

**INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA**

**Área Departamental de Engenharia Química**



## **Caracterização Microbiológica de Amostras no Âmbito da Monitorização de Águas Balneares**

**ALCINA DA GRAÇA LEONARDO**

(Licenciada em Engenharia de Recursos Naturais e Ambiente)

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do  
Grau de Mestre em Engenharia da Qualidade e Ambiente

Orientadores:

Doutora Maria Teresa Loureiro dos Santos (ISEL)  
Dr.<sup>a</sup> Maria Ana Cunha (APA, IP)

Júri:

Presidente: Doutor João Miguel Alves da Silva  
Vogais: Doutor Teodoro José Pereira Trindade  
Doutora Maria Teresa Loureiro dos Santos

**Maio 2019**



**INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA**

**Área Departamental de Engenharia Química**



## **Caracterização Microbiológica de Amostras no Âmbito da Monitorização de Águas Balneares**

**ALCINA DA GRAÇA LEONARDO**

(Licenciada em Engenharia de Recursos Naturais e Ambiente)

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do  
Grau de Mestre em Engenharia da Qualidade e Ambiente

Orientadores:

Doutora Maria Teresa Loureiro dos Santos (ISEL)  
Dr.<sup>a</sup> Maria Ana Cunha (APA)

Júri:

Presidente: Doutor João Miguel Alves da Silva  
Vogais: Doutor Teodoro José Pereira Trindade  
Doutora Maria Teresa Loureiro dos Santos

**Maio 2019**



## **DEDICATÓRIA**

*Dedico este trabalho a Deus, por ser essencial em minha vida, autor de meu destino, meu guia, socorro presente na hora da angústia, o Teu amor cobriu as minhas fraquezas e a Tua fidelidade foi maior do que todos os obstáculos passados neste trabalho... Obrigado meu Deus!*



## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por toda a intervenção que tem tido na minha vida, pela protecção no percurso, a minha completa gratidão.

Agradeço as minhas orientadoras, Dr.<sup>a</sup> Maria Ana Cunha (Coordenadora do Setor de Biologia do Laboratório de Referência do Ambiente da APA, IP) gostaria de agradecer todo o apoio e toda a disponibilidade prestada durante a realização do Estágio o meu muito obrigada, Doutora Maria Teresa L. Santos (ISEL), pela disponibilidade, paciência, e acima de tudo, pelo empenho e competência com que desempenhou o papel.

À Dr.<sup>a</sup>. Vanda Cristina Madeira Alves Reis, gostaria de agradecer a oportunidade que me foi concedida de realizar o Estágio numa organização prestigiada e de grande dimensão como (APA, IP), muito obriga da pela oportunidade.

Devo ainda um sentido agradecimento ao colectivo dos professores do Instituto Superior de Engenharia de Lisboa (ISEL) e ao colectivo do Agência Portuguesa do Ambiente (APA, IP) pelo apoio e pela paciência. A todos o meu muito obrigada.

À minha família, sem a qual, em nenhuma circunstância este momento seria possível, com especial destaque para os meus pais, Alberto Leonardo e Lurdes Miraiame Luciano Leonardo, obrigada pelo apoio moral, amor e amizade de que sempre fui alvo. Aos meus irmãos (José, Alice, Lisdália, Cláudia, Ednilsa, Nailda e Daiandra Leonardo), a minha gratidão pelo facto de terem estado sempre a meu lado, ao longo desta caminhada.

Ao Sr. Abel Paulo, agradeço pelo apoio constante e por ter compreendido as minhas ausências.

Aos meus colegas Milena Francisco, Cátia Lucas, Hans Queta, Patrick Gaspar, às minhas amigas Carla Agta, Gabriela Francisco, Patrícia Maposso, Eliane Amaral que comigo dividiram tantas emoções, que não me permitiram recuar nos momentos de fraqueza com palavras de incansável incentivo, a minha gratidão.

A muitos eu devo agradecimento pelo que sou e pelo que alcancei. A todos estou grata por terem feito parte desta história que é a minha.



## RESUMO

A monitorização da qualidade das águas balneares reveste-se de extrema importância, pois permite identificar e qualificar as praias com qualidade para banhos, fornecer informações ao público sobre a qualidade da água, em cada zona, protegendo assim a saúde pública.

Este trabalho tem como objectivo caracterizar e avaliar a qualidade das águas balneares, costeiras e interiores, através da análise de parâmetros microbiológicos, nomeadamente bactérias *Escherichia coli* e Enterococos intestinais, pelo método de microplacas, realizando-se, ainda a comparação de três métodos de análise: Filtração por Membrana, Microplacas e Colilert/Enterolert.

As quarenta amostras de águas balneares utilizadas neste trabalho foram colhidas nos concelhos de Almada, Cascais, Oeiras, Mafra, Sesimbra e Sintra procedendo-se à detecção e quantificação das bactérias *Escherichia coli* e Enterococos intestinais. A monitorização da qualidade da água foi realizada durante a época balnear com uma frequência definida nos planos de monitorização elaborados anualmente, permitindo uma gestão eficiente do ambiente que nos rodeia e dos seus recursos, bem como a salvaguarda da saúde pública.

Através da análise dos resultados obtidos, foi possível concluir que os parâmetros *Escherichia coli* e Enterococos intestinais na maioria das amostras de águas balneares analisadas está abaixo dos valores da norma de qualidade para a classificação de qualidade Excelente, Boa ou Aceitável (Anexo I do Decreto-Lei n.º 113/2012).

**Palavras chaves:** Águas balneares, *Escherichia coli* e Enterococos intestinais, qualidade da água.



## **ABSTRACT**

Monitoring of bathing waters is of extreme importance because it allows the identification and qualification of beaches suitable for bathing, giving qualified information on bathing waters to the public in each zone and thus protecting public health.

This dissertation aims at evaluating and characterizing coast and interior bathing waters quality through the analysis of microbiological parameters, namely bacteria *Escherichia coli* and Intestinal *Enterococci*, using the microplate method and by the comparison of three methods of analysis: Membrane Filtration, Microplates and Colilert/Enterolert.

The forty bathing water samples were collected in Almada, Cascais, Oeiras, Mafra, Sesimbra and Sintra municipalities for the detection and quantification of *Escherichia coli* and Intestinal *Enterococci*. The monitoring of water quality is accomplished in accordance with monitoring plans elaborated yearly allowing an efficient management of the natural environment and its resources, protecting public health.

From the analysis of the obtained results, it was possible that tests of *Escherichia coli* and intestinal Enterococci in the majority of analyzed water samples are below the quality values for an Excellent, Good or Acceptable quality classification (Annex I of the Decree No. 113/2012).

**Key words:** Bathing waters, *Escherichia coli* and Intestinal *Enterococci*, water quality.

**ÍNDICE GERAL**

ÍNDICE DE FIGURAS .....	XII
ÍNDICE DE TABELAS .....	XVI
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS .....	XVIII
1 INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Enquadramento do tema.....	1
1.2 Local do estágio.....	4
1.3 Objectivos.....	4
1.4 Estrutura do trabalho.....	5
2 ENQUADRAMENTO LEGISLATIVO .....	7
3 ÁGUAS BALNEARES.....	11
3.1 Parâmetros de avaliação de qualidade das águas balneares .....	11
3.1.1 <i>Escherichia coli</i> .....	12
3.1.2 Enterococos intestinais.....	12
3.2 Monitorização da qualidade das águas balneares .....	12
3.2.1 Perfis de águas balneares .....	13
3.3 Potenciais fontes de poluição das águas balneares .....	15
3.3.1 Poluição de curta duração .....	15
3.3.2 Poluição decorrente de situações anormais .....	15
3.3.3 Poluição difusa .....	16
3.3.4 Poluição pontual .....	16
3.4 Qualidade das águas balneares na Europa .....	17
3.5 Qualidade das águas balneares em Portugal .....	19
3.6 Bandeira Azul.....	21
3.6.1 Condições para atribuição da Bandeira Azul .....	21
3.6.2 Locais galardoados .....	22
4 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO .....	25
4.1 Localização da área de amostragem .....	25
4.2 Águas balneares monitorizadas .....	25
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
5.1 Meios de cultura e soluções de diluição .....	29
5.1.1 Material de laboratório.....	31
5.1.2 Equipamentos .....	32
5.2 Metodologia.....	34
5.2.1 Amostragem .....	34

5.2.2	Recolha de amostras de águas balneares.....	35
5.2.3	Medição da temperatura no local de amostragem .....	37
5.2.4	Recepção das amostras .....	37
5.3	Parte experimental .....	38
5.3.1	Esterilização dos materiais e meios de cultura.....	38
5.3.2	Preparação dos meios de cultura .....	38
5.3.3	Controlo da qualidade do pH.....	39
5.4	Pesquisa e quantificação de <i>Escherichia coli</i> e Enterococos intestinais pelo método de Microplacas .....	40
5.4.1	Descrição do método de Microplacas .....	40
5.4.2	Diluições .....	41
5.4.3	Inoculação e incubação das microplacas .....	41
5.4.4	Leitura e determinação dos resultados.....	41
5.5	Pesquisa e quantificação de <i>Escherichia coli</i> pelo método de Colilert .....	42
5.6	Pesquisa e quantificação de Enterococos intestinais pelo método Enterolert ..	44
5.7	Pesquisa e quantificação da bactéria Enterococos intestinais, pelo método de Filtração por Membrana .....	46
5.8	Pesquisa e quantificação da bactéria de <i>E. coli</i> , pelo método de Filtração por Membrana.....	48
5.9	Controlo da qualidade interno e limpeza e higiene das salas de trabalho.....	50
5.9.1	Controlo da qualidade dos Meios de cultura, soluções de diluição, reagentes e águas utilizadas na sua preparação.....	50
5.9.2	Controlo ambiental .....	50
5.10	Controlo de qualidade para os métodos analíticos quantitativos.....	51
5.10.1	Análise dos brancos .....	51
5.10.2	Análise dos duplicados .....	52
5.10.3	Cartas de controlo .....	53
5.11	Controlo de qualidade analítico para métodos miniaturizados.....	53
5.11.1	Ensaio em paralelo .....	54
5.11.2	Controlo de qualidade externo / Ensaios interlaboratoriais .....	54
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	55
6.1	Resultado das análises microbiológicas de Cascais.....	55
6.2	Resultado das análises microbiológicas de Mafra .....	57
6.3	Resultado das análises microbiológicas do conselho de Sintra.....	58
6.4	Resultado das análises microbiológicas de Oeiras .....	59
6.5	Resultado das análises microbiológicas de Almada .....	61
6.6	Resultado das análises microbiológicas do conselho de Sesimbra.....	62
6.7	Resultado das Análise da comparação dos três métodos .....	62

6.8	Controlo da qualidade para os métodos analíticos quantitativos.....	64
6.8.1	Resultados da análise dos brancos .....	64
6.8.2	Resultado da análise dos critérios de precisão dos duplicados de 2017 ...	64
6.8.3	Resultado da análise de duplicados de rotina de 2018.....	66
6.9	Resultado do Controlo da qualidade externo .....	67
7	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS .....	69
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	73
	ANEXOS.....	78
	Anexo I - Protocolo de estágio entre a APA e o ISEL.....	78
	Anexo II - Publicações do trabalho.....	81
	Anexo III - Símbolos de informação sobre a qualidade anual para cada água balneares.....	83
	Anexo IV - Perfil de água balnear da Fonte da Telha.....	84
	Anexo V - Registos de Resultados das Análises Microbiológica.....	91



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Exemplo de perfil de água balnear da Fonte da Telha.....	14
Figura 2 - Resultados da qualidade das águas balneares para cada país, na época balnear 2017.....	18
Figura 3 - Classificação das águas balneares obtida em 2017.....	20
Figura 4 - Evolução da qualidade das águas balneares costeiras e de transição .....	20
Figura 5 - Evolução da qualidade das águas balneares interiores .....	21
Figura 6 - Evolução dos locais galardoados de 1987 a 2017 .....	22
Figura 7 - Mapa da zona de estudo envolvente .....	25
Figura 8 - Doseador com água MilliQ .....	30
Figura 9 - Meio cultura DSM .....	30
Figura 10 - Embalagem de Colilert.....	30
Figura 11 - Embalagem de Enterolert .....	30
Figura 12 - Frascos de plástico de 500 ml esterilizado .....	31
Figura 13 - Caixa térmica para o transporte das amostras .....	31
Figura 14 - Frascos arrumados na Caixa térmica para recolha das amostras.....	32
Figura 15 - Microplaca.....	32
Figura 16 - Micropipetas mono e multicanal .....	33
Figura 17 - Agitadores do tipo “Vortex .....	33
Figura 18 - Balança analítica .....	33
Figura 19 - Equipamento de água MilliQ.....	33
Figura 20 - Rampa de filtração .....	33
Figura 21 - Estufas de incubação com termóstato regulável a $44\pm 0,5$ °C.....	33
Figura 22 - Seladora de Quanti-Tray .....	34
Figura 23 - Câmara de observação com lâmpada UV .....	34
Figura 24 - Recolha directa de amostras de águas balneares. ....	36
Figura 25 - Recolha indirecta de amostras de águas balneares .....	36
Figura 26 - Medida de temperatura inicial no local de colheita .....	37
Figura 27 - Medida da temperatura para verificação das condições de refrigeração das amostras.....	38
Figura 28 - DSM preparados e identificados.....	39
Figura 29 - Esterilização dos meios de cultura.....	39
Figura 30 - Fluxograma de execução do método das Microplacas. ....	40
Figura 31 - Microplacas de <i>Escherichia coli</i> e Enterococos.....	42

