	15	---
	500	9	7	8	4,00E+05
	1000	1	3	2	---
9C	100	13	18	15,5	1,55E+05
	250	7	8	7,5	1,88E+05
	500	5	8	6,5	3,25E+05
	1000	1	2	1,5	---
				Média P-17	4,23E+05 cfu/mL

Caixa	Diluição	Contagem		Média	Total (cfu/mL)
7A	100	32	36	34	3,40E+05
	250	15	15	15	3,75E+05
	500	8	2	5	---
	1000	3	3	3	---
7B	100	30	35	32,5	3,25E+05
	250	8	11	9,5	2,38E+05
	500	6	9	7,5	---
	1000	4	5	4,5	4,50E+05
7C	100	27	30	28,5	2,85E+05
	250	12	23	17,5	---
	500	6	5	5,5	2,75E+05
	1000	4	5	4,5	4,50E+05
8A	100	29	29	29	2,90E+05
	250	8	14	11	---
	500	10	5	7,5	---
	1000	3	2	2,5	---
8B	100	38	29	33,5	3,35E+05
	250	16	14	15	3,75E+05
	500	9	5	7	---
	1000	3	4	3,5	---
8C	100	33	29	31	3,10E+05
	250	14	11	12,5	3,13E+05
	500	8	4	6	---
	1000	3	2	2,5	---
9A	100	37	30	33,5	3,35E+05
	250	15	9	12	---
	500	5	6	5,5	2,75E+05
	1000	5	2	3,5	---
9B	100	37	27	32	3,20E+05
	250	22	16	19	4,75E+05
	500	9	8	8,5	4,25E+05
	1000	4	4	4	4,00E+05
9C	100	30	41	35,5	---
	250	14	15	14,5	3,63E+05
	500	7	6	6,5	3,25E+05
	1000	4	5	4,5	4,50E+05
				Média NOX	3,51E+05 cfu/mL

Tabela III. Resultados obtidos no ensaio em paralelo com 9 frascos - Amostra Ualg (Faro, Sotavento) - Média de contagem de colónias P-17 e NOX.

Caixa	F.Diluição	Contagem		Média	Total (cfu/mL)
7A	100	26	27	26,5	2,65E+05
	250	9	21	15	---
	500	8	11	9,5	4,75E+05
	1000	4	4	4	---
7B	100	28	30	29	2,90E+05
	250	16	17	16,5	4,13E+05
	500	11	7	9	4,50E+05
	1000	7	3	5	---
7C	100	30	31	30,5	3,05E+05
	250	13	17	15	3,75E+05
	500	13	12	12,5	6,25E+05
	1000	7	2	4,5	---
8A	100	43	34	38,5	3,85E+05
	250	28	19	23,5	5,88E+05
	500	19	13	16	8,00E+05
	1000	5	3	4	---
8B	100	36	38	37	3,70E+05
	250	22	23	22,5	5,63E+05
	500	16	13	14,5	7,25E+05
	1000	3	7	5	---
8C	100	32	24	28	---
	250	14	17	15,5	3,88E+05
	500	12	11	11,5	5,75E+05
	1000	6	3	4,5	---
9A	100	31	30	30,5	3,05E+05
	250	20	14	17	4,25E+05
	500	10	7	8,5	4,25E+05
	1000	4	6	5	---
9B	100	36	31	33,5	3,35E+05
	250	23	7	15	---
	500	9	7	8	4,00E+05
	1000	1	3	2	---
9C	100	13	18	15,5	1,55E+05
	250	7	8	7,5	1,88E+05
	500	5	8	6,5	3,25E+05
	1000	1	2	1,5	---
Média P-17					4,23E+05 cfu/mL

Caixa	F.Diluição	Contagem		Média	Total (cfu/mL)
7A	100	32	33	32,5	3,25E+05
	250	7	17	12	---
	500	4	12	8	---
	1000	4	5	4,5	4,50E+05
7B	100	32	27	29,5	2,95E+05
	250	14	18	16	4,00E+05
	500	17	10	13,5	---
	1000	2	3	2,5	---
7C	100	30	37	33,5	3,35E+05
	250	12	8	10	2,50E+05
	500	12	14	13	6,50E+05
	1000	5	5	5	5,00E+05
8A	100	30	42	36	3,60E+05
	250	17	11	14	---
	500	6	5	5,5	2,75E+05
	1000	2	8	5	---
8B	100	51	34	42,5	---
	250	20	22	21	5,25E+05
	500	5	9	7	3,50E+05
	1000	1	7	4	---
8C	100	37	38	37,5	3,75E+05
	250	12	10	11	2,75E+05
	500	14	12	13	6,50E+05
	1000	4	4	4	4,00E+05
9A	100	36	40	38	3,80E+05
	250	21	21	21	5,25E+05
	500	12	6	9	---
	1000	1	6	3,5	---
9B	100	45	39	42	4,20E+05
	250	13	13	13	3,25E+05
	500	16	9	12,5	---
	1000	3	5	4	---
9C	100	45	53	49	4,90E+05
	250	20	21	20,5	5,13E+05
	500	8	7	7,5	3,75E+05
	1000	6	4	5	---
Média NOX					4,11E+05 cfu/mL

Tabela IV. Resultados obtidos no ensaio seguido com 3 frascos - Amostra Ualg (Faro, Sotavento) - Média de contagem de colónias P-17 e NOX.

Caixa	Diluição	Contagem	Média	Total		
7º Dia	A	100	27	21	24	2,40E+05
		250	8	12	10	2,50E+05
		500	8	7	7,5	3,75E+05
		1000	3	2	2,5	---
	B	100	37	34	35,5	3,55E+05
		250	26	18	22	---
		500	13	12	12,5	6,25E+05
		1000	5	5	5	5,00E+05
	C	100	35	36	35,5	3,55E+05
		250	16	23	19,5	4,88E+05
		500	10	6	8	4,00E+05
		1000	11	6	8,5	---
8º Dia	A	100	22	24	23	2,30E+05
		250	14	21	17,5	---
		500	8	3	5,5	---
		1000	4	5	4,5	4,50E+05
	B	100	33	31	32	3,20E+05
		250	20	17	18,5	4,63E+05
		500	9	13	11	5,50E+05
		1000	5	7	6	6,00E+05
	C	100	26	34	30	3,00E+05
		250	18	15	16,5	4,13E+05
		500	7	10	8,5	4,25E+05
		1000	9	6	7,5	7,50E+05
9º Dia	A	100	26	22	24	2,40E+05
		250	17	11	14	---
		500	10	7	8,5	4,25E+05
		1000	7	7	7	7,00E+05
	B	100	12	11	11,5	1,15E+05
		250	16	11	13,5	3,38E+05
		500	5	4	4,5	2,25E+05
		1000	6	3	4,5	---
	C	100	28	28	28	2,80E+05
		250	20	18	19	4,75E+05
		500	11	9	10	5,00E+05
		1000	4	3	3,5	3,50E+05
-	-	Média P-17			4,05E+05 cfu/mL	

Caixa	Diluição	Contagem	Média	Total		
7º Dia	A	100	28	34	31	3,10E+05
		250	17	5	11	---
		500	7	8	7,5	3,75E+05
		1000	7	2	4,5	---
	B	100	24	31	27,5	2,75E+05
		250	22	17	19,5	4,88E+05
		500	11	5	8	---
		1000	5	4	4,5	4,50E+05
	C	100	27	31	29	2,90E+05
		250	16	16	16	4,00E+05
		500	5	4	4,5	2,25E+05
		1000	2	2	2	---
8º Dia	A	100	34	23	28,5	2,85E+05
		250	19	16	17,5	4,38E+05
		500	6	10	8	4,00E+05
		1000	4	7	5,5	---
	B	100	19	24	21,5	2,15E+05
		250	10	15	12,5	---
		500	4	6	5	2,50E+05
		1000	5	1	3	---
	C	100	34	40	37	3,70E+05
		250	8	13	10,5	---
		500	6	8	7	3,50E+05
		1000	2	4	3	---
9º Dia	A	100	43	38	40,5	4,05E+05
		250	17	15	16	4,00E+05
		500	6	13	9,5	---
		1000	5	8	6,5	6,50E+05
	B	100	36	30	33	3,30E+05
		250	11	13	12	3,00E+05
		500	7	5	6	3,00E+05
		1000	7	3	5	---
	C	100	29	24	26,5	2,65E+05
		250	15	13	14	3,50E+05
		500	6	3	4,5	---
		1000	2	0	1	---
-	-	Média NOX			3,53E+05 cfu/mL	

Tabela V. Resultados obtidos no ensaio em paralelo com 3 frascos - Amostra Ualg (Faro, Sotavento) - Média de contagem de colónias P-17 e NOX

Caixa	Diluição	Contagem	Média	Total
7º Dia	A	100	27 21 24	2,40E+05
		250	8 12 10	2,50E+05
		500	8 7 7,5	3,75E+05
		1000	3 2 2,5	---
	B	100	37 34 35,5	3,55E+05
		250	26 18 22	---
		500	13 12 12,5	6,25E+05
		1000	5 5 5	5,00E+05
	C	100	35 36 35,5	3,55E+05
		250	16 23 19,5	4,88E+05
		500	10 6 8	4,00E+05
		1000	11 6 8,5	---
8º Dia	A	100	22 24 23	2,30E+05
		250	14 21 17,5	---
		500	8 3 5,5	---
		1000	4 5 4,5	4,50E+05
	B	100	33 31 32	3,20E+05
		250	20 17 18,5	4,63E+05
		500	9 13 11	5,50E+05
		1000	5 7 6	6,00E+05
	C	100	26 34 30	3,00E+05
		250	18 15 16,5	4,13E+05
		500	7 10 8,5	4,25E+05
		1000	9 6 7,5	7,50E+05
9º Dia	A	100	26 22 24	2,40E+05
		250	17 11 14	---
		500	10 7 8,5	4,25E+05
		1000	7 7 7	7,00E+05
	B	100	12 11 11,5	1,15E+05
		250	16 11 13,5	3,38E+05
		500	5 4 4,5	2,25E+05
		1000	6 3 4,5	---
	C	100	28 28 28	2,80E+05
		250	20 18 19	4,75E+05
		500	11 9 10	5,00E+05
		1000	4 3 3,5	3,50E+05
		Média P-17	4,05E+05	
			cfu/mL	

Caixa	Diluição	Contagem	Média	Total
7º Dia	A	100	37 39 38	3,80E+05
		250	22 13 17,5	---
		500	8 8 8	4,00E+05
		1000	2 3 2,5	---
	B	100	32 43 37,5	3,75E+05
		250	13 18 15,5	3,88E+05
		500	13 6 9,5	---
		1000	4 3 3,5	3,50E+05
	C	100	38 34 36	3,60E+05
		250	17 9 13	---
		500	10 7 8,5	4,25E+05
		1000	8 2 5	---
8º Dia	A	100	46 28 37	---
		250	25 20 22,5	5,63E+05
		500	12 11 11,5	5,75E+05
		1000	2 2 2	---
	B	100	41 41 41	4,10E+05
		250	19 22 20,5	5,13E+05
		500	10 13 11,5	5,75E+05
		1000	1 2 1,5	---
	C	100	41 35 38	3,80E+05
		250	14 15 14,5	3,63E+05
		500	6 8 7	3,50E+05
		1000	7 2 4,5	---
9º Dia	A	100	43 30 36,5	3,65E+05
		250	13 16 14,5	3,63E+05
		500	13 3 8	---
		1000	5 9 7	---
	B	100	44 27 35,5	---
		250	22 13 17,5	---
		500	9 3 6	---
		1000	4 2 3	---
	C	100	33 31 32	3,20E+05
		250	13 22 17,5	---
		500	9 6 7,5	3,75E+05
		1000	5 2 3,5	---
		Média NOX	4,12E+05	
			cfu/mL	

Os campos das tabelas que se encontram preenchidos a tracejado (---), representam as contagens desprezadas, pelo que não foram contabilizadas para o cálculo da média de cfu/mL da respetiva bactéria. O critério utilizado para excluir tais resultados, constou em eliminar as contagens que não se apresentaram coerentes quer entre si, quer entre diferentes diluições. Razões que expliquem a falta de coerência de resultados encontram-se mencionadas mais à frente.

Compilaram-se os ensaios anteriormente representados, na seguinte tabela para facilitar e organizar a discussão dos mesmos.

Tabela VI. Variações da técnica de AOC – Amostra Ualg (Faro, Sotavento)

Tipo de Ensaio	Média P-17 (cfu/mL)	AOC P-17 (µg /L)	Média NOX (cfu/mL)	AOC NOX (µg /L)	AOC (µg /L)
<i>Ensaio seguido 9 frascos</i>	4,23E+05	103	3,51E+05	121	224
<i>Ensaio em paralelo 9 frascos</i>	4,23E+05	103	4,11E+05	141	244
<i>Ensaio seguido 3 frascos</i>	4,05E+05	99	3,53E+05	121	220
<i>Ensaio em paralelo 3 frascos</i>	4,05E+05	99	4,12E+05	142	240

É de notar a conformidade dos resultados, quando comparados os diferentes tipos de ensaio. Verifica-se assim que ao reduzir-se o número de frascos, os resultados se mantêm congruentes, bem como, quando se realizam ensaios em paralelo em substituição dos ensaios seguidos.

Uma desvantagem observada nos ensaios seguidos trata-se do volume de amostra nos frascos já não se tratar do mesmo (50 mL), aquando se realiza uma nova inoculação com a segunda estirpe (NOX).

Por outro lado, também é de discutir, que os valores de concentração de AOC nos ensaios em paralelo se apresentam ligeiramente mais altos. Tal facto pode estar a resultar de uma sobreposição de resultados. Uma vez que nos ensaios seguidos, pelo que já foi referido acima, é inoculada a segunda estirpe de bactérias NOX num meio de cultura onde à partida já houve consumo de matéria orgânica (acetato-C) por parte da estirpe P-17; a matéria orgânica assimilada (oxalato-C) pela segunda estirpe NOX pode manifestar resultados com influência da primeira estirpe bacteriana inoculada (a nível de consumo de carbono), pelo que se aponta a razão do ligeiro aumento de AOC.

Deste modo, e com o intuito de otimizar o método de determinação de AOC, os procedimentos experimentais realizados posteriormente, foram ensaios com o mesmo frasco em triplicado (A, B, C) para cada dia (7º, 8º e 9º dia) e em paralelo. Assim, a duração de cada ensaio foi menor, e houve menos gasto e manuseamento de material.

O método de determinação de AOC otimizado foi então aplicado à análise de amostras provenientes das sub-regiões do Barlavento e Sotavento Algarvio, tendo sido as colheitas das amostras efetuadas em dias diferentes (ver tabela I).

A nível do Barlavento, foram analisadas amostras de Bensafrim e Colinas Verdes pertencentes ao concelho de Lagos; e de Bemparece e Pinhal de Albufeira, do concelho de Albufeira.

Realizaram-se 4 ensaios (I, II, III e IV) com a amostra de Bensafrim, contudo, só se obtiveram resultados fidedignos em dois deles (II e III), dado que nos restantes ensaios (I e IV), o crescimento de colónias da estirpe P-17 não se verificou.

Tabela VII. Resultados obtidos no ensaio I - Bensafrim (Lagos, Barlavento) - Média de contagem de colónias NOX

Caixa	Diluição	Contagem		Média	Total
7^a	100				
	250				
	500				
	1000				
B	100	Contaminações c/ Levedura			
	250				
	500				
	1000				
C	100				
	250				
	500				
	1000				
8^a	100	12	24	18	---
	250	11	15	13	3,25E+05
	500	7	4	5,5	2,75E+05
	1000	1	3	2	2,00E+05
B	100	21	18	19,5	1,95E+05
	250	15	12	13,5	3,38E+05
	500	3	1	2	1,00E+05
	1000	4	3	3,5	---
C	100	20	14	17	1,70E+05
	250	8	10	9	2,25E+05
	500	1	3	2	1,00E+05
	1000	3	x	3	---
9^a	100	21	15	18	---
	250	10	5	7,5	1,88E+05
	500	3	8	5,5	---
	1000	6	1	3,5	---
B	100	21	22	21,5	2,15E+05
	250	12	6	9	---
	500	7	6	6,5	3,25E+05
	1000	3	2	2,5	2,50E+05
C	100	19	21	20	2,00E+05
	250	11	7	9	2,25E+05
	500	4	4	4	2,00E+05
	1000	1	1	1	1,00E+05
Média NOX					2,14E+05 cfu/mL

Tabela VIII. Resultados obtidos no ensaio II - Bensafrim (Lagos, Barlavento) - Média de contagem de colónias P-17 e NOX

Caixa	Diluição	Contagem	Média	Total	Caixa	Diluição	Contagem	Média	Total		
7A	100				7A	100					
	250	S/Resultados				250					
	500					500					
	1000					1000					
B	100	36	30	33	3,30E+05	B	100	Contaminações c/ Levedura			
	250	23	17	20	5,00E+05		250				
	500	13	7	10	5,00E+05		500				
	1000	5	3	4	---		1000				
C	100	28	31	29,5	2,95E+05	C	100				
	250	22	17	19,5	4,88E+05		250				
	500	9	12	10,5	5,25E+05		500				
	1000	3	2	2,5	2,50E+05		1000				
8A	100				8A	100	14	29	21,5	---	
	250	S/Resultados				250	14	12	13	3,25E+05	
	500					500	6	7	6,5	3,25E+05	
	1000					1000	4	1	2,5	---	
B	100	12	13	12,5	1,25E+05	B	100	18	14	16	1,60E+05
	250	9	7	8	2,00E+05		250	8	6	7	1,75E+05
	500	8	8	8	4,00E+05		500	3	3	3	1,50E+05
	1000	1	1	1	1,00E+05		1000	2	2	2	2,00E+05
C	100	9	9	9	9,00E+04	C	100	20	24	22	2,20E+05
	250	1	7	4	---		250	9	6	7,5	1,88E+05
	500	3	5	4	2,00E+05		500	5	3	4	2,00E+05
	1000	4	2	3	---		1000	X	x	x	---
9A	100				9A	100	33	16	24,5	---	
	250	S/Resultados				250	23	8	15,5	---	
	500					500	2	3	2,5	1,25E+05	
	1000					1000	4	3	3,5	---	
B	100	6	4	5	5,00E+04	B	100	33	6	19,5	---
	250	x	3	3	---		250	7	11	9	2,25E+05
	500	1	3	2	1,00E+05		500	6	3	4,5	2,25E+05
	1000	x	2	2	---		1000	X	2	2	---
C	100	5	3	4	4,00E+04	C	100	19	20	19,5	1,95E+05
	250	x	3	3	---		250	6	6	6	1,50E+05
	500	2	1	1,5	7,50E+04		500	3	3	3	1,50E+05
	1000	x	2	2	---		1000	1	3	2	2,00E+05
				Média P-17	2,51E+05					Média NOX	2,01E+05
				cfu/mL					cfu/mL		