Figura 32 - Microplaca na câmara UV.....	42
Figura 33 - Fluxograma da execução pelo método de COLILERT.....	43
Figura 34 - Poços com coloração amarela .....	44
Figura 35 - Poços com fluorescência .....	44
Figura 36 - Fluxograma da execução pelo método de Enterolert.....	45
Figura 37 - Comparador Quanti-Tray .....	46
Figura 38 - Enterolert, tabuleiro de substrato definido para Enterococos, após incubação .....	46
Figura 39 - Fluxograma Execução pelo método Filtração por Membrana de Enterococos <i>intestinais</i> .....	47
Figura 40 - Placa com colónias típicas de cor vermelha .....	47
Figura 41 - Placa com os pontos marcados das colónias típicas de cor vermelha, contadas.....	47
Figura 42 - Placa com colónias típicas confirmadas.....	47
Figura 43 - Placa da membrana no meio filtrante e placa com contagem do meio filtrante .....	48
Figura 44 - Tubos de ensaio com Fluorocult.....	49
Figura 45 -Tubos de ensaio que passaram para coloração amarela. ....	49
Figura 46 - Resultados das análises de <i>Escherichia coli</i> das amostras do conselho de Cascais.....	56
Figura 47 - Resultados das análises de Enterococos intestinais das amostras do conselho de Cascais.....	56
Figura 48 - Resultados das análises de <i>Escherichia coli</i> das amostras do concelho de Mafra. ....	57
Figura 49 - Resultados das análises de <i>Enterococos</i> intestinais das amostras do concelho de Mafra .....	57
Figura 50 - Resultados das análises de <i>Escherichia coli</i> das amostras do concelho de Sintra .....	58
Figura 51 - Resultados das análises de Enterococos intestinais das amostras do concelho de Sintra.....	59
Figura 52 - Resultados das análises de <i>Escherichia coli</i> das amostras do concelho de Oeiras .....	60
Figura 53 - Resultados das análises de Enterococos intestinais das amostras do concelho de Oeiras.....	60

Figura 54 - Resultados das análises de <i>Escherichia coli</i> das amostras do concelho de Almada .....	61
Figura 55 - Resultados das análises de Enterococos intestinais das amostras do concelho de Almada.....	61
Figura 56 - Resultado da comparação dos três métodos .....	63
Figura 57 - Resultados do CP para <i>E. coli</i> .....	65
Figura 58 - Resultados do CP para Enterococos .....	65
Figura 59 - Carta de controlo de duplicados de amostras de 2017 para <i>Escherichia Coli</i> .....	65
Figura 60 - Carta de controlo de duplicados de amostras de 2017 de Enterococos intestinais.....	65
Figura 61 - Carta de controlo dos duplicados de amostras de 2018 de <i>E. coli</i> .....	66
Figura 62 - Carta de controlo dos duplicados de amostras de 2018 de Enterococos intestinais.....	66



## **ÍNDICE DE TABELAS**

Tabela 1 - Norma de Qualidade - Águas interiores (Decreto-Lei nº 113/2012).....	7
Tabela 2 - Norma de Qualidade - Águas costeiras e de transição (Decreto-Lei nº 113/2012) .....	7
Tabela 3 - Águas balneares monitorizadas neste trabalho .....	26
Tabela 4 - Resumo das técnicas de conservação das amostras para a determinação dos parâmetros microbiológicos .....	35
Tabela 5 - Descrição das diluições para águas balneares.....	41
Tabela 6 - Critérios de aceitação para o controlo ambiental .....	51
Tabela 7 - Resultado da comparação dos três métodos .....	63
Tabela 8 - Resultados do ensaio interlaboratorial.....	67



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AB	Águas Balneares
ABAE	Associação Bandeira Azul da Europa
APA	Agência Portuguesa do Ambiente
CT	Coliformes Totais
CP	Critérios de Precisão
DL	Decreto-Lei
DSM	Diluyente Especial para Microplacas
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EI	Enterococos Intestinais
EU	União Europeia
LRA	Laboratório de Referência do Ambiente
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
LC	Limite Central
LIC	Limite Inferior de Controlo
LSC	Limite Superior de Controlo
MRC	Material de Referência Certificado
NMP	Número Mais Provável
P	Plástico
SC	Sem Classificação
TFM	Trabalho Final do Mestrado
ufc	Unidade Formadora de Colónia
UV	Ultravioleta
V	Vidro

## CAPÍTULO 1

### 1 INTRODUÇÃO

#### 1.1 Enquadramento do tema

Algumas das mais bonitas e acolhedoras praias do mundo encontram-se em Portugal. A costa portuguesa estende-se por vários quilómetros e possui um número grande de praias de areia fina e branca que, combinadas com o clima mediterrânico, tornam as praias locais extrema beleza e irresistíveis. Assim, os banhos de mar são uma actividade recreativa realizada ao longo dos meses mais quentes (SNIRH, 2018), pelo que é pertinente assegurar, através da monitorização e gestão adequadas, a qualidade das águas balneares, de modo a minimizar os riscos para a saúde pública (Bedri *et al.*, 2016).

A qualidade das águas balneares é uma preocupação internacional crescente, tendo aumentado, nos últimos anos, a sensibilização do público para os impactos da má qualidade. A interdição de praias tem ocorrido com frequência, devido à não conformidade da qualidade da água com os padrões exigidos. É, portanto, cada vez mais um desafio equilibrar o descarte de águas residuais com outras actividades em águas estuarinas e costeiras (Bedri *et al.*, 2016).

Os espaços balneares podem ser definidos como um sistema multidimensional onde a relação entre subsistemas humanos e biofísicos é contínua, dinâmica e complexa, compostos pelo sistema costeiro, sistema sociocultural e sistema administrativo (Roca e Villares, 2008; James, 2000). Os espaços balneares oferecem um alargado leque de bens e serviços às comunidades e economias costeiras. Um desses serviços é a oportunidade de lazer, que providencia benefícios aos utilizadores (Blackwell, 2007).

De acordo com Artigo 2.º do Decreto-Lei n.º 113/2012, as águas balneares são definidas como “águas superficiais, quer sejam interiores, costeiras ou de transição, em que se preveja que um grande número de pessoas se banhe e onde a prática banhear não tenha sido interdita ou desaconselhada de modo permanente” (ou seja, pelo menos durante uma época banhear completa).

De acordo com a Lei nº 58/2005 entende-se por:

“Águas Costeiras: águas superficiais situadas entre terra e uma linha cujos pontos se encontram a uma distância de 1 milha náutica, na direcção do mar a partir do ponto mais

próximo da linha de base a partir da qual é medida a delimitação das águas territoriais, estendendo-se, quando aplicável, até ao limite exterior das águas de transição”.

“Águas de Transição: águas superficiais na proximidade das fozes dos rios, parcialmente salgadas em resultado da proximidade de águas costeiras, mas que são também significativamente influenciadas por cursos de águas doces”.

“Águas Interiores: todas as águas superficiais lênticas ou lóxicas (correntes) e todas as águas subterrâneas que se encontram do lado terrestre da linha de base a partir da qual são marcadas as águas territoriais”.

A época balnear em Portugal ocorre predominantemente nos meses mais quentes (julho, agosto e setembro), no entanto a sua duração é distinta a nível nacional, dependendo das condições climáticas, das características geofísicas e dos interesses sociais e/ou ambientais de cada localização da água balnear (APA, 2018).

Apesar dos consideráveis investimentos em infraestruturas de tratamento de águas residuais em zonas urbanas costeiras, realizados por todo o mundo nas últimas décadas (Crowther *et al.*, 2001; Kay *et al.*, 2005), algumas águas de zonas balneares continuam a apresentar, com alguma frequência, valores de concentração microbiológica superiores aos valores paramétricos impostos legalmente (Bordalo, 2003). Entretanto, a qualidade da água não depende apenas de condições naturais. A acção antrópica interfere qualitativa e quantitativamente, à medida que afecta as características químicas, físicas e biológicas dos sistemas hídricos (Pinto *et al.*, 2009).

As descargas de águas residuais domésticas e industriais, em águas balneares tanto costeiras como interiores, determinaram a necessidade de uma monitorização de indicadores microbiológicos de contaminação fecal de forma a controlar a qualidade dessas mesmas águas de uso recreativo. Estes planos de monitorização baseiam-se, sobretudo, na análise dos valores numéricos de análises periódicas da qualidade microbiológica das águas balneares, com a qual nem sempre é possível antever ou agir atempadamente, de forma a evitar o contacto dos banhistas com águas contaminadas (Leecaster e Weisberg, 2001).

A monitorização da qualidade da água pode ser considerada como um dos pré-requisitos para o sucesso de qualquer sistema de gestão das águas, já que a monitorização possibilita a obtenção de informações necessárias, a actualização dos bancos de dados e o

acompanhamento do processo de uso dos corpos hídricos, apresentando os efeitos sobre as características qualitativas das águas e visando subsidiar as acções de controlo ambiental (Carvalho *et al.*, 2015).

Deste modo, políticos e gestores necessitam de informação acerca dos valores associados à utilização da orla costeira, de modo a tomar decisões de gestão e políticas que afectam a qualidade do recreio destes espaços (Lew e Larson, 2005).

De acordo com o Decreto-Lei nº 135/2009 de 3 de Junho, alterado pelo Decreto-Lei nº 113/2012 de 23 de Maio procede-se à pesquisa e quantificação de *Escherichia coli* e de Enterococos intestinais, segundo o Decreto-Lei 135/2009 de 3 de Junho. A avaliação da qualidade das águas balneares é feita com base nos programas de monitorização que são elaborados anualmente.

Os valores referentes à norma de qualidade para a classificação das águas balneares constantes do Decreto-Lei nº 135/2009 de 3 de Junho, alterado pelo Decreto-Lei nº 113/2012 de 23 de Maio encontram-se descritos na Tabela 1, para as águas balneares costeiras e de transição, e na Tabela 2 para as águas interiores.

Desta forma, a monitorização da qualidade da água pode ser considerada como um dos pré-requisitos para o sucesso de qualquer sistema de gestão das águas, já que a monitorização possibilita a obtenção de informações necessárias, a actualização dos bancos de dados e o acompanhamento do processo de uso dos corpos hídricos, apresentando os efeitos sobre as características qualitativas das águas e visando subsidiar as acções de controlo ambiental (Carvalho *et al.*, 2015).

Os riscos para a saúde associados às zonas balneares podem estar relacionados com: calor, frio, radiação solar, acidentes (afogamento e lesões), qualidade microbiológica da água de banho, algas e cianobactérias, organismos aquáticos perigosos; qualidade da areia; questões estéticas (WHO, 2011).

A qualidade ambiental das praias tem vindo a adquirir importância crescente entre os critérios de escolha de destino turístico. Os requisitos necessários para garantir, em segurança, a utilização das águas identificadas como balneares passa não só pelos acessos, infraestruturas e segurança das praias, mas também pela qualidade das águas balneares.

A qualidade das águas balneares representa, assim, não só um factor de saúde como também um importante indicador de qualidade ambiental e de desenvolvimento turístico.

Neste contexto, com o presente trabalho pretende-se caracterizar e avaliar a qualidade das águas balneares, costeiras e interiores, através da análise dos parâmetros microbiológicos com o objectivo de monitorizar o real estado da qualidade da água, visto que o fluxo da actividade banhar na região é bastante forte, logo a necessidade de se garantir a qualidade da mesma é fundamental.

## **1.2 Local do estágio**

O presente trabalho final de mestrado (TFM) foi realizado na Agência Portuguesa do Ambiente, IP (APA) ao abrigo do protocolo de estágio entre a APA e o ISEL (Anexo I). A fusão de nove organismos deu origem à APA em 2012, tendo principalmente como missão a gestão integrada das políticas ambientais.

A APA é a principal entidade em matéria do ambiente em Portugal, contando com cerca de 700 colaboradores e integra cinco Administrações Regionais Hidrográficas (ARH-Alentejo, ARH-Algarve, ARH-Centro, ARH-Norte, ARH-Tejo), sendo dotada de um Laboratório de Referência do Ambiente (LRA). O LRA situa-se em Lisboa e é composto por cinco sectores: Metais; Química Geral; Biologia/Microbiologia; Qualidade do Ar; Química Orgânica.

Os serviços prestados pelo LRA são reconhecidos pela sua independência, credibilidade e flexibilidade e pelo facto de serem executados por técnicos especialistas com ampla experiência nas diferentes áreas de atuação. Atualmente, o Laboratório encontra-se acreditado para 30 métodos, o que corresponde a 75 parâmetros, em várias matrizes ambientais (ex. águas, águas residuais, lamas e sedimentos).

## **1.3 Objectivos**

O presente TFM tem como objetivo caracterizar e avaliar a qualidade das águas balneares costeiras, de transição e interiores - através da análise dos parâmetros microbiológicos.