Tabela IX. Resultados obtidos no ensaio III - Bensafrim (Lagos, Barlavento) - Média de contagem de colónias P-17 e NOX

Caixa	Diluição	Contagem		Média	Total
7A	100				
	250	S/Resultados			
	500				
	1000				
B	100	30	22	26	2,60E+05
	250	16	18	17	4,25E+05
	500	10	4	7	---
	1000	3	4	3,5	3,50E+05
C	100				
	250	S/Resultados			
	500				
	1000				
8A	100				
	250	S/Resultados			
	500				
	1000				
B	100	9	7	8	8,00E+04
	250	5	2	3,5	8,75E+04
	500	3	1	2	1,00E+05
	1000	x	X	x	X
C	100				
	250	S/Resultados			
	500				
	1000				
9A	100				
	250	S/Resultados			
	500				
	1000				
B	100	4	2	3	---
	250	3	3	3	7,50E+04
	500	1	2	1,5	7,50E+04
	1000	x	x	x	X
C	100				
	250	S/Resultados			
	500				
	1000				
				Média P-17	1,82E+05 cfu/mL

Caixa	Diluição	Contagem		Média	Total
7A	100				
	250				
	500				
	1000				
B	100	Contaminações c/ Levedura			
	250				
	500				
	1000				
C	100				
	250				
	500				
	1000				
8A	100	18	20	19	1,90E+05
	250	7	7	7	1,75E+05
	500	4	2	3	1,50E+05
	1000	3	x	3	---
B	100	20	24	22	2,20E+05
	250	10	10	10	2,50E+05
	500	3	4	3,5	1,75E+05
	1000	1	1	1	1,00E+05
C	100	19	19	19	1,90E+05
	250	9	7	8	2,00E+05
	500	10	1	5,5	---
	1000	6	1	3,5	---
9A	100	19	18	18,5	1,85E+05
	250	7	8	7,5	1,88E+05
	500	4	4	4	2,00E+05
	1000	4	1	2,5	---
B	100	12	17	14,5	1,45E+05
	250	5	8	6,5	1,63E+05
	500	2	2	2	1,00E+05
	1000	1	3	2	2,00E+05
C	100	18	13	15,5	1,55E+05
	250	10	8	9	2,25E+05
	500	10	7	8,5	4,25E+05
	1000		1	1	---
				Média NOX	1,77E+05 cfu/mL

Tabela X. Resultados obtidos no ensaio IV- Bensafrim (Lagos, Barlavento) - Média de contagem de colónias NOX

Caixa	Diluição	Contagem		Média	Total
7A	100	17	18	17,5	1,75E+05
	250	7	9	8	2,00E+05
	500	1	2	1,5	---
	1000	1	1	1	1,00E+05
B	100	9	14	11,5	1,15E+05
	250	5	6	5,5	1,38E+05
	500	x	4	4	---
	1000	1	4	2,5	---
C	100	15	16	15,5	1,55E+05
	250	9	8	8,5	2,13E+05
	500	3	x	3	---
	1000	1	4	2,5	---
8A	100	6	14	10	---
	250	8	6	7	1,75E+05
	500	1	4	2,5	1,25E+05
	1000	2	x	2	---
B	100	11	14	12,5	1,25E+05
	250	11	5	8	---
	500	1	2	1,5	7,50E+04
	1000	3	1	2	---
C	100	21	17	19	1,90E+05
	250	9	5	7	---
	500	5	2	3,5	1,75E+05
	1000	3	4	3,5	3,50E+05
9A	100	18	16	17	1,70E+05
	250	11	7	9	2,25E+05
	500	3	1	2	1,00E+05
	1000	1	1	1	1,00E+05
B	100	9	10	9,5	---
	250	8	5	6,5	1,63E+05
	500	x	3	3	---
	1000	3	2	2,5	2,50E+05
C	100	16	17	16,5	1,65E+05
	250	5	6	5,5	1,38E+05
	500	7	1	4	---
	1000	1	4	2,5	2,50E+05
Média NOX					1,73E+05 cfu/mL

Destaca-se nestes ensaios uma contaminação por parte de uma levedura no 7º dia (ensaio I, II, III) na contagem das colónias da estirpe NOX. Esta contaminação só foi perceptível na etapa do crescimento de NOX em placa com meio R₂A; não se verificando portanto qualquer problema a nível do frasco de inóculo, até porque se fosse o caso, não haveria resultados nos 8º e 9º dias. Como tal pode inferir-se que a contaminação foi proveniente de qualquer material de laboratório utilizado no procedimento experimental desse dia.

Pode também discutir-se que a ausência de colónias P-17, para além de surgir nos ensaio I e IV, como já fora acima indicado, observou-se particularmente no frasco A do ensaio II, bem como nos frascos A e C do ensaio III. Por isto, a razão de não haver crescimento de P-17 nesses casos, poderá estar associada à fraca homogeneização do inóculo, por exemplo, ou a outros erros associados à própria técnica experimental.

Os campos das tabelas que se encontram preenchidos a tracejado (---), representam as contagens desprezadas, pelo motivo que já fora acima referido.

De forma idêntica à anterior reuniram-se os resultados dos 4 ensaios na seguinte tabela.

Tabela XI. Determinação de AOC – Amostra Bensafrim (Lagos, Barlavento)

Ensaio	Média P-17 (cfu/mL)	AOC P-17 (µg /L)	Média NOX (cfu/mL)	AOC NOX (µg /L)	AOC (µg /L)
I	<i>s/ crescimento</i>	0	2,14E+05	73	73
II	2,51E+05	61	2,01E+05	69	130
III	1,82E+05	44	1,77E+05	61	105
IV	<i>s/ crescimento</i>	0	1,73E+05	60	60

Como esperado, nos ensaios I e IV verificou-se uma concentração de AOC mais baixa, visto não se ter detetado crescimento da estirpe P-17, e como tal a falta de coerência destes resultados com a dos restantes (ensaio II e III) é notória. Contudo pode-se inferir, com base nos ensaios II e III que a concentração de AOC neste ponto de entrega encontra-se na média dos 118 μL .

No que respeita a amostra de Colinas Verdes, também da sub-região do Barlavento e concelho de Lagos, foram realizados 3 ensaios.

Tabela XII. Resultados obtidos no ensaio I- Colinas Verdes (Lagos, Barlavento) - Média de contagem de colónias NOX

Caixa	Diluição	Contagem		Média	Total
7 A	100	13	15	14	1,40E+05
	250	5	3	4	1,00E+05
	500	x	1	1	---
	1000	1	2	1,5	1,50E+05
B	100	16	13	14,5	1,45E+05
	250	5	11	8	---
	500	3	3	3	1,50E+05
	1000	1	1	1	1,00E+05
C	100	15	18	16,5	1,65E+05
	250	3	9	6	---
	500	4	4	4	2,00E+05
	1000	1	1	1	1,00E+05
8 A	100	25	21	23	2,30E+05
	250	7	5	6	1,50E+05
	500	4	4	4	2,00E+05
	1000	2	10	6	---
B	100	23	28	25,5	2,55E+05
	250	8	7	7,5	1,88E+05
	500	3	5	4	2,00E+05
	1000	8	2	5	---
C	100	16	29	22,5	---
	250	9	14	11,5	2,88E+05
	500	2	4	3	1,50E+05
	1000	1	x	1	---
9ª	100	19	17	18	1,80E+05
	250	14	10	12	3,00E+05
	500	3	3	3	1,50E+05
	1000	x	6	6	---
B	100	20	9	14,5	---
	250	16	17	16,5	4,13E+05
	500	6	5	5,5	2,75E+05
	1000	2	2	2	2,00E+05
C	100	21	11	16	---
	250	10	13	11,5	2,88E+05
	500	x	x	X	---
	1000	8	5	6,5	6,50E+05
Média NOX					2,57E+05 cfu/mL

Tabela XIII. Resultados obtidos no ensaio II-Colinas Verdes (Lagos, Barlavento)-Média de contagem de colónias NOX.

Caixa	Diluição	Contagem		Média	Total
7A	100	12	18	15	1,50E+05
	250	3	5	4	1,00E+05
	500	4	1	2,5	---
	1000	1	4	2,5	---
B	100	6	13	9,5	---
	250	6	6	6	1,50E+05
	500	5	5	5	2,50E+05
	1000	x	2	2	---
C	100	16	12	14	1,40E+05
	250	9	6	7,5	1,88E+05
	500	5	3	4	2,00E+05
	1000	2	2	2	2,00E+05
8A	100	x	x	x	X
	250	x	x	x	X
	500	x	x	X	X
	1000	2	4	3	---
B	100	17	14	15,5	1,55E+05
	250	6	11	8,5	---
	500	1	3	2	1,00E+05
	1000	3	8	5,5	---
C	100	16	x	16	---
	250	10	x	10	---
	500	4	x	4	---
	1000	3	x	3	---
9A	100	28	14	21	2,10E+05
	250	5	8	6,5	1,63E+05
	500	4	6	5	2,50E+05
	1000	1		1	---
B	100	17	23	20	2,00E+05
	250	14	8	11	---
	500	6	2	4	---
	1000	4	x	4	---
C	100	17	25	21	2,10E+05
	250	3	7	5	---
	500	1	4	2,5	1,25E+05
	1000	1	1	1	1,00E+05
Média NOX					1,68E+05 cfu/mL

Tabela XIV. Resultados obtidos no ensaio III-Colinas Verdes(Lagos, Barlavento)-Média de contagem de colónias NOX.

Caixa	Diluição	Contagem		Média	Total
7ª	100	19	11	15	1,50E+05
	250	3	4	3,5	---
	500	3	5	4	2,00E+05
	1000	1	2	1,5	1,50E+05
B	100	7	13	10	1,00E+05
	250	5	2	3,5	8,75E+04
	500	3	2	2,5	1,25E+05
	1000	3	X	3	---
C	100	13	15	14	1,40E+05
	250	9	6	7,5	1,88E+05
	500	5	6	5,5	2,75E+05
	1000	1	1	1	1,00E+05
8 A	100	15	10	12,5	1,25E+05
	250	8	7	7,5	1,88E+05
	500	4	4	4	2,00E+05
	1000	1	2	1,5	1,50E+05
B	100	13	16	14,5	1,45E+05
	250	7	8	7,5	1,88E+05
	500	5	6	5,5	2,75E+05
	1000	x	1	1	---
C	100	14	13	13,5	1,35E+05
	250	8	8	8	2,00E+05
	500	5	4	4,5	2,25E+05
	1000	2	2	2	2,00E+05
9 A	100	17	16	16,5	1,65E+05
	250	8	10	9	2,25E+05
	500	4	4	4	2,00E+05
	1000	3	1	2	2,00E+05
B	100	14	17	15,5	1,55E+05
	250	11	7	9	2,25E+05
	500	6	2	4	---
	1000	4	x	4	---
C	100	18	19	18,5	1,85E+05
	250	12	7	9,5	2,38E+05
	500	5	2	3,5	---
	1000	x	1	1	---
Média NOX					1,91E+05 cfu/mL

De forma similar ao outro ensaio, não se verificou qualquer crescimento de P-17 em nenhum dos ensaios, pelo que os resultados de AOC foram calculados apenas com a contribuição das contagens de NOX (C-oxalato).

Os campos das tabelas que se encontram preenchidos a tracejado (---), representam as contagens desprezadas, pelo motivo supramencionado.

Tabela XV. Determinação de AOC – Amostra Colinas Verdes (Lagos, Barlavento)

Ensaio	Média P-17 (cfu/mL)	AOC P-17 (µg /L)	Média NOX (cfu/mL)	AOC NOX (µg /L)	AOC (µg /L)
I	<i>s/ crescimento</i>	0	2,57E+05	88	88
II	<i>s/ crescimento</i>	0	1,68E+05	58	58
III	<i>s/ crescimento</i>	0	1,91E+05	66	66

Visto que os resultados totais de concentração de AOC terem sido apenas baseado na contribuição das contagens de NOX (C-oxalato), a significância destes resultados não pode ser ponderada.

A nível das amostras do concelho de Albufeira (Barlavento), no ensaio realizado na amostra de Pinhal de Albufeira, também não foi possível a contagem de microrganismos da estirpe P-17, exibindo assim só resultados da contagem de NOX.

Tabela XVI. Resultados obtidos no ensaio I- Pinhal de Albufeira (Albufeira, Barlavento)- Média de contagem de colónias NOX.

Caixa	Diluição	Contagem		Média	Total
7A	100	79	58	68,5	6,85E+05
	250	34	36	35	8,75E+05
	500	14	17	15,5	7,75E+05
	1000	14	9	11,5	---
B	100	104	68	86	---
	250	34	32	33	8,25E+05
	500	21	23	22	1,10E+06
	1000	4	7	5,5	5,50E+05
C	100	88	72	80	8,00E+05
	250	24	36	30	7,50E+05
	500	32	17	24,5	1,23E+06
	1000	5	11	8	8,00E+05
8A	100	64	71	67,5	6,75E+05
	250	22	40	31	7,75E+05
	500	23	31	27	1,35E+06
	1000	11	5	8	8,00E+05
B	100	58	65	61,5	6,15E+05
	250	35	26	30,5	7,63E+05
	500	13	23	18	9,00E+05
	1000	9	13	11	---
C	100	85	100	92,5	9,25E+05
	250	30	31	30,5	7,63E+05
	500	8	10	9	4,50E+05
	1000	12	10	11	---
9A	100	55	84	69,5	6,95E+05
	250	27	25	26	6,50E+05
	500	18	16	17	8,50E+05
	1000	6	9	7,5	7,50E+05
B	100	91	64	77,5	7,75E+05
	250	54	48	51	1,28E+06
	500	14	19	16,5	8,25E+05
	1000	7	10	8,5	8,50E+05
C	100	70	73	71,5	7,15E+05
	250	39	37	38	9,50E+05
	500	14	18	16	8,00E+05
	1000	12	5	8,5	---
Média NOX					8,17E+05 cfu/mL

Os campos da tabela que se encontram preenchidos a tracejado (---) e em todas as tabelas de resultados que se seguem representam as contagens desprezadas, pelo motivo já referenciado.

Tabela XVII. Determinação de AOC – Amostra Pinhal de Albufeira (Albufeira, Barlavento)

Ensaio	Média P-17 (cfu/mL)	AOC P-17 (µg /L)	Média NOX (cfu/mL)	AOC NOX (µg /L)	AOC (µg /L)
I	<i>s/ crescimento</i>	0	8,17E+05	281	281

Dado que os resultados totais de concentração de AOC terem sido apenas baseado na contribuição das contagens de NOX (C-oxalato), tal como aconteceu no ensaio anterior, a significância destes resultados não pode ser ponderada.

Com a amostra de Bensafrim (Albufeira, Barlavento) obtiveram-se resultados apenas num ensaio. Contudo, foi possível a contagem de colónias das duas estirpes. O que confere maior significância aos resultados.

Tabela XVIII. Resultados obtidos no ensaio I- Bemparece (Albufeira, Barlavento)- Média de contagem de colónias P-17 e NOX.

Caixa	Diluição	Contagem		Média	Total	Caixa	Diluição	Contagem		Média	Total
7A	100	34	33	33,5	3,35E+05	7A	100	58	64	61	6,10E+05
	250	18	19	18,5	4,63E+05		250	38	31	34,5	8,63E+05
	500	21	13	17	---		500	23	17	20	1,00E+06
	1000	13	5	9	---		1000	6	10	8	8,00E+05
B	100	56	43	49,5	4,95E+05	B	100	71	66	68,5	6,85E+05
	250	28	37	32,5	8,13E+05		250	38	22	30	7,50E+05
	500	18	11	14,5	7,25E+05		500	25	19	22	1,10E+06
	1000	9	10	9,5	---		1000	11	6	8,5	8,50E+05
C	100	29	30	29,5	2,95E+05	C	100	72	70	71	7,10E+05
	250	14	14	14	3,50E+05		250	31	20	25,5	6,38E+05
	500	9	9	9	4,50E+05		500	13	19	16	8,00E+05
	1000	7	7	7	7,00E+05		1000	12	9	10,5	1,05E+06
8A	100	41	38	39,5	3,95E+05	8A	100	59	66	62,5	6,25E+05
	250	28	17	22,5	5,63E+05		250	29	25	27	6,75E+05
	500	19	14	16,5	8,25E+05		500	18	24	21	---
	1000	3	3	3	3,00E+05		1000	11	12	11,5	1,15E+06
B	100	41	31	36	3,60E+05	B	100	81	70	75,5	7,55E+05
	250	23	19	21	5,25E+05		250	30	32	31	7,75E+05
	500	12	12	12	6,00E+05		500	15	20	17,5	8,75E+05
	1000	3	5	4	4,00E+05		1000	11	9	10	1,00E+06
C	100	25	29	27	2,70E+05	C	100	68	63	65,5	6,55E+05
	250	12	16	14	3,50E+05		250	29	38	33,5	8,38E+05
	500	8	14	11	5,50E+05		500	17	22	19,5	9,75E+05
	1000	4	9	6,5	6,50E+05		1000	7	15	11	---
9A	100	24	29	26,5	2,65E+05	9A	100	53	62	57,5	5,75E+05
	250	25	18	21,5	---		250	38	22	30	7,50E+05
	500	19	11	15	7,50E+05		500	16	13	14,5	7,25E+05
	1000	7	7	7	7,00E+05		1000	6	9	7,5	7,50E+05
B	100	29	23	26	2,60E+05	B	100	62	51	56,5	5,65E+05
	250	22	14	18	---		250	33	25	29	7,25E+05
	500	14	14	14	7,00E+05		500	23	14	18,5	---
	1000	7	5	6	6,00E+05		1000	5	5	5	5,00E+05
C	100	36	31	33,5	3,35E+05	C	100	69	84	76,5	7,65E+05
	250	21	23	22	5,50E+05		250	29	27	28	7,00E+05
	500	13	8	10,5	5,25E+05		500	16	21	18,5	9,25E+05
	1000	4	2	3	3,00E+05		1000	6	6	6	6,00E+05
Média P-17					4,97E+05	Média NOX					7,57E+05
					cfu/mL						cfu/mL

Tabela XIX. Determinação de AOC – Bemparece (Albufeira, Barlavento)

Ensaio	Média P-17 (cfu/mL)	AOC P-17 (µg /L)	Média NOX (cfu/mL)	AOC NOX (µg /L)	AOC (µg /L)
I	4,97E+05	121	7,57E+05	260	381

Pelo facto de no estudo desta amostra surgirem resultados de P-17, o que não acontecera na maioria das vezes, permite supor que o problema poderá estar mesmo associado à qualidade da água consoante a sua origem, e não propriamente ao inóculo da bactéria P-17. A explicação para este facto é referida mais à frente.