Assim os objectivos específicos são:

- Realização de ensaios com recurso a metodologias implementadas para caracterização microbiológica das amostras de águas balneares;
- Comparação e validação de métodos de análise;
- Controlo da qualidade dos resultados.

O presente trabalho foi desenvolvido de Abril de 2018 a Março de 2019. Os parâmetros estudados *Escherichia coli* e Enterococos intestinais, foram determinados por métodos microbiológicos no de laboratório de referência da Agência Portuguesa do Ambiente, no sector de Biologia/Microbiologia.

#### **1.4 Estrutura do trabalho**

Para cumprir os objetivos propostos o TFM é constituído por sete capítulos, sendo os mesmos descritos seguidamente:

CAPÍTULO I. Introdução - O primeiro capítulo é introdutório, onde se expõem o enquadramento do tema, objetivos e estrutura do trabalho.

CAPÍTULO II. Enquadramento Legislativo – É o capítulo, onde se expõe a legislação aplicável.

CAPÍTULO III. Águas balneares – No terceiro capítulo, são descritos parâmetros de avaliação de qualidade das águas balneares, monitorização da qualidade das águas balneares, potenciais fontes de poluição, qualidades das águas balneares na Europa e Portugal, evolução das águas balneares e locais galardoados. Neste capítulo procedeu-se à análise de trabalhos científicos, relatórios, e livros técnicos, para entendimento e comparação dos resultados obtidos nesta investigação.

CAPÍTULO IV. Materiais e Métodos - No capítulo são descritos os materiais e métodos analíticos utilizados para pesquisa e quantificação de Enterococos intestinais e de *Escherichia coli*.

CAPÍTULO V. Resultados e Discussão – O capítulo inclui a apresentação, análise e discussão dos resultados obtidos nas análises.

CAPÍTULO VI. Conclusões - No capítulo são apresentadas as conclusões e apontadas algumas possíveis linhas de pesquisa.

CAPÍTULO VII. Referências Bibliográficas - No capítulo apresenta-se diversas referências, como artigos, teses e documentos legais.

Por último, apresentam-se os anexos ao trabalho.

O presente trabalho deu origem a duas comunicações em painel, apresentadas no Fórum de Engenharia Química e Biológica 2018, decorrido nos dias 8, 9 e 10 de maio de 2018,

no ISEL e no 18.º Encontro de Engenharia Sanitária e Ambiental (ENASB) e o 18.º Simpósio Luso-Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental (SILUBESA), realizado de 10 a 12 de Outubro 2018, na Fundação Dr. Cupertino de Miranda, no Porto (Anexo II).

## CAPÍTULO 2

## 2 ENQUADRAMENTO LEGISLATIVO

Nos últimos anos, os padrões de utilização das águas balneares mudaram e os conhecimentos científicos e técnicos evoluíram, pelo que se tornou necessário repensar procedimentos ao nível da monitorização, classificação e gestão da qualidade das águas balneares bem como da informação que é disponibilizada ao público.

De acordo com o Decreto-Lei nº 135/2009 de 3 de Junho, alterado pelo Decreto-Lei nº 113/2012 de 23 de Maio procede-se à pesquisa e quantificação de *Escherichia coli* e *Enterococos intestinais*. A identificação e a avaliação da qualidade das águas balneares são feitas com base nos programas de monitorização que são realizados anualmente.

Os valores da Norma de Qualidade referentes às águas balneares estão descritos no Decreto-Lei nº 135/2009 de 3 de Junho, alterado pelo Decreto-Lei nº 113/2012 de 23 de Maio, na Tabela 1 para as águas interiores, e na Tabela 2 para as águas costeiras e de transição.

Tabela 1 - Norma de Qualidade - Águas interiores (Decreto-Lei nº 113/2012)

Parâmetro	Qualidade EXCELENTE	Qualidade BOA	Qualidade ACEITÁVEL	Métodos de análise de referência
<b>Enterococos intestinais (ufc / 100 ml)</b>	(*) 200	(*) 400	(**) 330	ISO 7899-1 (1998) ou ISO 7899-2 (2000)
<b><i>Escherichia coli</i> em (ufc / 100 ml)</b>	(*) 500	(*) 1 000	(**) 900	ISO 9308-3 (1998) ou ISO 9308-1 (2000)

Tabela 2 - Norma de Qualidade - Águas costeiras e de transição (Decreto-Lei nº 113/2012)

Parâmetro	Qualidade EXCELENTE	Qualidade BOA	Qualidade ACEITÁVEL	Métodos de análise de referência
<b>Enterococos intestinais (ufc / 100 ml)</b>	(*) 100	(*) 200	(**) 185	ISO 7899-1 (1998) ou ISO 7899-2 (2000)
<b><i>Escherichia coli</i> (ufc / 100 ml)</b>	(*) 250	(*) 500	(**) 500	ISO 9308-3 (1998) ou ISO 9308-1 (2000)

(\*) com base numa avaliação do percentil 95 da função densidade de probabilidade da distribuição log-normal de base 10.

(\*\*) com base numa avaliação do percentil 95 da função densidade de probabilidade da distribuição log-normal de base 10.

De acordo com o Decreto-Lei nº 135/2009 de 3 de Junho, alterado pelo Decreto-Lei nº 113/2012 de 23 de Maio, a época balnear para cada água balnear é fixada anualmente por Portaria pelo membro do Governo responsável pela área do Ambiente, até dia 1 de Março de cada ano. Na ausência de definição da época balnear de uma água balnear, a mesma decorre entre 1 de Junho e 30 de Setembro de cada ano.

No processo de avaliação e classificação das águas balneares, estas são designadas como Excelente, Boa, Aceitável ou Má, sendo as mesmas definidas de acordo com o Anexo III do Decreto-Lei nº 113/2012:

- *Excelente Qualidade* – “as águas balneares são classificadas como excelentes se no conjunto de dados recolhidos sobre a qualidade das águas balneares para o último período de avaliação os valores de percentil para as contagens microbiológicas forem iguais ou melhores aos valores de “qualidade excelente”;
- *Boa Qualidade* – “as águas balneares são classificadas como boas se no conjunto de dados recolhidos sobre a qualidade das águas balneares para o último período de avaliação os valores de percentil para as contagens microbiológicas forem iguais ou melhores aos valores de “boa qualidade”;
- *Qualidade Aceitável* - “as águas balneares são classificadas como boas se no conjunto de dados recolhidos sobre a qualidade das águas balneares para o último período de avaliação os valores de percentil para as contagens microbiológicas forem iguais ou melhores aos valores de “qualidade aceitável”.
- *Qualidade Má* - as águas balneares são classificadas como boas se no conjunto de dados recolhidos sobre a qualidade das águas balneares para o último período de avaliação os valores de percentil para as contagens microbiológicas forem iguais ou melhores aos valores de “qualidade aceitável”.

Ainda de acordo com o mesmo Decreto-Lei “as águas balneares podem apresentar uma poluição de curta duração desde que:

- i) Estejam a ser tomadas as medidas de gestão adequadas incluindo a vigilância, os sistemas de alerta precoce e a monitorização para evitar a exposição dos banhistas através de uma advertência e, se necessário, de um desaconselhamento ou interdição da prática balnear;

- ii) Estejam a ser tomadas medidas de gestão adequadas para prevenir, reduzir ou eliminar as causas da poluição;
- iii) O número de amostras não consideradas de acordo com o n.º 7 do artigo 6.º do Decreto-Lei n.º 135/2009 de 3 de Junho, alterado pelo Decreto-Lei n.º 113/2012 de 23 de Maio, devido à poluição de curta duração o último período de avaliação não representa mais de 15% do número total de amostras previstas nos calendários de amostragem fixado para esse período, ou mais do que uma amostra por época balnear sendo o nível a considerar o mais elevado”.



## CAPÍTULO 3

### 3 ÁGUAS BALNEARES

#### 3.1 Parâmetros de avaliação de qualidade das águas balneares

A qualidade das águas balneares é um tema de grande relevância por ser considerado um bom indicador da qualidade ambiental e de potencial de desenvolvimento turístico, para além de determinante em termos de saúde pública (REA, 2018).

As águas balneares estão sujeitas a vários tipos de poluição devido a várias causas, tanto naturais como antropogénicas, cujas fontes podem difusas ou pontuais.

A presença de bactérias de origem fecal, incluindo os coliformes fecais e Enterococcus têm sido utilizados como ferramenta de acompanhamento para a deterioração microbiológica e para a previsão da presença de microrganismos patogénicos. Estes microrganismos são originários de mamíferos superiores e aves, e a sua presença em águas pode indicar contaminação fecal e possível associação com agentes patogénicos. Os indicadores microbiológicos são normalmente utilizados para demonstrar a presença ou ausência de agentes patogénicos (Cordeiro, 2014).

A existência de poluição fecal em águas balneares devido à presença de microrganismos patogénicos, a partir de determinados níveis, constitui um risco para a saúde pública. Essa contaminação não deve ser avaliada directamente pela determinação da presença desses microrganismos, mas sim de forma indirecta, através de indicadores microbiológicos. A contaminação, pode ser de origem humana ou proveniente de animais como aves, mamíferos domésticos e selvagens.

Os agentes biológicos continuam a ser o principal factor de contaminação da água causando diversas doenças (Germano, 2001). Segundo Sinton *et al.* (1994), as contagens de bactérias cultiváveis de indicadores de contaminação fecal constituem uma previsão válida de risco para a saúde pública, uma vez que os meios de cultura são utilizados, quer na monitorização da qualidade de águas balneares, quer em investigações epidemiológicas.

De acordo com o Decreto-Lei nº 135/2009 de 3 de Junho, alterado pelo Decreto-Lei nº 113/2012 de 23 de Maio procede-se à pesquisa e quantificação de *Escherichia coli* e Enterococos *intestinais*. Na alínea c) do nº 4 do Artigo 7 deste Decreto-Lei, assume-se

que o parâmetro *Streptococcus fecalis* é equivalente a Enterococos intestinais e que o parâmetro Coliformes fecais é equivalente ao parâmetro *Escherichia coli*.

### **3.1.1 *Escherichia coli***

A *Escherichia coli*, originalmente denominada por *Bacterium Coli*, foi identificada em 1885 pelo pediatra Alemão Theodor Escherich. A *Escherichia coli* encontra-se presente no intestino humano e de animais de sangue quente. É o indicador mais restrito do grupo dos Coliformes que se encontra quase exclusivamente associado a microrganismos de origem fecal. Esta bactéria, pertencente à família Enterobacteriaceae, é caracterizada pela presença das enzimas  $\beta$ -galactosidase e  $\beta$ -glucuronidase que se desenvolvem em meios complexos a 44 - 45°C (Monteiro, 2000).

Estes microrganismos quando detectados em uma amostra de água fornecem evidência direta de contaminação fecal recente, e por sua vez podem indicar a presença de patógenos entéricos (POPE *et al.*, 2003).

### **3.1.2 Enterococos intestinais**

O parâmetro Enterococos intestinais corresponde a um subgrupo dos *Streptococcus Fecalis* e é caracterizado pela alta tolerância às condições adversas de crescimento, tais como: capacidade de crescer na presença de 6,5% de cloreto de sódio, pH 9,6 e a temperaturas compreendidas entre 10 e 45 °C. É considerado o indicador mais adequado para avaliar a contaminação fecal de águas costeiras (Monteiro, 2000).

## **3.2 Monitorização da qualidade das águas balneares**

Nas águas balneares existem algumas interrogações no que concerne à efectividade do modo e à forma de medição e monitorização da qualidade da água, e ainda no que diz respeito ao número de factores físicos e ambientais que influenciam a inactivação dos microrganismos anteriormente referidos nas águas costeiras.

Alguns autores (Chigbu *et al.*, 2004; USEPA, 2005; Zhou *et al.*, 2007) verificaram a existência de padrões de variação espaço-tempo, na abundância de bactérias de origem fecal, em águas costeiras, escala espacial observada está, normalmente, relacionada com

a distância entre o ponto de colheita de água e a fonte de contaminação (descargas de águas residuais, escorrências, ribeiras, etc.), enquanto a escala temporal observada está associada, sobretudo, com as variações ambientais como precipitação, agitação marítima, maré e velocidade do vento, entre muitos outros factores (radiação solar, temperatura, salinidade, etc.).

Os critérios de amostragem, estabelecidos no âmbito dos planos de amostragem, de acordo com a Directiva Europeia 2006/7/CE, não consideram o período do dia, nem factores ambientais como, por exemplo, a radiação solar, que influenciam a contagem de *Escherichia coli* na água (Whitman *et al.*, 2004).

As amostras de água são geralmente recolhidas de manhã cedo, de forma a permitir cumprir os tempos analíticos, pelo que, os critérios adaptados não reflectem correctamente a concentração de bactérias indicadoras no período de exposição dos banhistas.

Os modelos numéricos têm provado ser uma boa ferramenta na previsão de correntes e distribuição da qualidade da água em estuários e zonas costeiras, e têm sido muito utilizados em estudos de avaliação de impactos ambientais, implementação e monitorização de emissários submarinos e da qualidade de águas balneares (Kashefipour *et al.*, 2006; Whitman *et al.*, 2004).