Pode-se considerar que o valor de concentração de AOC, neste ponto de entrega da rede de abastecimento, se apresenta na ordem dos 381 µg/L.

É de salientar que nos restantes ensaios realizados nas duas amostras apresentadas anteriormente do concelho de Albufeira, Barlavento; surgiram contaminações, pelo que se tornou impossível qualquer contagem de microrganismos e os resultados apresentados reduziram-se apenas de um único ensaio.

No que diz respeito à sub-região do Sotavento, foram testadas amostras de três pontos de entrega: Pé de Outeiro (Faro), Fonte de Pipa (Loulé) e Brancanes (Olhão).

Na amostra do ponto de entrega de Pé de Outeiro, não se obteve crescimento da estirpe P-17 em nenhum dos três ensaios realizados.

Tabela XX. Resultados obtidos no ensaio I- Pé de Outeiro (Faro, Sotavento)- Média de contagem de colónias NOX.

Caixa	Diluição	Contagem		Média	Total
7A	100	61	57	59	5,90E+05
	250	32	27	29,5	7,38E+05
	500	15	22	18,5	9,25E+05
	1000	6	11	8,5	---
B	100	92	86	89	---
	250	39	44	41,5	1,04E+06
	500	15	14	14,5	7,25E+05
	1000	16	9	12,5	---
C	100	73	80	76,5	7,65E+05
	250	28	37	32,5	8,13E+05
	500	17	11	14	7,00E+05
	1000	9	10	9,5	---
8A	100	61	64	62,5	6,25E+05
	250	33	34	33,5	8,38E+05
	500	23	15	19	9,50E+05
	1000	7	2	4,5	---
B	100	92	62	77	7,70E+05
	250	33	31	32	8,00E+05
	500	19	17	18	9,00E+05
	1000	6	6	6	6,00E+05
C	100	68	95	81,5	8,15E+05
	250	34	25	29,5	7,38E+05
	500	17	13	15	7,50E+05
	1000	11	7	9	9,00E+05
9A	100	69	65	67	6,70E+05
	250	34	24	29	7,25E+05
	500	22	11	16,5	---
	1000	4	10	7	7,00E+05
B	100	75	68	71,5	7,15E+05
	250	52	29	40,5	1,01E+06
	500	21	7	14	---
	1000	5	11	8	8,00E+05
C	100	75	66	70,5	7,05E+05
	250	34	27	30,5	7,63E+05
	500	15	15	15	7,50E+05
	1000	6	15	10,5	---
Média NOX					7,76E+05 cfu/mL

Tabela XXI. Resultados obtidos no ensaio II- Pé de Outeiro (Faro, Sotavento)- Média de contagem de colónias NOX.

Caixa	Diluição	Contagem	Média	Total	
7A	100	54	67	60,5	6,05E+05
	250	22	24	23	5,75E+05
	500	7	21	14	---
	1000	9	4	6,5	---
B	100	73	86	79,5	7,95E+05
	250	43	28	35,5	8,88E+05
	500	21	12	16,5	8,25E+05
	1000	8	6	7	7,00E+05
C	100	82	57	69,5	6,95E+05
	250	28	28	28	7,00E+05
	500	14	18	16	8,00E+05
	1000	6	17	11,5	---
8A	100	59	76	67,5	6,75E+05
	250	33	27	30	7,50E+05
	500	15	16	15,5	7,75E+05
	1000	8	13	10,5	1,05E+06
B	100	89	93	91	9,10E+05
	250	37	24	30,5	7,63E+05
	500	21	17	19	9,50E+05
	1000	11	10	10,5	1,05E+06
C	100				---
	250				---
	500				---
	1000				---
9A	100	78	65	63	6,30E+05
	250	23	24	22	5,50E+05
	500	23	11	18	---
	1000	8	10	6	6,00E+05
B	100	66	68	70	7,00E+05
	250	37	29	42	1,05E+06
	500	10	7	19	9,50E+05
	1000	6	11	9	---
C	100	71	66	62	6,20E+05
	250	38	27	31	7,75E+05
	500	14	15	11	5,50E+05
	1000	7	15	12	---
Média NOX				7,85E+05	cfu/mL

Tabela XXII. Resultados obtidos no ensaio III- Pé de Outeiro (Faro, Sotavento)- Média de contagem de colónias NOX.

Caixa	Diluição	Contagem		Média	Total
7A	100	79	57	68	6,80E+05
	250	34	30	32	8,00E+05
	500	11	23	17	---
	1000	10	18	14	1,40E+06
B	100	85	76	80,5	8,05E+05
	250	20	37	28,5	7,13E+05
	500	17	17	17	8,50E+05
	1000	9	11	10	1,00E+06
C	100	72	66	69	6,90E+05
	250	23	19	21	5,25E+05
	500	13	14	13,5	6,75E+05
	1000	9	4	6,5	6,50E+05
8A	100	64	64	64	6,40E+05
	250	27	27	27	6,75E+05
	500	21	19	20	1,00E+06
	1000	8	6	7	7,00E+05
B	100	90	96	93	9,30E+05
	250	47	29	38	---
	500	21	30	25,5	1,28E+06
	1000	8	8	8	8,00E+05
C	100	63	54	58,5	5,85E+05
	250	40	33	36,5	9,13E+05
	500	18	20	19	9,50E+05
	1000	8	5	6,5	6,50E+05
9A	100	61	67	63	6,30E+05
	250	31	41	22	5,50E+05
	500	19	15	18	9,00E+05
	1000	11	5	6	6,00E+05
B	100	97	97	70	7,00E+05
	250	51	39	42	1,05E+06
	500	13	18	19	9,50E+05
	1000	12	8	9	9,00E+05
C	100	78	83	62	6,20E+05
	250	40	32	31	7,75E+05
	500	18	15	11	5,50E+05
	1000	5	9	12	1,20E+06
Média NOX					8,06E+05 cfu/mL

Tabela XXIII. Determinação de AOC – Pé de Outeiro (Faro, Sotavento)

Ensaio	Média P-17 (cfu/mL)	AOC P-17 (µg /L)	Média NOX (cfu/mL)	AOC NOX (µg /L)	AOC (µg /L)
I	<i>s/ crescimento</i>	0	7,76E+05	267	267
II	<i>s/ crescimento</i>	0	7,85E+05	270	270
III	<i>s/ crescimento</i>	0	8,06E+05	277	277

Os resultados de concentração de AOC neste ensaio, apesar de não haver contribuição da parte da estirpe P-17 no cálculo total de AOC, apresentaram-se bastante coerentes. Assim sendo, é de considerar a sua significância no que respeita a concentração de AOC neste local de recolha de amostra.

Os ensaios com a amostra de Fonte de Pipa (Loulé, Faro) apresentaram resultados com contagens de ambas as estirpes P-17 e NOX em apenas um ensaio (ensaio III) dos quatro realizados.

Tabela XXIV. Resultados obtidos no ensaio I- Fonte da Pipa (Loulé, Sotavento)- Média de contagem de colónias NOX.

Caixa	Diluição	Contagem	Média	Total	
7A	100	53	58	55,5	5,55E+05
	250	29	29	29	7,25E+05
	500	20	24	22	1,10E+06
	1000	9	6	7,5	7,50E+05
B	100	60	54	57	5,70E+05
	250	33	41	37	9,25E+05
	500	15	21	18	9,00E+05
	1000	12	10	11	1,10E+06
C	100	69	50	59,5	5,95E+05
	250	24	24	24	6,00E+05
	500	20	14	17	8,50E+05
	1000	12	12	12	1,20E+06
8A	100	81	65	73	7,30E+05
	250	27	30	28,5	7,13E+05
	500	18	3	10,5	---
	1000	7	12	9,5	9,50E+05
B	100	x	x	x	X
	250	70	x	70	---
	500	36	30	33	1,65E+06
	1000	11	14	12,5	1,25E+06
C	100	x	x	x	X
	250	x	x	x	X
	500	x	x	x	X
	1000	13	9	11	1,10E+06
9A	100	78	70	74	7,40E+05
	250	28	26	27	6,75E+05
	500	16	18	17	8,50E+05
	1000	10	4	7	---
B	100	65	58	61,5	6,15E+05
	250	36	33	34,5	8,63E+05
	500	19	9	14	---
	1000	8	13	10,5	1,05E+06
C	100	67	68	67,5	6,75E+05
	250	40	40	40	1,00E+06
	500	9	12	10,5	5,25E+05
	1000	13	12	12,5	---
Média NOX				8,92E+05	cfu/mL

Tabela XXV. Resultados obtidos no ensaio II- Fonte da Pipa (Loulé, Sotavento)- Média de contagem de colónias NOX.

Caixa	Diluição	Contagem	Média	Total	
7A	100	70	85	77,5	7,75E+05
	250	35	38	36,5	9,13E+05
	500	11	16	13,5	6,75E+05
	1000	6	10	8	8,00E+05
B	100	76	73	74,5	7,45E+05
	250	36	27	31,5	7,88E+05
	500	16	16	16	8,00E+05
	1000	10	32	21	---
C	100	73	100	86,5	8,65E+05
	250	31	29	30	7,50E+05
	500	18	11	14,5	7,25E+05
	1000	11	7	9	9,00E+05
8A	100	76	64	70	7,00E+05
	250	44	36	40	1,00E+06
	500	17	17	17	8,50E+05
	1000	8	3	5,5	5,50E+05
B	100	80	75	77,5	7,75E+05
	250	25	31	28	7,00E+05
	500	19	18	18,5	9,25E+05
	1000	11	14	12,5	1,25E+06
C	100	65	63	64	6,40E+05
	250	30	25	27,5	6,88E+05
	500	17	12	14,5	7,25E+05
	1000	8	9	8,5	8,50E+05
9A	100	70	81	75,5	7,55E+05
	250	39	30	34,5	8,63E+05
	500	15	15	15	7,50E+05
	1000	12	15	13,5	1,35E+06
B	100	71	68	69,5	6,95E+05
	250	36	33	34,5	8,63E+05
	500	10	16	13	6,50E+05
	1000	5	10	7,5	---
C	100	98	65	81,5	8,15E+05
	250	19	38	28,5	
	500	18	20	19	9,50E+05
	1000	6	12	9	---
Média NOX				8,26E+05	cfu/mL

Tabela XXVI. Resultados obtidos no ensaio III- Fonte da Pipa (Loulé, Sotavento)- Média de contagem de colónias P-17 e NOX.

Caixa	Diluição	Contagem		Média	Total	Caixa	Diluição	Contagem		Média	Total
7A	100	30	20	25	2,50E+05	7A	100	84	58	71	---
	250	19	16	17,5	---		250	37	37	37	9,25E+05
	500	10	9	9,5	4,75E+05		500	13	15	14	7,00E+05
	1000				---		1000				---
B	100	20	28	24	2,40E+05	7B	100	83	78	80,5	8,05E+05
	250	19	15	17	4,25E+05		250	48	60	54	1,35E+06
	500	7	6	6,5	3,25E+05		500	22	36	29	---
	1000				---		1000				---
C	100	22	25	23,5	2,35E+05	7C	100	74	74	74	7,40E+05
	250	15	8	11,5	2,88E+05		250	23	46	34,5	---
	500	4	2	3	1,50E+05		500	16	20	18	9,00E+05
	1000				---		1000				---
8A	100	18	25	21,5	---	8A	100	65	67	66	6,60E+05
	250	14	17	15,5	3,88E+05		250	48	35	41,5	1,04E+06
	500	6	11	8,5	4,25E+05		500	16	21	18,5	9,25E+05
	1000				---		1000				---
B	100	24	48	36	---	8B	100	107	91	99	9,90E+05
	250	16	11	13,5	3,38E+05		250	49	53	51	1,28E+06
	500	7	9	8	4,00E+05		500	25	27	26	1,30E+06
	1000				---		1000				---
C	100	11	12	11,5	1,15E+05	8C	100	63	83	73	7,30E+05
	250	5	5	5	1,25E+05		250	31	37	34	8,50E+05
	500	7	10	8,5	---		500	14	22	18	9,00E+05
	1000				---		1000				---
9A	100	30	12	21	2,10E+05	9A	100	56	53	54,5	5,45E+05
	250	13	9	11	2,75E+05		250	35	44	39,5	9,88E+05
	500	4	3	3,5	1,75E+05		500	18	15	16,5	8,25E+05
	1000				---		1000				---
B	100	23	21	22	2,20E+05	9B	100	93	86	89,5	8,95E+05
	250	14	12	13	3,25E+05		250	29	34	31,5	7,88E+05
	500	5	3	4	2,00E+05		500	25	33	29	---
	1000				---		1000				---
C	100	21	13	17	1,70E+05	9C	100	79	70	74,5	7,45E+05
	250	8	11	9,5	---		250	33	26	29,5	7,38E+05
	500	8	8	8	4,00E+05		500	17	6	11,5	5,75E+05
	1000				---		1000				---
Média P-17					2,80E+05 cfu/mL	Média NOX					8,69E+05 cfu/mL

Tabela XXVII. Resultados obtidos no ensaio IV- Fonte da Pipa (Loulé, Sotavento)- Média de contagem de colónias NOX.

Caixa	Diluição	Contagem		Média	Total
7^a	100	71	67	69	6,90E+05
	250	36	24	30	7,50E+05
	500	20	17	18,5	9,25E+05
	1000	7	7	7	7,00E+05
B	100	78	78	78	7,80E+05
	250	33	28	30,5	7,63E+05
	500	22	17	19,5	9,75E+05
	1000	15	10	12,5	1,25E+06
C	100	71	64	67,5	6,75E+05
	250	32	33	32,5	8,13E+05
	500	23	24	23,5	1,18E+06
	1000	16	7	11,5	---
8^a	100	52	47	49,5	4,95E+05
	250	26	27	26,5	6,63E+05
	500	12	22	17	8,50E+05
	1000	4	6	5	5,00E+05
B	100	44	55	49,5	4,95E+05
	250	24	27	25,5	6,38E+05
	500	11	16	13,5	6,75E+05
	1000	6	x	6	---
C	100	44	61	52,5	5,25E+05
	250	45	27	36	---
	500	30	16	23	1,15E+06
	1000	8	9	8,5	8,50E+05
9^a	100	70	75	72,5	7,25E+05
	250	26	28	27	6,75E+05
	500	11	27	19	---
	1000	8	5	6,5	6,50E+05
B	100	70	68	69	6,90E+05
	250	42	34	38	9,50E+05
	500	12	18	15	7,50E+05
	1000	13	8	10,5	---
C	100	69	85	77	7,70E+05
	250	48	57	52,5	1,31E+06
	500	24	16	20	1,00E+06
	1000	16	9	12,5	---
Média NOX					7,56E+05 cfu/mL

Tabela XXVIII. Determinação de AOC – Amostra Fonte de Pipa (Loulé, Sotavento)

Ensaio	Média P-17 (cfu/mL)	AOC P-17 (µg /L)	Média NOX (cfu/mL)	AOC NOX (µg /L)	AOC (µg /L)
I	<i>s/ crescimento</i>	0	8,92E+05	307	307
II	<i>s/ crescimento</i>	0	8,26E+05	284	284
III	2,80E+05	68	8,69E+05	298	367
IV	<i>s/ crescimento</i>	0	7,56E+05	260	260

Os resultados destes ensaios também não diferem muito entre si a nível de concentração de AOC, tendo em conta apenas a coerência dos resultados das contagens da estirpe NOX.

Por fim, o ensaio nas amostras de Brancanes (Olhão, Sotavento), apresentou falta de resultados da estirpe de P-17 em apenas um ensaio (III) dos três (I, II e III) realizados.

Tabela XXIX. Resultados obtidos no ensaio I- Brancanes (Olhão, Sotavento)- Média de contagem de colónias P-17 e NOX.

Caixa	Diluição	Contagem		Média	Total	Caixa	Diluição	Contagem		Média	Total
7A	100	4	x	4	4,00E+04	7A	100	61		61	6,10E+05
	250	2	x	2	5,00E+04		250	21		21	5,25E+05
	500						500	19		19	9,50E+05
	1000						1000	10		10	1,00E+06
B	100	4	x	4	4,00E+04	B	100	53		53	5,30E+05
	250	4	x	4	1,00E+05		250	30		30	7,50E+05
	500						500	19		19	9,50E+05
	1000						1000				---
C	100	7	x	7	7,00E+04	C	100	70		70	7,00E+05
	250						250	33		33	8,25E+05
	500	1	x	1	5,00E+04		500	18		18	9,00E+05
	1000						1000				---
8A	100	2	5	3,5	3,50E+04	8A	100	61	76	68,5	6,85E+05
	250						250	28	36	32	8,00E+05
	500						500	11	24	17,5	8,75E+05
	1000						1000	11	4	7,5	---
B	100	4	3	3,5	3,50E+04	B	100	68	72	70	7,00E+05
	250	1	2	1,5	3,75E+04		250	18	29	23,5	5,88E+05
	500	1	x	1			500	19	8	13,5	---
	1000						1000	9	10	9,5	9,50E+05
C	100	15	15	15	1,50E+05	C	100	81	74	77,5	7,75E+05
	250	10	10	10	2,50E+05		250	28	33	30,5	7,63E+05
	500	12	3	7,5			500	16	18	17	8,50E+05
	1000	x	2	2	2,00E+05		1000	7	12	9,5	9,50E+05
9A	100					9A	100	44	62	63	6,30E+05
	250	x	1	1			250	29	34	22	5,50E+05
	500						500	12	19	18	9,00E+05
	1000						1000	9	12	6	---
B	100	3	4	3,5	3,50E+04	B	100	63	61	70	7,00E+05
	250	1	x	1			250	30	33	42	1,05E+06
	500						500	14	17	19	9,50E+05
	1000						1000	4	12	9	9,00E+05
C	100	14	20	17	1,70E+05	C	100	67	69	62	6,20E+05
	250	7	5	6			250	31	38	31	7,75E+05
	500	9	6	7,5	3,75E+05		500	12	16	11	5,50E+05
	1000						1000	8	8	12	1,20E+06
Média P-17					1,09E+05 cfu/mL	Média NOX					7,98E+05 cfu/mL

Tabela XXX. Resultados obtidos no ensaio II- Brancanes (Olhão, Sotavento)- Média de contagem de colónias P-17 e NOX.