### **3.2.1 Perfis de águas balneares**

O objectivo principal da elaboração dos perfis das águas identificadas como balneares em cada ano é dotar as entidades responsáveis pela gestão das mesmas de informação à cerca das suas características e dos factores que podem afectar a sua qualidade, para que possam ser tomadas atempadamente as medidas e acções que previnam, prevejam e solucionem ocorrências de poluição suscetíveis de provocar efeitos negativos na saúde dos banhistas (APA, 2018).

O Decreto-Lei nº 135/2009 de 3 de junho, alterado pelo Decreto-Lei nº 113/2012 de 23 de Maio, define que os perfis das águas balneares devem ser estabelecidos pela APA, I.P. até março de cada ano, em conformidade com o Anexo V deste Decreto-Lei. Cada perfil pode abranger uma ou mais águas balneares contíguas.

Os perfis das águas balneares incluem os seguintes elementos: identificação e localização da água balnear, descrição da água balnear e envolvente (Figura 1), enumeração, listagem, caracterização e quantificação das fontes de poluição e avaliação do potencial de proliferação de cianobactérias; avaliação do potencial de proliferação de macroalgas e/ou fitoplâncton, histórico da qualidade das águas balneares e, por fim, medidas de gestão e intervenções. No anexo VI apresenta-se um exemplo de perfil completo da Fonte da Telha.


Perfil de Água Balnear da Fonte da Telha	
<b>Identificação da Água Balnear</b>	
Nome da Água Balnear	FONTE DA TELHA
Código da Água Balnear	PTCX7L
Ano de Identificação	1991
Categoria/Tipo	Água balnear costeira/Costa Atlântica Mesotidal Moderadamente Exposta
Nome da Zona Costeira	Costa da Caparica
<b>Fotografia</b>	
	
<small>Fonte: APA/ ARHTO</small>	
<b>Localização Geográfica e Administrativa da Água Balnear</b>	
País	Portugal
Distrito	Setúbal
Concelho	Almada
Freguesia	Costa da Caparica
Nome Bacia Hidrográfica	Bacia Hidrográfica do Rio Tejo
Código Bacia Hidrográfica	PTRH5
Nome da Massa de Água	CWE-I-4
Código da Massa de Água	PTCOST11

Figura 1 - Exemplo de perfil de água balnear da Fonte da Telha

(APA, 2019)

Do ponto de vista da gestão da praia, existe todo o interesse em que se conheçam as potenciais causas de contaminação, para desenvolver medidas de contenção, e que se consigam enquadrar as situações esporádicas que ocorrem. A política de implementação do perfil das águas balneares vai permitir que cada praia, em cada época balnear, esteja apta para a protecção do público contra focos de poluição crónica ou accidental. Assim, o “Perfil das Águas Balneares” serve não só para fazer um levantamento e caracterização da praia, como constitui também uma ferramenta que permite a adopção de medidas de gestão e de combate a possíveis focos de poluição (Silva, 2011).

### **3.3 Potenciais fontes de poluição das águas balneares**

As potenciais fontes de poluição das águas balneares é um dos pontos mais importantes na implementação de um perfil das águas balneares. É de salientar que a poluição que está em causa é essencialmente a poluição microbiológica das águas balneares, pois a Directiva considera apenas dois parâmetros microbiológicos, embora tenham de ser considerados outros tipos de poluição, organismos ou resíduos que afectem a qualidade das águas balneares e constituam um risco para a saúde dos banhistas (Silva, 2011).

#### **3.3.1 Poluição de curta duração**

Segundo o Decreto-Lei nº 135/2009 de 3 de Junho, alterado pelo Decreto-Lei nº 113/2012 de 23 de Maio, são consideradas como fontes de poluição, de curta duração, todas aquelas que provocam contaminação microbiológica, através de *Enterococos* intestinais e *Escherichia coli*, com causas claramente identificáveis, prevendo-se que, em princípio, não afetarão a qualidade das águas balneares por mais de cerca de 72 h, a contar do momento em que a qualidade dessas águas começou a ser afectada, e para as quais a autoridade competente tenha estabelecido procedimentos de previsão e minimização dos seus efeitos. É, assim, necessário proceder ao levantamento de todas as possíveis fontes de poluição de curta duração que possam afectar as águas balneares e a saúde dos banhistas.

Este levantamento deve passar pela descrição da natureza, frequência e duração esperadas, da poluição de curta duração, assim como das medidas de gestão tomadas de modo a controlar esses focos de poluição, e pela identificação e contactos dos organismos responsáveis pela adopção dessas medidas. É ainda necessário fazer um levantamento dos dados sobre quaisquer causas de poluição remanescentes, incluindo as medidas de gestão tomadas e o calendário para a sua eliminação.

#### **3.3.2 Poluição decorrente de situações anormais**

É considerada como situação anormal “um acontecimento ou uma combinação de acontecimentos com repercussões na qualidade das águas balneares no local em questão, o qual não se prevê que ocorra, em média, mais do que uma vez de quatro em quatro

anos”. Um exemplo de um caso de poluição anormal é a ocorrência de acidentes com petroleiros.

Deste modo, para o correcto levantamento de todas as fontes de poluição que possam afectar a qualidade das águas balneares, é essencial fazer um levantamento da possibilidade de ocorrência de situações anormais de poluição. A nova Directiva prevê que, na ocorrência de situações anormais de poluição, seja suspenso o calendário de amostragem, que poderá ser retomado após o termo da situação anormal de poluição (Silva 2011).

### **3.3.3 Poluição difusa**

Este tipo de poluição resulta das variadas actividades de uso e ocupação do solo, e está dispersa ao longo da zona drenante atingindo as águas balneares, e contribuindo para a existência de problemas de poluição da água, como os “blooms” de algas ou fitoplâncton e cianobactérias, e a contaminação microbiológica das águas balneares (Yan *et al*, 2007). As fontes de poluição podem afectar todos os recursos aquáticos, desde os rios às águas subterrâneas e balneares. Uma das principais causas deste tipo de poluição é a impermeabilização dos solos.

A existência de canalizações parciais de linhas de água, assim como, muitas vezes, a densa vegetação, também favorecem o aparecimento de descargas ocultas e dificultam bastante a detecção (IHRH, 2000).

Ao contrário das fontes de poluição pontuais, as difusas não são de fácil quantificação e qualificação. Um estudo pormenorizado de toda a bacia drenante, de todas as fontes de poluição, além de uma gestão adequada do perfil das águas balneares, permitirá, a médio prazo, uma diminuição da contribuição da poluição difusa nas águas balneares, tanto pela diminuição da sua emissão (através das medidas de gestão), como pela identificação da sua origem e melhor controlo do seu impacto, passando, então, de fonte difusa para pontual (Silva, 2011).

### **3.3.4 Poluição pontual**

A poluição pontual resulta de descargas em locais específicos e facilmente identificáveis e monitorizáveis (Souza, 2007).

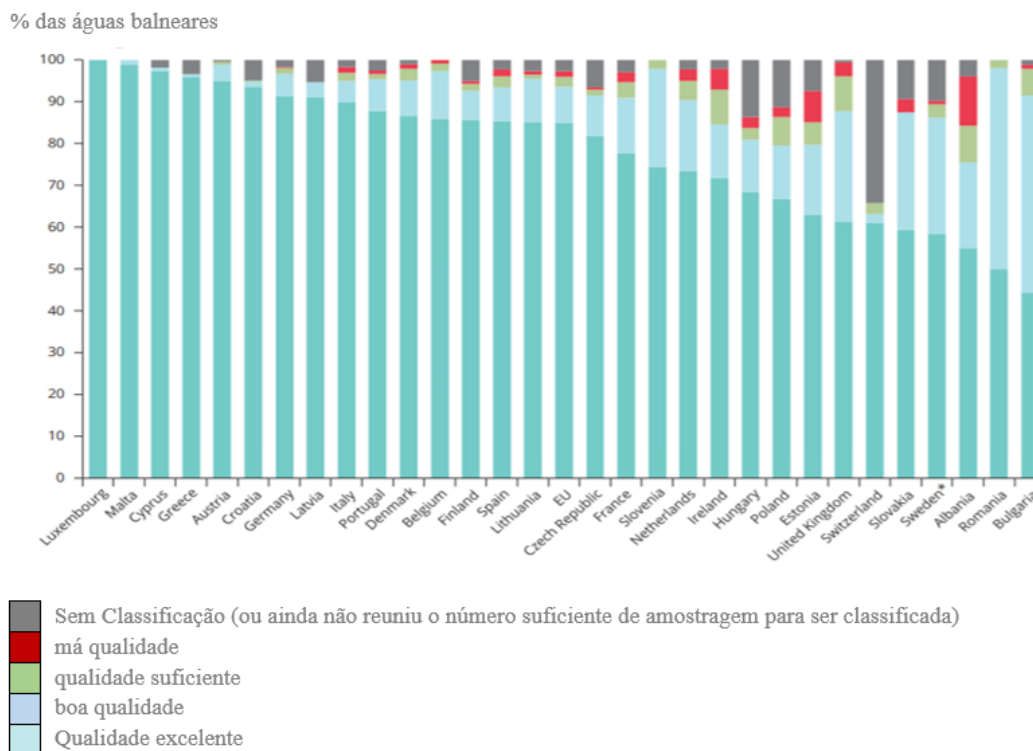
Pelczar *et al.* (1996) cita que infecções transmitidas por água balneares ocorrem quando um microrganismo infeccioso é adquirido por meio desta água, contaminada por matéria de origem fecal, contendo patógenos humanos e animais. Quando esses patógenos contaminam as águas balneares, podem aparecer surtos epidémicos de doenças intestinais, afectando um grande número de pessoas num curto período. A detecção da fonte de contaminação, associada a vários casos, auxilia na determinação da origem de tais epidemias.

Nos seres humanos, a *E. coli* pode causar doenças como: diarreia, colite hemorrágica síndrome urémica hemolítica é uma síndrome caracterizada por insuficiência renal progressiva, anemia hemolítica (destruição dos glóbulos vermelhos e plaquetas) e lesão das paredes dos vasos sanguíneos (Ismaili *et al.*, 1995).

### **3.4 Qualidade das águas balneares na Europa**

O relatório anual sobre a qualidade das águas balneares da União Europeia de 2018, indica que mais de 85% das zonas balneares, monitorizadas em 2016, satisfaziam as mais rigorosas normas de qualidade, atingindo o nível de ‘excelente’. Os resultados obtidos nas análises permitiram verificar “que a maioria das zonas balneares está isenta de poluentes nocivos para a saúde humana e para o ambiente”, e que mais de 96% das zonas balneares satisfazem os requisitos mínimos de qualidade estabelecidos ao abrigo das regras da União Europeia. As águas balneares europeias estão cada vez mais limpas, uma tendência positiva que se vem verificando ao longo dos últimos 40 anos (EEA, 2018).

Os resultados da qualidade das águas balneares para cada país da Europa, na época balnear 2017 é apresentado na Figura 2.



(EEA, 2018)

Figura 2 - Resultados da qualidade das águas balneares para cada país, na época balnear 2017

De acordo com os padrões mínimos de qualidade estabelecidos pela Directiva relativa às águas balneares, nos Estados Membros da UE em 2017, em cinco países, 95% ou mais das águas balneares apresentam excelente qualidade, Luxemburgo (100%), Malta (98,9%), Chipre (97,3%), Grécia (95,9%) e Áustria (95,1%). Os países que apresentaram águas balneares com qualidade suficiente foram: Áustria, Bélgica, Croácia, Chipre, Grécia, Letónia, Luxemburgo, Malta, Roménia, Eslovénia e Suíça e os três países com maior número de águas balneares, classificadas como má, são a Itália (79 águas balneares ou 1,4%), França (80 águas balneares ou 2,4%) e Espanha (38 águas balneares ou 1,7%).

Em comparação com 2016, o número de banhos de má qualidade das águas, na Itália, diminuiu 21 (de 100 águas balneares em 2016 para 79 em 2017). Os países com a maior proporção de águas balneares de fraca qualidade são Estónia (4 águas balneares ou 7,4%), Irlanda (7 águas balneares ou 4,9%) e Reino Unido (21 águas balneares ou 3,3%). Na Albânia, de acordo com as disposições da Directiva relativa às águas balneares, pela terceira vez, 12 locais de águas balneares (ou 11,8%) foram classificados como má, descendo 2,3 %, relativamente a 2016. Desde 2015, altura em que 31 locais de águas balneares (ou 39,1%) eram avaliados como 'pobres', o número diminuiu significativamente (EEA, 2018).

### 3.5 Qualidade das águas balneares em Portugal

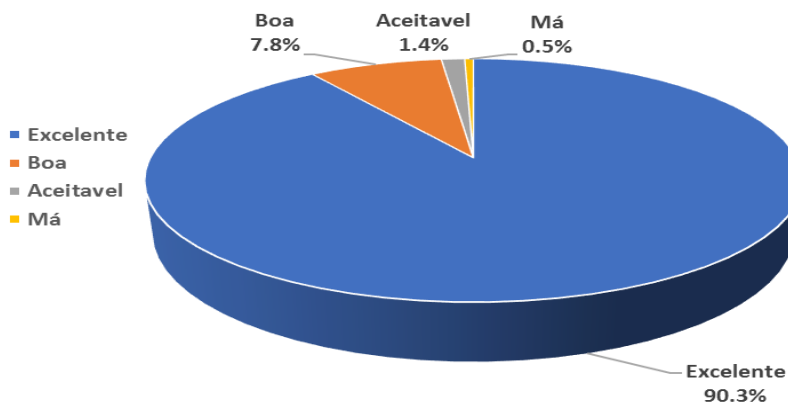
Segundo dados divulgados pelo SNIRH (2018) em Portugal, existiam cerca de 737 águas balneares. O número de águas balneares identificadas, que obrigatoriamente são sujeitas ao controlo da qualidade da água para a prática balnear, tem evoluído bastante nas últimas décadas, passando de 336, em 1993, para 603 em 2017. Destas, 80% são águas balneares costeiras ou de transição (480) e 20% são águas balneares interiores (123).

Das 603 águas balneares identificadas em 2017, 96,7% apresentaram qualidade “aceitável” ou “superior”, 87,7% apresentaram qualidade “excelente” e 0,8% evidenciaram qualidade “má”. Salienta-se ainda a existência de 15 águas balneares que não foram contabilizadas em nenhuma das quatro classes de qualidade estabelecidas pela Directiva, em virtude de, até ao final da época balnear de 2017, não possuírem ainda uma quantidade de dados suficiente para que fosse possível proceder à sua avaliação qualitativa.

Assim, estas 15 águas balneares foram consideradas “sem classificação”, correspondendo a 2,5% das águas balneares identificadas. Importa, contudo, realçar que estas águas balneares foram sujeitas a monitorização durante a época balnear de 2017, respeitando as exigências legais.

De referir também que, nos casos gerais, para que ocorra a classificação da qualidade da água balnear é necessário um número mínimo de 16 amostras, para o conjunto de quatro épocas balneares (mínimo de quatro amostras por época balnear). Ou seja, na época balnear de 2017, e para os casos gerais, a classificação das águas balneares tem por base, pelo menos, 16 amostras relativas aos anos de 2017, 2016, 2015 e 2014.

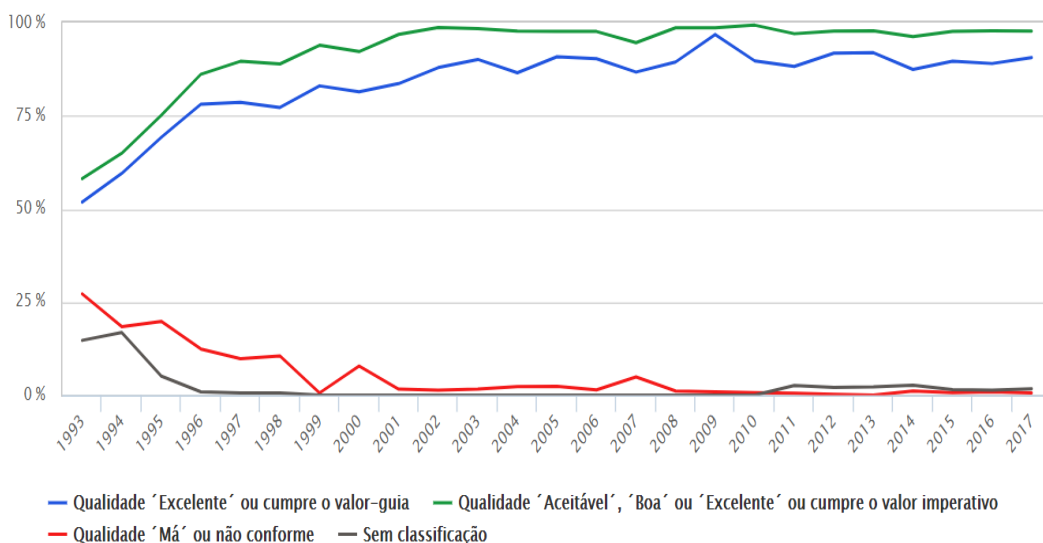
Analisando a Figura 3 constata-se que, em 2017, a percentagem de águas com classificação “aceitável” ou superior é muito elevada (99,5%), sendo mesmo que 90,3% das águas obtiveram a classificação de “excelente”. Três águas balneares, correspondentes a 0,5% foram classificadas como de “má” qualidade. Os restantes 1,4% de águas costeiras foram considerados “sem classificação”, porque ainda não dispõem do número de amostras que é necessário para efectuar a avaliação qualitativa (SNIRH, 2018).



(SNIRH, 2018)

Figura 3 - Classificação das águas balneares obtida em 2017

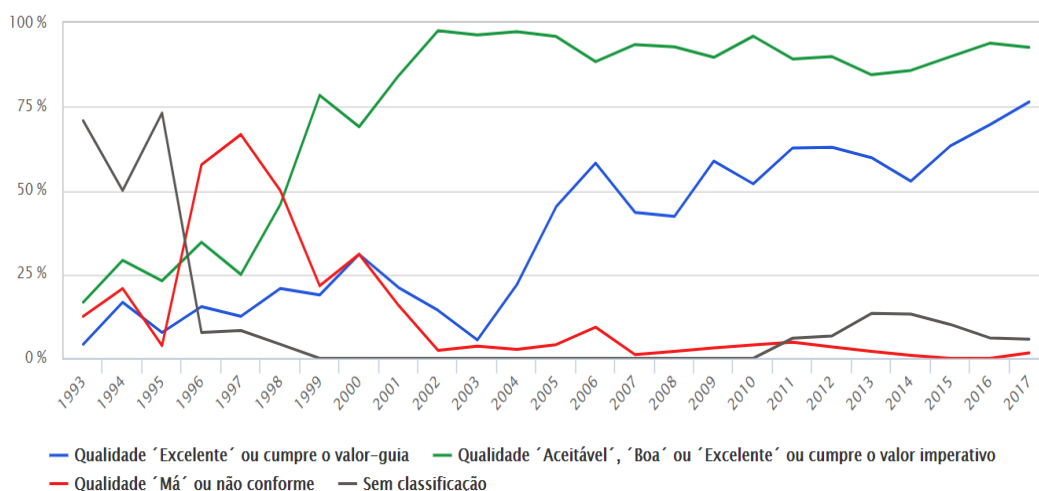
Nos últimos anos, tem-se verificado, em Portugal, uma evolução positiva da qualidade das águas balneares nacionais, como se pode observar nas Figuras 4 e 5.



(APA, 2018)

Figura 4 - Evolução da qualidade das águas balneares costeiras e de transição

Analisando especificamente as águas balneares costeiras e de transição (Figura 4), constata-se que, em 2017, a percentagem de águas com classificação “aceitável” ou superior é muito elevada (97,7%), sendo que 90,6% das águas obtiveram a classificação de “excelente”. Ainda assim, 0,6% das águas foram classificadas como de “má” qualidade. Os restantes 1,7% de águas costeiras foram considerados “sem classificação” (tendo sido sujeitos a controlo de qualidade da água, mas ainda não dispo de um conjunto de 16 amostras) (APA, 2018).



(APA, 2018)

Figura 5 - Evolução da qualidade das águas balneares interiores

Para as águas balneares interiores (Figura 5), a avaliação efectuada, em 2017 evidenciou também que a percentagem de águas com classificação “aceitável” ou superior é elevada, (92,7%), sendo que 76,4% obtiveram classificação “excelente”. Em 2017, duas águas balneares interiores (1,6%) obtiveram classificação “má”. Foram consideradas “sem classificação” 5,7% das águas balneares interiores (ou seja, apesar de sujeitas a controlo de qualidade da água, ainda não dispõem de um conjunto de 16 amostras) (APA,2018).

### 3.6 Bandeira Azul

#### 3.6.1 Condições para atribuição da Bandeira Azul

A Bandeira azul é um símbolo de qualidade ambiental atribuído, anualmente, a praias fluviais e costeiras ou de transição que se candidatem ao galardão e que cumpram um conjunto de critérios estabelecidos pela Associação Bandeira Azul da Europa. O programa Bandeira Azul tem por objectivo educar para a sustentabilidade da biodiversidade marinha da orla costeira e lacustre e incentivar a adopção de comportamentos sustentáveis que respeitem a Natureza.

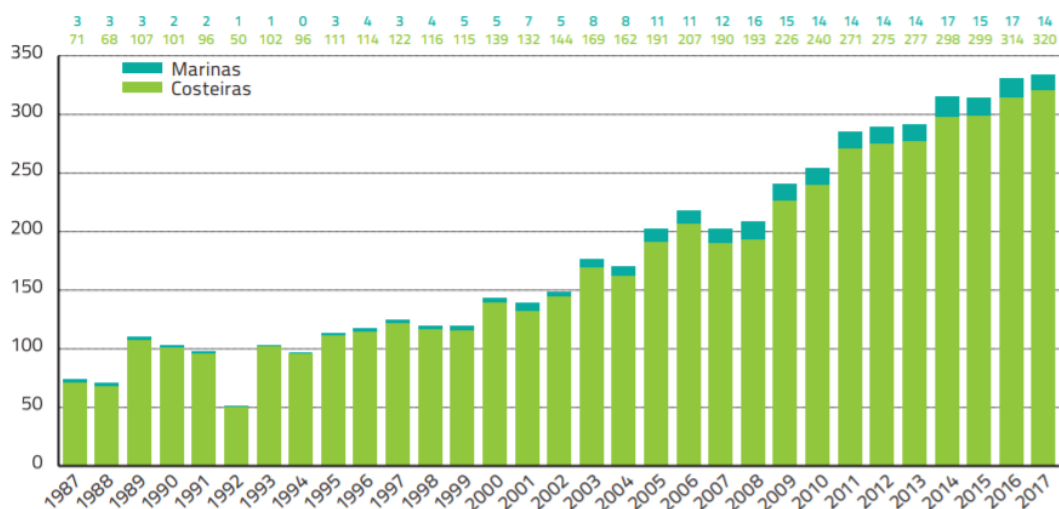
Segundo ABAE, (2018) os Critérios do Programa Bandeira Azul para praias estão divididos em 4 grupos: Informação e Educação Ambiental, Qualidade da Água, Gestão Ambiental e Equipamentos, Segurança e Serviços. Este galardão, atribuído após a verificação destes critérios, pressupõe que a qualidade da água tenha obtido a classificação de “excelente”.

### 3.6.2 Locais galardoados

Segundo a Associação Bandeira Azul da Europa, a época balnear de 2018 contou com 332 praias classificadas com a Bandeira Azul, às quais se juntam 14 marinas e 5 navios de ecoturismo. Segundo a informação divulgada pelo programa Bandeira Azul, um pouco mais de metade das praias portuguesas conseguiu a distinção “Bandeira Azul”, um número ligeiramente superior ao de 2017, o suficiente para se registar o maior valor de sempre. Na Figura 6 apresenta-se a evolução das praias galardoadas de 1987 a 2017.

Por região, o número de praias galardoadas é o seguinte:

- Na região Norte, 73 praias;
- No Centro, 39 praias;
- Na região do Tejo, 48 praias;
- No Alentejo, 32 praias;
- No Algarve, 89 praias;
- Nos Açores, 37 praias;
- Na Madeira, 14 praias.



(ABAE, 2018)

Figura 6 - Evolução dos locais galardoados de 1987 a 2017

De 2015 a 2018, as praias galardoadas tiveram um crescimento notável. Em 2015, em Portugal, foram galardoadas 283 praias e em 2018, foram galardoadas 332 praias, em todo país.

Espanha teve 696 bandeiras azuis em 2018 e é líder incontestado e mundial no galardão que garante a qualidade das praias e da sua água. Os resultados mostram que Espanha tem agora 590 praias de bandeira azul ao longo de sua vasta costa, correspondendo a 11 a mais do que em 2017. Existem ainda bandeiras azuis para 101 marinas e 5 portos de cruzeiros. Madrid este ano foi incluída, graças à praia Virgen de la Nueva, nas margens do reservatório de San Juan, perto da cidade de San Martín de Valdeiglesia, a cerca de uma hora a oeste da cidade (ABAE, 2018).





Na Tabela 3 estão descritas as águas balneares monitorizadas durante a execução do trabalho, conselhos, categoria, época balnear e classificação obtida, em 2017, e tendo em conta a classificação obtida em 2016. No anexo III apresenta-se a descrição das cores de classificação.