Caixa	Diluição	Contagem	Média	Total	Caixa	Diluição	Contagem	Média	Total		
7A	100	3	3	3,00E+04	7A	100	58	x	58	5,80E+05	
	250	2	2	5,00E+04		250	47	x	47	1,18E+06	
	500					500	12	x	12	6,00E+05	
	1000					1000	x	x	x	x	
B	100	4	4	4,00E+04	B	100	77	x	77	7,70E+05	
	250	2	2	5,00E+04		250	29	x	29	7,25E+05	
	500	2	2	1,00E+05		500	26	x	26	1,30E+06	
	1000					1000	x	x			
C	100	6	6	6,00E+04	C	100	73	x	73	7,30E+05	
	250	3	3	7,50E+04		250	51	x	51	1,28E+06	
	500	1	1	5,00E+04		500	28	x	28	1,40E+06	
	1000					1000	x	x			
8A	100	4	3	3,5	3,50E+04	8A	100	71	55	63	6,30E+05
	250	2		2	---		250	33	25	29	7,25E+05
	500		2	2	---		500	12	22	17	8,50E+05
	1000	1		1	---		1000	6	7	6,5	6,50E+05
B	100	4	4	4	4,00E+04	B	100	71	66	68,5	6,85E+05
	250	2	1	1,5	3,75E+04		250	23	30	26,5	6,63E+05
	500	1		1	---		500	19	20	19,5	9,75E+05
	1000						1000	10	8	9	9,00E+05
C	100	8	7	7,5	7,50E+04	C	100	79	67	73	7,30E+05
	250	5	5	5	1,25E+05		250	31	37	34	8,50E+05
	500	2	1	1,5	7,50E+04		500	23	17	20	1,00E+06
	1000						1000	8	18	13	---
9A	100	1	1	1	1,00E+04	9A	100	63	61	63	6,30E+05
	250						250	27	32	22	5,50E+05
	500						500	18	21	18	9,00E+05
	1000						1000	11	9	6	6,00E+05
B	100	6	1	3,5	3,50E+04	B	100	58	55	70	7,00E+05
	250	2	2	2	5,00E+04		250	23	32	42	1,05E+06
	500	1		1	---		500	9	8	19	9,50E+05
	1000						1000	9	5	9	9,00E+05
C	100	3	2	2,5	2,50E+04	C	100	59	60	62	6,20E+05
	250	5	1	3	---		250	35	28	31	7,75E+05
	500						500	24	12	11	5,50E+05
	1000						1000	9	4	12	1,20E+06
				Média P-17	5,35E+04					Média NOX	7,86E+05
				cfu/mL					cfu/mL		

Tabela XXXI. Resultados obtidos no ensaio III- Brancanes (Olhão, Sotavento)- Média de contagem de colónias NOX.

Caixa	Diluição	Contagem		Média	Total
7A	100	66	75	70,5	7,05E+05
	250	23	36	29,5	7,38E+05
	500	23	20	21,5	---
	1000				
B	100	46	57	51,5	5,15E+05
	250	31	31	31	7,75E+05
	500	14	15	14,5	7,25E+05
	1000				
C	100	84	57	70,5	7,05E+05
	250	25	34	29,5	7,38E+05
	500	12	21	16,5	8,25E+05
	1000				
8A	100	89	98	93,5	9,35E+05
	250	21	33	27	6,75E+05
	500	14	15	14,5	7,25E+05
	1000				
B	100	75	77	76	7,60E+05
	250	34	18	26	6,50E+05
	500	12	18	15	
	1000				
C	100	47	13	30	---
	250	30	20	25	6,25E+05
	500	16	14	15	7,50E+05
	1000				
9A	100	47	70	63	6,30E+05
	250	20	20	22	5,50E+05
	500	17	19	18	---
	1000				
B	100	64	61	70	7,00E+05
	250	37	29	42	1,05E+06
	500	14	17	19	9,50E+05
	1000				
C	100	75	73	62	6,20E+05
	250	33	35	31	7,75E+05
	500	21	15	11	5,50E+05
	1000				
Média NOX					7,30E+05 cfu/mL

Tabela XXXII. Determinação de AOC – Brancanes (Olhão, Sotavento)

Ensaio	Média P-17 (cfu/mL)	AOC P-17 (µg /L)	Média NOX (cfu/mL)	AOC NOX (µg /L)	AOC (µg /L)
I	1,09E+05	27	7,98E+05	274	301
II	5,35E+04	13	7,86E+05	270	283
III	<i>s/ crescimento</i>	0	7,30E+05	251	251

Mais uma vez é de notar a coerência de resultados apenas a nível do contributo de colónias NOX para a determinação da concentração de AOC nas amostras deste local de recolha. A sua significância porém é que não pode ser ponderada.

Os resultados anteriores sugerem o que já é conhecido, que o crescimento bacteriano é monitorizado em amostras de água por contagem de colónias, e o crescimento médio observado durante a incubação é convertido em unidades de AOC (µg acetato-C/L), através do rendimento de crescimento das bactérias derivado das curvas de calibração obtidas usando concentrações padrão de compostos orgânicos- acetato e oxalato. É de observar uma significativa correlação entre a concentração de AOC e a densidade das bactérias heterotróficas.

No entanto, dado que o AOC é tipicamente quantificado pelas duas estirpes de bactérias referidas (P-17 e NOX), estes resultados, podem também ser interpretados como reveladores de um grupo específico de compostos orgânicos simples, de acordo com as capacidades metabólicas destes microrganismos. Realça-se então o facto, de na maioria das amostras, existirem compostos orgânicos simples sujeitos ao metabolismo da estirpe NOX, particularmente o oxalato.

Por outro lado, é de destacar que na maioria das amostras de água não foi detetado qualquer crescimento da estirpe da bactéria P-17.

Como tal, conhecendo que a estirpe supra mencionada, utiliza uma diversidade de compostos que incluem carboidratos e aminoácidos, ao passo que não metaboliza ácidos carboxílicos e o ácido oxálico (sendo a estirpe NOX responsável pelo metabolismo do oxalato e crescer em meio com ácidos carboxílicos); pode-se inferir acerca da ausência de resultados no crescimento da estirpe P-17, pelo facto de determinadas amostras de água não apresentarem os referidos compostos orgânicos. Ainda no que diz respeito aos resultados da ausência de colónias de P-17, podem existir elevadas concentrações de metais nas amostras testadas, especificamente alumínio e cobre, que por serem tóxicas para estes microrganismos, tornou este procedimento inadequado. Por outro lado, amostras de água que foram desinfetadas e que ainda apresentem um teor de cloro residual (mesmo previamente suplementadas com tiosulfato de sódio), pode também inibir o crescimento dos microrganismos teste. Da mesma forma, que águas superficiais tratadas com sulfato de cobre, podem ser inibidoras do crescimento de colónias de P-17, mesmo aquando adicionado um agente quelante. Outra justificação para a ausência de resultados de P-17 pode estar na razão de fraca homogeneização do inóculo, ou até mesmo outros erros no procedimento e técnica experimental que pusessem em causa a viabilidade das células.

É no entanto de reforçar a ideia de que, este método está sujeito a numerosas fontes de possíveis erros (preparação das diluições, marcação de placas, contagem, entre outras).

Pode-se também estar atento aos parâmetros do sistema de distribuição (SD) das águas analisadas, que podem afetar a presença/ausência de matéria orgânica como substrato das bactérias P-17, nomeadamente:

- Local – influência da distância do ponto da rede à Estação de Tratamento de água;
- Tubagem – influência do material das tubagens do SD;
- Movimento – influência das condições hidrodinâmicas (velocidade, caudal);
- Tempo de Residência – influência do tempo de permanência da água no SD;
- Efeitos Ambientais – influência da estação do ano e da temperatura.

Em certos ensaios realizados, verificaram-se contaminações por parte de leveduras aquando o plaqueamento em agar nutritivo. A razão para tal ter acontecido, pode estar na utilização de uma estufa comum (60°C- 1hora) para tratamento das tampas dos frascos e secagem de pontas de pipetas, dado que todo o procedimento experimental foi realizado em condições de assepsia na câmara de segurança biológica.

Para facilitar a discussão e simplificar a sua compreensão, os resultados obtidos foram compilados, na seguinte tabela.

Tabela XXXIII. Determinação de AOC – Amostras Algarve (*- Sem crescimento de P-17)

Sub-Região	Concelho	Ponto de recolha	AOC ($\mu\text{g} / \text{L}$)	
Barlavento	Lagos	Bensafrim	73 *	
			130	
			110	
			60 *	
		Colinas Verdes	88 *	
				58 *
				66 *
	Albufeira	Pinhal de Albufeira	281 *	
		Bemparece	381	
	Sotavento	Faro	Pé de Outeiro	267 *
270 *				
277 *				
Loulé		Fonte de Pipa	307 *	
			284 *	
			367	
			260 *	
Olhão		Brancanes	301	
			283	
			251 *	

O cálculo do AOC depende das unidades formadoras de colónias (contagem de células), anteriormente apresentadas, e por se um método sensível a pequenas variações nos níveis de matéria orgânica, afeta portanto a coerência dos resultados.

Na sua maioria, estes resultados estão portanto relacionados com o crescimento dos organismos teste em soluções puras de acetato (P-17) e oxalato (NOX), por meio de valores de rendimento empíricos e o resultado foi apresentado como equivalentes de C-acetato. No entanto, os

resultados marcados com asterisco representam aqueles onde não se registou qualquer crescimento da estirpe P-17.

O significado destes resultados é duvidoso, contudo, é conhecido que a maioria do AOC determinado em amostras de água, segundo vários estudos, deve-se ao crescimento apenas da estirpe NOX.

A concentração de AOC pode ser considerada como uma medida da estabilidade biológica da água para o crescimento heterotrófico.

Uma água é considerada estável em termos biológicos quando apresenta valores entre 10 e 50 µg de AOC/L (Kaplan, *et al*, 1993).

A presença de carbono orgânico assimilável (AOC) em níveis elevados, juntamente com o tipo de material do sistema de tubagens interferem no potencial da água em distribuição.