Tabela 3 - Águas balneares monitorizadas neste trabalho

Concelho	Água balnear	Categoria	Época balnear 2018	Classificação2017
Almada	Castelo	Costeira	1 de Junho a 30 de Setembro	Excelente
Almada	Fonte nova	Costeira	1 de Junho a 30 de Setembro	Excelente
Almada	Rainha (Caparica)	Costeira	1 de Junho a 30 de Setembro	Excelente
Almada	São João da Caparica	Costeira	1 de Junho a 30 de Setembro	Excelente
Almada	Sereia	Costeira	1 de Junho a 30 de Setembro	Excelente
Cascais	Avencas	Costeira	1 de Maio a 15 de Outubro	Excelente
Cascais	Azarujinha	costeira	1 de Maio a 15 de Outubro	Excelente
Cascais	Carcavelos	costeira	1 de Maio a 15 de Outubro	Excelente
Cascais	Conceição	Costeira	1 de Maio a 15 de Outubro	Excelente
Cascais	Crismina	Costeira	1 de Maio a 15 de Outubro	Excelente
Cascais	Duquesa	Costeira	1 de Maio a 15 de Outubro	Boa
Cascais	Guincho	Costeira	1 de Maio a 15 de Outubro	Excelente
Cascais	Moitas	Costeira	1 de Maio a 15 de Outubro	Excelente
Cascais	Parede	Costeira	1 de Maio a 15 de Outubro	Excelente
Cascais	Poça	Costeira	1 de Maio a 15 de Outubro	Excelente
Cascais	Rainha	Costeira	1 de Maio a 15 de Outubro	Boa
Cascais	S. Pedro do Estoril	Costeira	1 de Maio a 15 de Outubro	Excelente
Cascais	Tamariz	Costeira	1 de Maio a 15 de Outubro	Excelente
Oeiras	Caxias	Transição	12 de Maio a 23 de Setembro	Boa
Oeiras	Paço de Arcos	Transição	12 de Maio a 23 de Setembro	Boa
Oeiras	Santo Amaro	Transição	12 de Maio a 23 de Setembro	Excelente
Oeiras	Torre	Transição	12 de Maio a 23 de Setembro	Excelente
Mafra	Porto das Caladas	Costeira	15 de Junho a 16 de Setembro	Excelente
Mafra	S. Lourenço	Costeira	15 de Junho a 16 de Setembro	Excelente
Mafra	Coxos	Costeira	15 de Junho a 16 de Setembro	Excelente
Mafra	Ribeira de Ilhas	Costeira	15 de Junho a 16 de Setembro	Excelente
Mafra	Algodio do Norte	Costeira	15 de Junho a 16 de Setembro	Excelente
Mafra	F. da Telha	Costeira	15 de Junho a 16 de Setembro	Excelente
Mafra	B. Sul	Costeira	15 de Junho a 16 de Setembro	Excelente
Mafra	Foz Lisandro	Interior	15 de Junho a 16 de Setembro	Má
Sesimbra	Bicas	Costeira	30 de Maio a 16 de Setembro	Excelente
Sesimbra	Lagoa da albufeira	Costeira	30 de Maio a 16 de Setembro	Excelente

Sesimbra	Lagoa albufeira -mar	Costeira	30 de Maio a 16 de Setembro	Excelente
Sesimbra	M. de baixo (Meco)	Costeira	30 de Maio a 16 de Setembro	Excelente
Sintra	Magoito	Costeira	15 de Junho a 15 de Setembro	Excelente
Sintra	Maças	Costeira	15 de Junho a 15 de Setembro	Excelente
Sintra	Praia Grande	Costeira	15 de Junho a 15 de Setembro	Excelente
Sintra	Adraga	Costeira	15 de Junho a 15 de Setembro	Excelente
Sintra	S. Julião	Costeira	15 de Junho a 15 de Setembro	Excelente
Sintra	Foz colares	Interior	15 de Junho a 15 de Setembro	Excelente

As águas balneares descritas na Tabela 3, foram monitorizadas no período de Abril a Julho, tendo em conta o calendário estabelecido pela APA.



## CAPÍTULO 5

### 5 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 5.1 Meios de cultura e soluções de diluição

Os meios de cultura desempenham um papel fundamental na microbiologia. São preparações químicas produzidas em laboratórios, e que fornecem os nutrientes necessários ao crescimento e desenvolvimento de microrganismos (como bactérias, bolores e leveduras) fora do seu meio natural (DRA, 2017). É necessário proceder ao controlo de qualidade dos meios de cultura utilizados, a fim de avaliar e verificar se estão em conformidade com os critérios definidos pela (ISO 11133:2014) de forma a validar e assegurar a fiabilidade dos resultados.

As soluções de diluição e meios de cultura utilizados para este trabalho foram:

- Água MilliQ esterilizada como solução de diluição (Figura 8);
- DSM - Diluant Spécial pour Microplaques (Figura 9);
- Colilert-18 (Figura 10);
- Enterolert (Figura 11);
- Microplacas estéreis MUG *E. coli* (Figura12);
- Microplacas estéreis MUD Enterococos (Figura 13);
- Solução de Ringer;
- Gelose de lauril-sulfato de sódio (isolamento *E. coli*);
- Fluorocult (confirmação *E. coli*);
- Meio de Slanetz & Bartley (isolamento Enterococos);
- Agar de bÍlis azida-esculina (confirmação Enterococos).

**Gelose de lauril-sulfato de sódio (isolamento)** é um meio sólido selectivo vermelho, onde as colónias típicas amarelas aparecem com cor amarelo limão.

**Fluorocult (confirmação)** é um meio líquido violeta, para confirmação de coliformes. A presença de coliformes é evidenciada pela mudança da cor do meio para amarelo, com

emissão de fluorescência com radiação UV. Caso a prova de fluorescência se apresente negativa, executa-se a prova de Indol.

**Meio de Slanetz & Bartley (isolamento Enterococos)** é um meio selectivo sódio, cujos componentes inibem o crescimento de bactérias Gram-negativas, pondo em evidência as colónias típicas que aparecem com cor vermelha, castanha ou rosa.

**Agar de bÍlis azida-esculina (confirmação Enterococos)** neste meio, as colónias típicas de Enterococos intestinais apresentam uma coloração acastanhada ou negra, que se difunde no agar.



Figura 8 - Doseador com água MilliQ

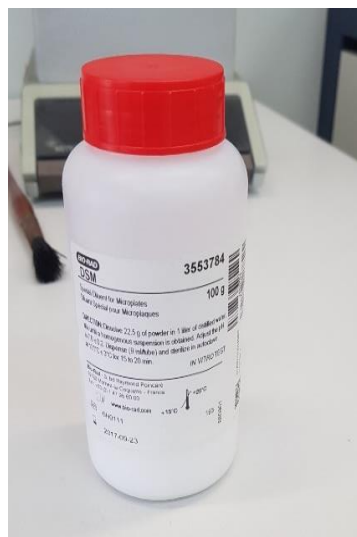


Figura 9 - Meio cultura DSM



(IDEXX, 2018)

Figura 10 - Embalagem de Colilert



(IDEXX, 2018)

Figura 11 - Embalagem de Enterolert

### 5.1.1 Material de laboratório

O material de laboratório inclui o material de vidro e plástico e os equipamentos utilizados na atividade laboratorial.

- Placas Petri esterilizadas, com diâmetro de 90 mm;
- Pontas esterilizadas para micropipetas;
- Frascos de vidro de 110 ml esterilizados;
- Frascos de plástico de 500 ml (Figura 12) e 1 L esterilizados;
- Comparador de cor;
- Caixa térmica (Figura 13);
- Luvas;
- Álcool;
- Membranas filtrantes, esterilizadas, com 47 mm de diâmetro e porosidade de 0,45  $\mu\text{m}$ ;
- Copos de filtração esterilizados de 100 ml;
- Frascos de vidro “Schott” com tampa autoclavável;
- Placas de Petri esterilizadas com diâmetro de 60 mm ou 90 mm;
- Tubos de vidro com tampas;
- Ansas de repicagem esterilizadas;
- Pinças de pontas planas em aço inox.



Figura 12 - Frascos de plástico de 500 ml esterilizado



Figura 13 - Caixa térmica para o transporte das amostras



Figura 14 - Frascos arrumados na Caixa térmica para recolha das amostras



(IDEXX,2018)

Figura 15 - Microplaca

### 5.1.2 Equipamentos

- Micropipetas de multicanal com 8 canais (Figura 16);
- Micropipetas de mono canal de 5 e 10 ml (Figura 16);
- Agitadores tipo Vortex (Figura 17);
- Balança analítica (Figura 18);
- Autoclave (Figura 19);
- Estufa de incubação com termóstato a  $36 \pm 2$  °C;
- Estufa de incubação com termóstato a  $41 \pm 0,5$  °C;
- Estufas de incubação com termóstato regulável a  $44 \pm 0,5$  °C (Figura 19);
- Câmara de observação com lâmpada UV (Figura 21);
- Bicos de Bunsen;
- Seladora de Quanti-trays (Figura 21);
- Dispensador automático de membrana;
- Contador de colónias com sistema de iluminação;
- Rampa de filtração bomba de vácuo.



Figura 16 - Micropipetas mono e multicanal



Figura 17 - Agitadores do tipo "Vortex

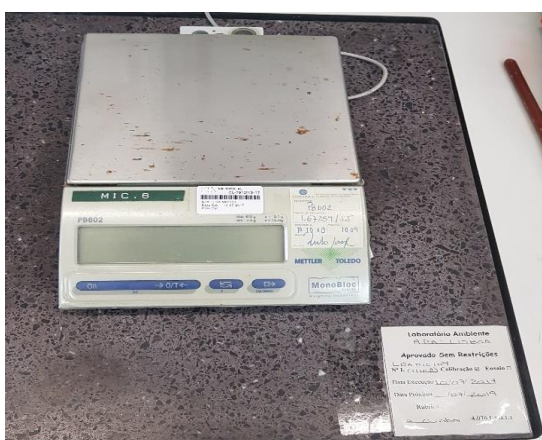


Figura 18 - Balança analítica



Figura 19 - Equipamento de água MilliQ



Figura 20 - Rampa de filtração



Figura 21 - Estufas de incubação com termóstato regulável a  $44 \pm 0,5$  °C



Figura 22 - Seladora de Quanti-Tray



Figura 23 - Câmara de observação com lâmpada UV

## 5.2 Metodologia

### 5.2.1 Amostragem

A forma como as amostras de água balnear são recolhidas tem impacto na qualidade dos resultados. O procedimento de amostragem foi feito de acordo com a norma ISO 19458 (2006).

#### 5.2.1.1 Planeamento da colheita das amostras

A estratégia de amostragem define a localização do ponto de colheita, o número de amostras a recolher e frequência de amostragem, etc. Segundo LRA (2011) para que se obtenham resultados com o nível requerido, é fundamental que o planeamento e os registos sejam adequados. Para elaboração do planeamento distinguem-se três níveis para a documentação:

- Elaboração do programa;
- Informação a fornecer ao pessoal da amostragem;
- Procedimentos operativos.

É importante, para além da descrição do programa, a inclusão de razões subjacentes à realização do estudo, designadamente o que se pretende com os resultados, descrição das especificações que a informação deve cumprir, características temporais e espaciais e processos ambientais a Tabela 4 demonstra o resumo das técnicas de conservação das amostras para a determinação dos parâmetros microbiológicos. A estratégia de amostragem precisa ser operacionalizada num plano de amostragem. Este plano deve servir de apoio ao pessoal envolvido no planeamento e análise e deve incluir:

- Localização do ponto de amostragem;
- Número de amostras a recolher;
- Frequência de amostragem;

Tabela 4 - Resumo das técnicas de conservação das amostras para a determinação dos parâmetros microbiológicos

Parâmetro	Natureza do recipiente	Tempo recomendados (colheita/análise)	Técnica de conservação
Bactérias coliformes <i>Escherichia coli</i> Enterococos intestinais	Frascos V. ou P. estéreis de 500 ml	6 - 8 h	Transporte ao abrigo da luz, com refrigeração

(LRA, 2017)

**Nota:** A Norma ISO 19458 (2006). especifica que, em casos excepcionais, a análise pode ser realizada até às 24 h após a colheita.

## 5.2.2 Recolha de amostras de águas balneares

As amostras de águas balneares costeiras, interiores e de transição, foram recolhidas de forma directa e indirecta, a 30 cm de profundidade, numa coluna de água com cerca de 1,3 metros, com recipientes de plástico, estéreis, de 500 ml. Estes recipientes foram enchidos até cerca de 3/4 do seu volume, identificados de modo claro e indelével. Os recipientes foram fornecidos pelo Laboratório e transportados em caixas térmicas (Figura 13). As amostras foram conservadas no frio e validadas após confirmação das temperaturas de colheita e de chegada ao laboratório.

### 5.2.2.1 Recolha directa

Em condições de segurança, entrou-se no mar cerca de 1,3 m, passando pela zona de rebentação e recolhendo as amostras a uma profundidade de 30 cm, abaixo da superfície. O recipiente foi imerso, fechado, na água, no sentido oposto ao corpo, sendo aberto e cheio até  $\pm 3/4$  do seu volume Figura 24 (LRA. 2011).



Figura 24 - Recolha directa de amostras de águas balneares.

### 5.2.2.2 Recolha indirecta

Este tipo de recolha é realizado, normalmente, quando as condições do mar não permitem recolher amostras em segurança, através da utilização de um balde em inox. O balde é lavado três vezes, com água do local, antes de recolher amostra. Na zona de entrada do mar, o balde que está ligado a um cabo é lançado na água do mar, posteriormente, é puxado na direcção da praia, aguardando-se que a amostra sedimente e, com o recipiente adequado, procede-se à recolha da amostra (Figura 25) (LRA, 2011).



Figura 25 - Recolha indirecta de amostras de águas balneares

### 5.2.3 Medição da temperatura no local de amostragem

Um factor importante para validação de amostragens e respetivos métodos e é a distinção das devidas variações temporais ou espaciais, numa massa de água, e as variações causadas pelas condições a que a amostra pode estar sujeita. No local de amostragem, é medida a temperatura da água (Figura 26). Em seguida enche-se um frasco no início da recolha das amostras para o controlo da temperatura.



Figura 26 - Medida de temperatura inicial no local de colheita

### 5.2.4 Recepção das amostras

Na recepção das amostras, no laboratório, é medida a temperatura no frasco com a água colhida no início da recolha das amostras, para verificar se as condições de refrigeração das amostras foram mantidas, durante o transporte. A temperatura tirada no laboratório tem de ser inferior à temperatura do local de amostragem (Figura 27).



Figura 27 - Medida da temperatura para verificação das condições de refrigeração das amostras

### **5.3 Parte experimental**

#### **5.3.1 Esterilização dos materiais e meios de cultura**

Em Microbiologia, é importante a esterilização dos meios de cultura, das soluções de diluição e do material de vidro ou plástico que se utiliza. A esterilização do material e dos meios de cultura realiza-se utilizando uma autoclave (Figura 29), a temperatura de 121 °C, e com um período de esterilização de 15 min, para os meios de cultura, e de 30 min para o material.

Os meios contaminados com as culturas de bactérias foram descontaminados por autoclavagem e, em seguida, descartados como resíduos não perigosos. O material contaminado foi lavado na máquina e seco na estufa de secagem.

A assepsia é extremamente importante em Microbiologia. Entende-se por assepsia todas as condições, gestos e atitudes tendentes a manter o estado de ausência de microrganismos contaminantes, no meio em que se actua (Mariya,2008).

#### **5.3.2 Preparação dos meios de cultura**

Os meios de cultura são preparados a partir de meios desidratados, com água MilliQ e aquecidos, até que se dissolvam completamente. Após a esterilização, por autoclavagem a 121°C, durante 15 min, os meios são distribuídos em placas numa Câmara de Fluxo Laminar. Noutros casos, os meios de cultura e soluções de diluição são preparados em tubos de Petri e, posteriormente, esterilizados no autoclave a 121°C, durante 15 min.

A sua preparação é um processo simples, mas requer a aplicação de certas regras. A preparação dos meios de cultura e das soluções de diluição foram efectuados segundo (NP-4346:1998), na sequência seguinte:

- Pesagem do meio de cultura em um recipiente adequado;
- Dissolução em água de qualidade apropriada, a quente ou frio, em recipiente fechado;
- Identificação do meio de cultura ou da solução de diluição, através de marcação do recipiente e da data de preparação e designação do meio (Figura 28);
- Esterilização na autoclave a 121°C, durante 15 min (Figura 29) armazenamento dos lotes, por datas de preparação e tipo de meio.

Os lotes de meios de cultura preparados no laboratório têm uma validade de 30 dias.



Figura 28 - DSM preparados e identificados



Figura 29 - Esterilização dos meios de cultura

### 5.3.3 Controlo da qualidade do pH

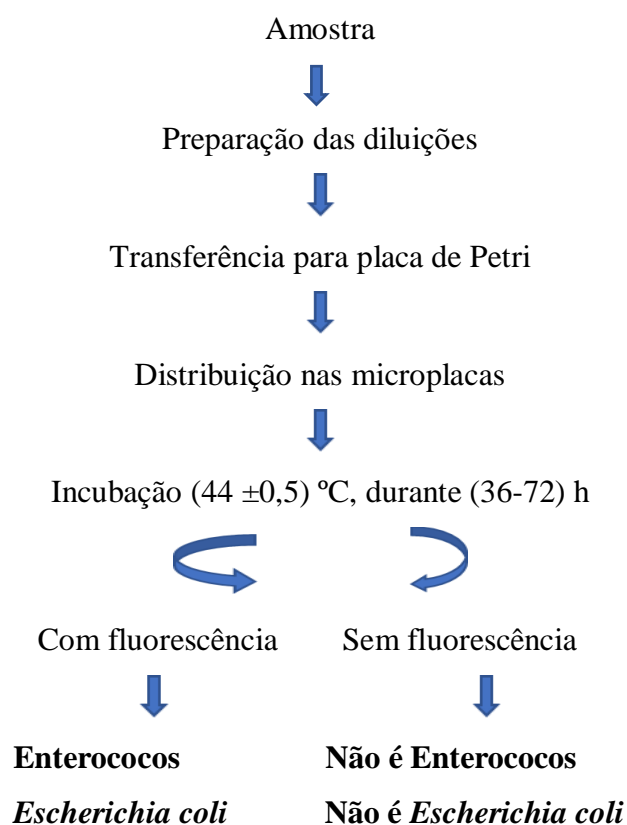
O controlo de qualidade efectuado compreende a determinação de valor do pH, sempre que se esteriliza a água e é realizada a contagem de microrganismos cultiváveis a 22°C, com uma periodicidade mensal. Se a qualidade de água não cumprir os critérios de aceitação definidos, será descartada.

Se a água tiver sido utilizada para preparação de meios de cultura ou soluções de diluição que, entretanto, tenham sido utilizados no processo de análise de amostras, estas serão desprezadas.

## 5.4 Pesquisa e quantificação de *Escherichia coli* e Enterococos intestinais pelo método de Microplacas

### 5.4.1 Descrição do método de Microplacas

O substrato que demonstra a actividade enzimática bacteriana em questão é o MUG (4-metilumbeliferil  $\beta$  - D-glucuronido). O meio de cultura é desidratado e fixado ao fundo dos poços da microplaca. A reidratação do meio é conseguida quando a própria amostra de água é introduzida nos poços. Este método baseia-se na norma ISO 7899-1 (1998), para os Enterococos e na norma ISO 9308-3 (1998), para *Escherichia coli*. Este método aplica-se a águas balneares, superficiais e residuais. Na Figura 30 está representado o fluxograma de execução do método das Microplacas.



(LRA, 2017)

Figura 30 - Fluxograma de execução do método das Microplacas.

Após a preparação das diluições, transfere-se a amostra para uma placa de Petri. Em seguida, é feito o preenchimento das microplacas que vão a incubar a uma temperatura de  $44 \pm 0,5$  °C, durante 36 a 72 h, para pesquisa de *Escherichia coli* e Enterococos intestinais. Após a incubação, observa-se a microplaca sob radiação UV (Figura 23), a

emissão de fluorescência indica a presença de *Escherichia coli* ou de Enterococos Intestinais (LRA, 2017).

#### 5.4.2 Diluições

O número de diluições depende da natureza e do teor bacteriano previsto. Para as águas balneares as diluições foram realizadas conforme descrito na Tabela 5.

Tabela 5 - Descrição das diluições para águas balneares

Origem	Nº de Diluições	Nº de poços (diluições)	Valores limite (Nº bactérias /100 ml)
Águas balneares	2	64 poços para 1/2 64 poços para 1/20	15 até $3,5 \times 10^4$

(ISO 9308-3, 1998)

Utilizando uma micropipeta com uma ponta estéril transferiram-se 18 ml da amostra de água balnear para o primeiro tubo contendo 18 ml de água esterilizada, agitando o tubo para homogeneizar a amostra (diluição 1/2). Com uma nova ponta estéril e após homogeneização da amostra, transferiram-se 2 ml desta diluição para o tubo contendo 18 ml de diluente DSM (diluição 1/20).

#### 5.4.3 Inoculação e incubação das microplacas

Transferiu-se o conteúdo do segundo tubo de diluição (1/20) para uma placa de Petri estéril, de 90 mm de diâmetro e, utilizando uma pipeta multicanal com oito pontas estéreis, distribuíram-se 200 µl, em cada poço da microplaca. Procedeu-se da mesma forma para a diluição 1/2. Após a inoculação da microplaca, procedeu-se à selagem com fita adesiva estéril e à incubação a  $44^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , durante um período mínimo de 36 h e máximo de 72 h.

#### 5.4.4 Leitura e determinação dos resultados

A microplaca foi colocada na câmara UV (Figura 31) e contados todos os poços em que se observou uma fluorescência azul, como positivos (Figura 32).

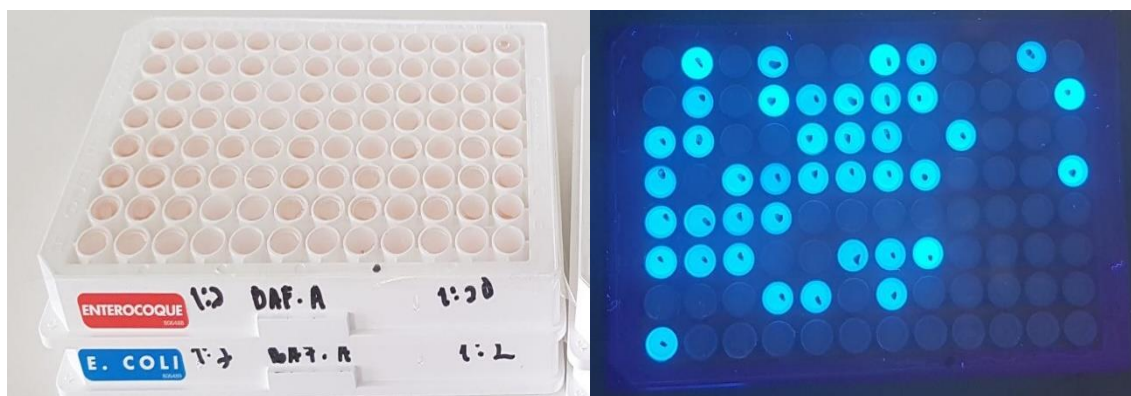


Figura 31 - Microplacas de *Escherichia coli* e Enterococos.

Figura 32 - Microplaca na câmara UV.

**Nota:** A leitura pode ser realizada em qualquer momento após as 36 h e até às 72 h, uma vez que a fluorescência não sofre alterações com o tempo.

Para cada diluição foi registado o número de poços positivos. O número mais provável (NMP) é uma estimativa estatística de densidade de microrganismos, assumindo-se que corresponde a uma distribuição de Poisson nos volumes inoculados; os intervalos de confiança estão associados ao NMP. Os cálculos foram realizados utilizando tabelas do NMP. Nos poços positivos, os resultados foram expressos da seguinte forma:  $< n/100$  ml, sendo **n**, o NMP, para um poço positivo, na diluição utilizada (ISO 19458, 2006).

### 5.5 Pesquisa e quantificação de *Escherichia coli* pelo método de Colilert

O método de Colilert foi desenvolvido pelos Laboratórios IDEXX e tem por base a DST (Defined Substrate Technology). O substrato definido, substrato hidrossolúvel, é utilizado como fonte de nutrientes vitais para os microrganismos a quantificar. A tecnologia pode ser ainda designada como autoanálise, porque existe uma mudança de cor produzida pelos microrganismos-alvo, sem que haja a necessidade de testes de confirmação. Para realizar o teste, juntou-se o reagente em pó à amostra, verteu-se a amostra para o Quanti-trays - que foi selado e que foi a incubar a  $36 \pm 2^\circ\text{C}$ , durante  $(20 \pm 2)$  h, para a pesquisa de Bactérias Coliformes e *E. coli*. As mudanças de cor específicas indicaram a presença dos microrganismos-alvo (Edberg *et al.* 1988).

Este método pode ser aplicado a todos os tipos de água, incluindo amostras contendo um elevado teor de matéria orgânica e/ou uma elevada carga de bactérias heterotróficas. Para a quantificação *Escherichia coli*, em águas marinhas, torna-se necessária a realização de

uma pré-diluição 1:10, com água esterilizada (ISO 9308-2, 2012). A forma de execução do método é demonstrada na Figura 33.

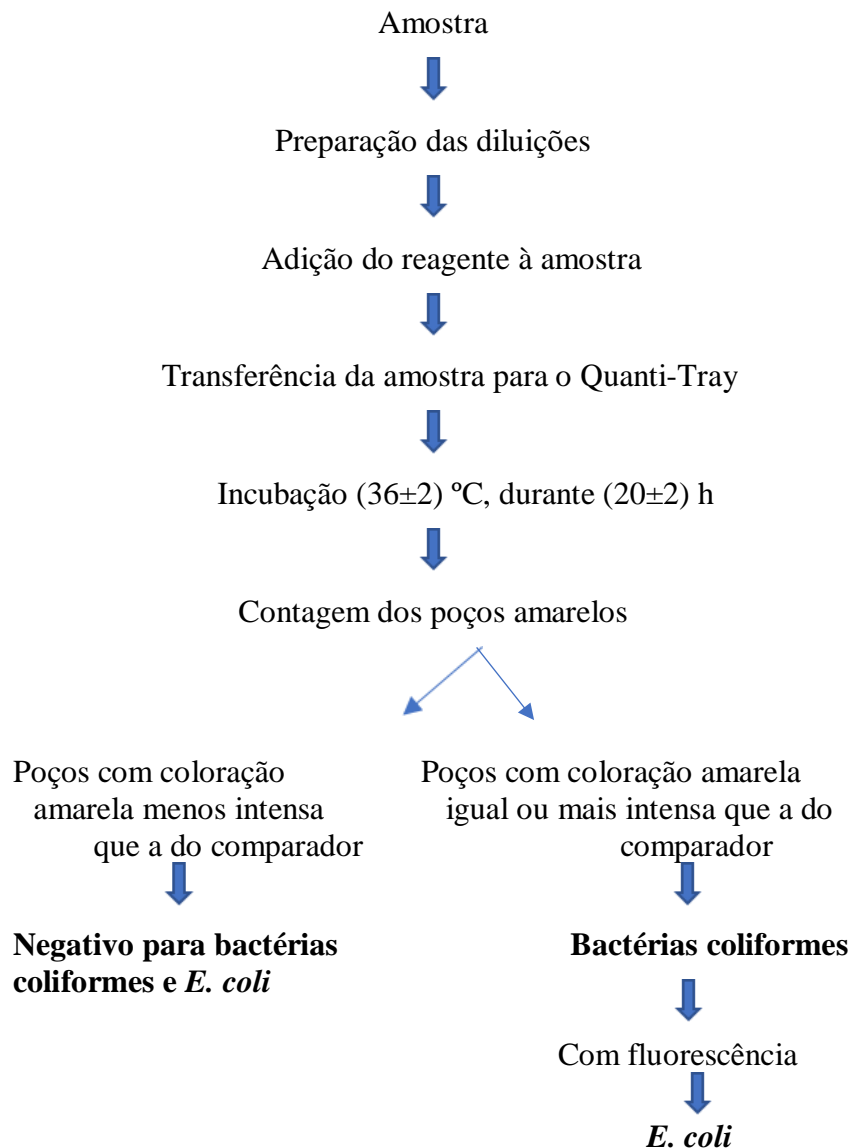


Figura 33 - Fluxograma da execução pelo método de COLILERT.