O número de amostras analisadas são representativas de parte do sistema de distribuição de água do Algarve (Barlavento e Sotavento), e estas apresentaram valores de AOC acima do referido. Pode-se assim concluir que a água distribuída através destes sistemas não apresenta estabilidade biológica, conforme os resultados destes ensaios. Como tal, pode-se inferir que existe potencial e condições para o desenvolvimento de microrganismos na água.

Por outro lado, é também conhecido que, são vários os estudos que relacionam o AOC diretamente com o recrescimento microbiano e com a formação de biofilmes nos sistemas de distribuição da água de consumo, pelo que se pode também referenciar que há a possibilidade da presença de biofilmes nas tubagens destas redes de abastecimento estudadas.

Os tratamentos a que a água é sujeita afetam a composição de compostos orgânicos presentes na mesma, e deste modo, a concentração de AOC presente nesta.

É de notar, que as amostras da sub-região do Sotavento apresentaram valores de concentração de AOC coerente entre si na gama dos 200-300 µg /L. Destaca-se aqui o facto da estação de

tratamento de águas (ETA) de Tavira ser comum a estes pontos de distribuição do Sotavento estudados.

A nível da região do Barlavento, os resultados já não se mostram tão concludentes. Contudo, podemos observar duas ETAs distintas nesta sub-região responsáveis pelo tratamento das águas estudadas: ETA das Fontainhas e ETA de Alcantarilha.

A ETA das Fontainhas trata a água de Colinas Verdes e Bensafrim, ao passo as águas de Pinhal de Albufeira e Bemparece são tratadas na ETA de Alcantarilha. Aqui pode estar a razão da diferença de resultados de concentração de AOC na sub-região do Barlavento, para além das próprias localizações geográficas que influenciam a qualidade da água.

Os pontos de entrega de Bensafrim e Colinas Verdes são notoriamente localizados mais a barlavento, e por sua vez mais afastados de qualquer outro ponto de abastecimento estudado. Como tal, pode estar aí a razão para os valores de AOC se apresentarem evidentemente mais baixos.

A generalidade dos ensaios em branco das amostras testadas, exceto o da amostra de Fonte de Pipa apresentou crescimento microbiano.

Tabela XXXIV. Resultados Ensaio em Branco.

Amostra	Crescimento microbiano
Bensafrim	+
Colinas Verdes	+
Pinhal de Albufeira	+
Bemparece	+
Pé de Outeiro	+
Fonte de Pipa	-
Brancanes	+

Uma vez que este controlo era constituído por água isenta de carbono (mili-Q), suplementada com tiosulfato de sódio e soluções de sais minerais, sem existir desta forma qualquer fonte de carbono, não deveria ser notável qualquer crescimento celular. Este facto pode ser justificado por contaminação do material ou da própria água mili-Q utilizada. Posto isto, seria então necessário efetuar um estudo mais direcionado para perceber a causa do crescimento celular observado obtidos nos ensaios em branco.

5. Conclusões e Perspetivas Futuras

É possível concluir com este estudo, que o método de determinação do carbono orgânico assimilável é de facto um método útil para avaliar a estabilidade da água, apesar de constituir um procedimento moroso e trabalhoso. Porém, esta técnica apesar de morosa é de extrema importância, uma vez que prevê o consumo real de carbono (existente no meio) pelas bactérias.

Este método estudado está sujeito a numerosas fontes de possíveis erros e requer, além de um longo tempo de ensaio, um trabalho intensivo de plaqueamento em meio de crescimento e contagem, fornecendo uma informação limitada, devido ao uso de culturas puras selecionadas para medir uma estrutura complexa de compostos de carbono biodisponíveis.

Os melhoramentos efetuados na técnica poderão permitir a sua implementação (pela AdA), contudo carece de aperfeiçoamentos e controlo a níveis técnicos.

A implementação da técnica em causa torna-se mais viável economicamente, assim como ao nível do tempo despendido na realização do método e na contagem de colónias, atendendo às alterações sugeridas, que permitem: rentabilizar o tempo, menor consumo de material, melhorar a fidelidade dos resultados. No entanto, seria fundamental a execução de mais ensaios a fim de consolidar resultados.

Uma água é considerada estável em termos biológicos quando apresenta valores entre 10 e 50 µg de AOC/L.

Todas as amostras analisadas, representativas de parte do sistema de distribuição de água do Algarve (Barlavento e Sotavento), apresentaram valores de AOC acima do referido. É possível assim concluir que a água distribuída através deste sistema, segundo os resultados deste estudo, não apresenta estabilidade biológica, conferindo potencial e condições para o desenvolvimento de microrganismos na água.

O método descrito nestes ensaios poderia ser sujeito a estudos de optimização, no âmbito da diminuição dos tempos de incubação ou aumento da temperatura de incubação, ou até através do aumento da densidade celular do inóculo, como descrito por alguns autores. Poder-se-ia também considerar a hipótese de utilizar uma comunidade microbiana em substituição das estirpes puras, de modo a se considerar uma maior gama de compostos orgânicos de AOC.

6. Referências Bibliográficas

- Assunção, Ana; “Técnica do Carbono Orgânico Assimilável”; Projecto Bromato 10, Universidade do Algarve, Janeiro 2011.
- B., J. X., *et al.*, Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes. *In*: <http://dequim.ist.utl.pt/bbio/76/pdf/biofilmes.pdf>
- Beleza, J. M. B. B. 2005. “ Simulação das concentrações de cloro residual e trihalometanos em redes de distribuição de água para consumo humano”- Tese de Mestrado, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Departamento de Engenharia Química.
- Carter, G., *et al.* (2003). Characterization of biofilm formation by clinical isolates of *Mycobacterim avium*, *Journal of Medical Microbiology* 52: 747-752 *Disinfection By-Products and Microbial Contaminants in Drinking Water*. Edited by Robert M. Clark and Brenda K. Boutin. National Risk Management Research Laboratory Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency. Washington. EUA.
- Drinking Water Treatment. *In*: http://www.waterquality.crc.org.au/DWFACTS/DWFact_Treatment_Water.pdf
- Eaton, A.D, *et al.*, *Standard Methods: For the examination of water & wastewater*, 21st Edition, Centennial Edition, 2005
- Greenberg, A. E.; Clesceri, L. S.; Eaton, A. D.; “Standard Methods – For the Examination of water and wastewater”, 2005.
- Hart, Frederick L.; Wheeler, Wayne A.; Daly, William J. (1992). Chlorine Residual Distribution in a Municipal Water Network Presented at the NEWWA Computer Symposium. Worcester. EUA.
- *Journal of American Water Work Association*, 74: 540-559.
- Kaplan, L. A.; Bott, T. L.; Reasoner, D. J. (1993). Evaluation and Simplification of the Assimilable Organic Carbon Nutrient Bioassay for Bacteria Growth in Drinking Water. *Applied Environmental Microbiology*, 59: 1532-1539.

- LeChevallier, M. W.; Badcock, T. M.; Lee, R. G. (1987). Examination and Characterization of Distribution System Biofilms. *Applied Environmental Microbiology*, 53: 2714-2724.
- Meckes, M. (2001). Biofilms in Drinking Water Distribution Systems, in, *Controlling*
- Miguel, A. F.; “Aplicação da técnica de PCR na pesquisa de bactérias patogénicas em biofilmes de condutas e reservatórios de água do sistema de distribuição da EPAL” – Tese de Mestrado, Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa, 2007.
- Miles, A.A & Misra, S. S. 1938. “Milles & Misra Method”; *Journal Hygiene*, Vol. 38, pp. 732, 1938.
- Momba, M.; Kfir, R.; Venter, S.; Cloete, T. (2000). An overview of biofilm formation in distribution systems and its impact on the deterioration of water quality. *Water SA*, 26, 1, 59-66.
- Pedley, S., *et al.* (2004). Pathogens: Health relevance, transport and attenuation. *In* *Protecting Groundwater for Health: Managing the Quality of Drinking-water Sources*, World Health Organization
- Rocha, V. S.; “Determinação de carbono orgânico assimilável em amostras de água - Estudo de comparação do método de determinação da concentração de ATP com o método clássico de contagem de colónias” – Tese de Mestrado, Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa, 2007.
- Sibille, I. (1998). Stabilité biologique des réseaux de distribution d’eaux potable. *Année Biologique*, 78, 117-161
- Schwartz, T., Hoffmann, S., Obst, U. (2003). Formation of natural biofilms during chlorine dioxide and u.v. disinfection in a public drinking water distribution system, *Journal of Applied Microbiology* 95: 591-601
- Tebbutt, T.H.Y. (1973). *Water Science and Technology*. 1st Edition. John Murray, London.
- Van der Kooij, D. (1982). Determining the Concentration of Easily Organic Carbon in Drinking Water.
- Van der Kooij, D. (1992). Assimilable Organic Carbon as an Indicator of Bacterial Regrowth. *Research & Technology*: 57-65.

- Van der Kooij, D.; Hijnen, W. (1984). "Substrate Utilization by an Oxalate-Consuming Spirillum Species in Relation to Its Growth in Ozonated Water", Applied and Environmental Microbiology, Vol.47 (3), pp. 551-559.
- Vieira, Paula Alexandra (2002). "Decaimento do Cloro em Sistemas de Distribuição
- Wastewater Engineering (2003) – Treatment and reuse", Metcalf & Eddy Inc., 4th ed. Rev. por Tchobanoglous, G; Burton, F.L. e Stensel, H.D., McGraw-Hill, USA.
- World Health Organization. Guidelines for Drinking Water Quality: Recommendations, Geneva, Volume 1, Third Edition.
- <http://www.aquasdoalgarve.pt>