(LRA, 2017)

Juntou-se o conteúdo da embalagem de Colilert-18 a 100 ml de amostra ou da sua diluição. Uma vez o meio completamente dissolvido, transferiu-se a amostra para um Quanti-Tray e procedeu-se à sua selagem numa Seladora. Os Quanti-Tray incubaram numa estufa, a  $(36\pm 2)$  °C, durante  $(20\pm 2)$  h, para a pesquisa e quantificação de bactérias coliformes e *Escherichia coli*.

Após a incubação foram registados os poços que apresentavam uma coloração amarela (Figura 34), igual ou mais intensa do que a do comparador, (Figura 35) e consideraram-

se positivos para as bactérias coliformes, os poços que apresentaram cor amarela igual ou mais intensa do que a do comparador e, simultaneamente emissão de fluorescência sob a radiação UV, foram considerados como positivos, para *Escherichia coli*. (IDEXX, 2016).



Figura 34 - Poços com coloração amarela

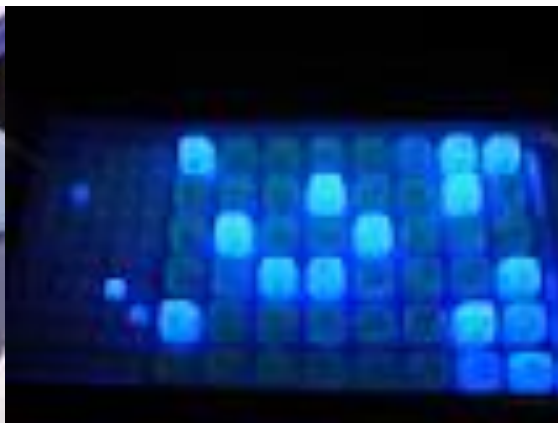


Figura 35 - Poços com fluorescência

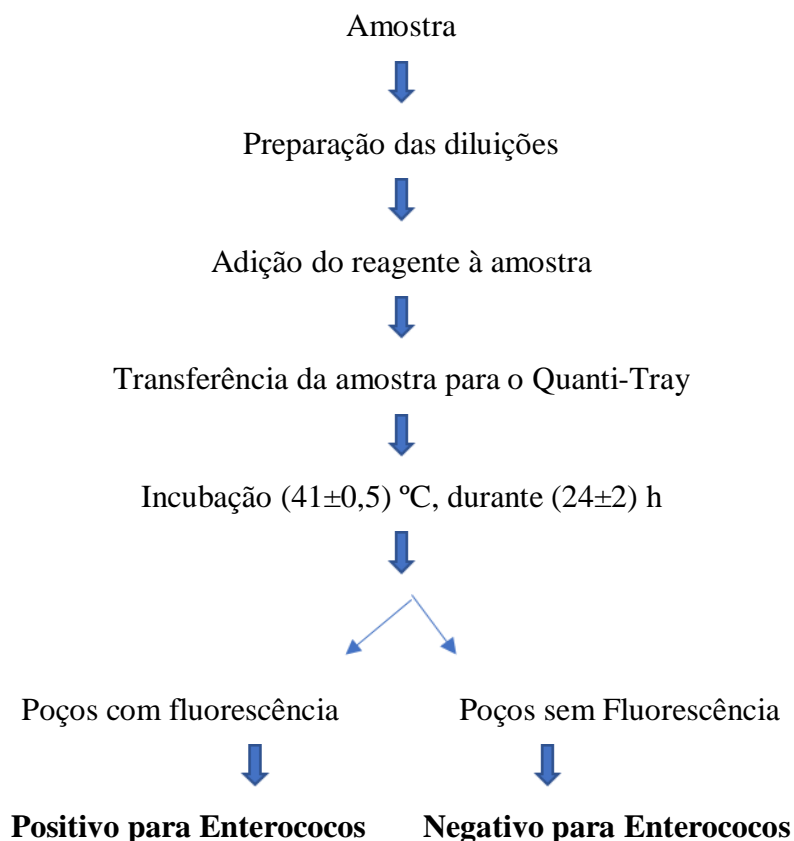
(IDEXX, 2016)

Com semelhança ao método anterior, os resultados deste método exprimem-se sob forma de NMP, por 100 ml de amostra. Os cálculos de NMP foram efectuados através de consulta de Tabelas estatísticas.

## 5.6 Pesquisa e quantificação de Enterococos intestinais pelo método Enterolert

A técnica Quanti-Tray Enterolert é específica para a detecção de Enterococos. Este método utiliza como nutriente o substrato indicador 4-metilumbeliferona- $\beta$ -D-glucósido que, quando metabolizado pela enzima  $\beta$ -glucosidase, presente nos Enterococos, liberta o grupo fluorocromo. Os derivados metil umbeliferil possuem a vantagem de ser bastante sensíveis e específicos, facilmente detectáveis sob radiação ultravioleta (365 nm) (Budnick, Howard & Mayo, 1996).

Este método pode ser aplicado a todo o tipo de água, incluindo amostras contendo elevado teor de matéria orgânica ou uma elevada carga de bactérias heterotróficas. Para a quantificação de Enterococos em águas marinhas, torna-se necessária a realização de uma pré-diluição (1:10) com água esterilizada. A Figura 36 demonstra a forma de execução do método.



(LRA, 2017)

Figura 36 - Fluxograma da execução pelo método de Enterolert

Adicionou-se o conteúdo da embalagem de Enterolert a 100 ml de amostra, estando o meio completamente dissolvido, transferiu-se a amostra para um Quanti-Tray e procedeu-se à sua selagem. Os Quanti-Tray foram incubados numa estufa a  $(41 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ , durante  $(24 \pm 2)$  h, para a pesquisa e quantificação de bactérias Enterococos. Após a incubação foram registados como positivos os poços, coloração amarela (Figura 37), que apresentaram fluorescência (Figura 38).



Figura 37 - Comparador Quanti-Tray

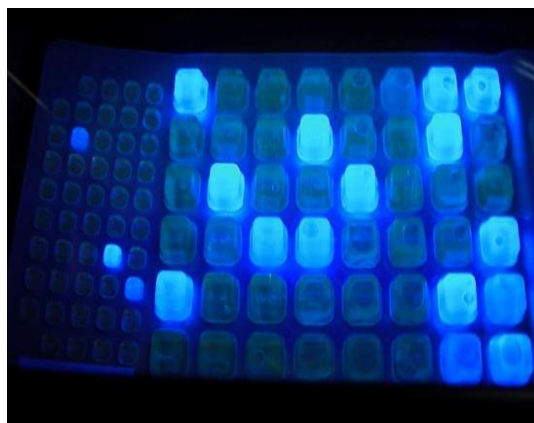


Figura 38 - Enterolert, tabuleiro de substrato definido para Enterococos, após incubação

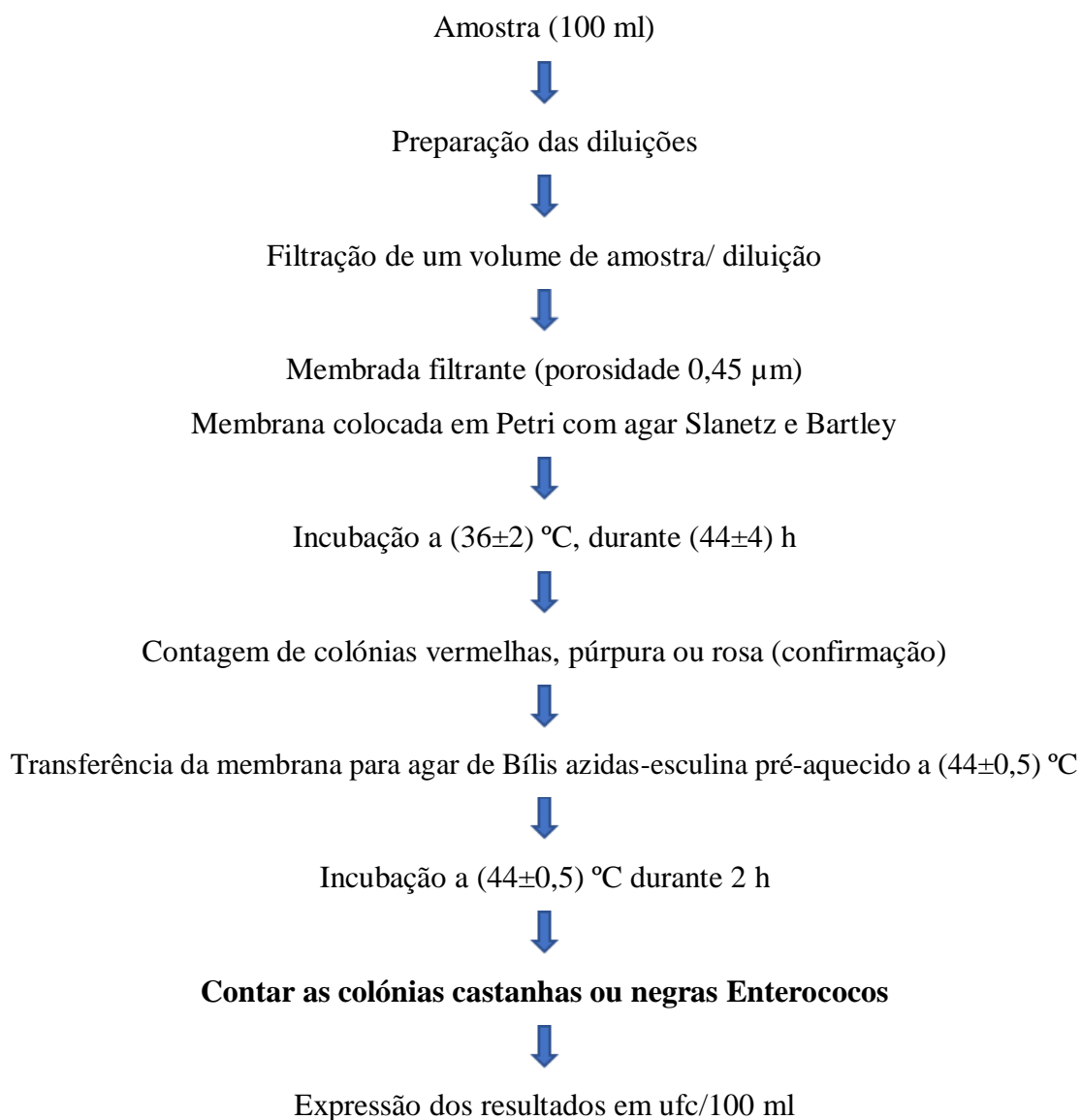
(INDEXX, 2018)

Para este método, os resultados exprimem-se sob forma de NMP, por 100 ml de amostra. Os cálculos de NMP foram efectuados através de consulta de Tabelas estatísticas.

### **5.7 Pesquisa e quantificação da bactéria Enterococos intestinais, pelo método de Filtração por Membrana**

O método de filtração por membrana aplica-se em águas naturais doces, águas naturais salinas e águas de consumo (tratadas e não tratadas), com baixa carga microbiana e isentos de matéria em suspensão. A Figura 39 demonstra a forma de execução do método.

Agitou-se o frasco da amostra para obter uma distribuição uniforme dos microrganismos, a filtração da amostra ou das suas diluições, através de membrana filtrante de porosidade  $0,45\mu\text{m}$ , que foi colocado sobre o meio de cultura selectivo, em seguida, incubado a  $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$ , durante  $(44 \pm 4)$  h. Após a incubação, contaram-se as colónias típicas de cor vermelha, púrpura ou rosa. (Figura 40) A confirmação destas colónias foi efectuada transferindo a membrana para o meio de cultura contendo BÍlis azida esculina, pré aquecida a  $44 \pm 0,5 ^\circ\text{C}$ . Os Enterococos intestinais hidrolisaram a esculina do meio e o produto desta hidrólise combinou-se com o ião ferro, para dar um composto de coloração enegrecida que se difunde no meio, em 2 h (Figura 42) (ISO 7899-2, 2000).



(LRA, 2012)

Figura 39 - Fluxograma Execução pelo método Filtração por Membrana de Enterococos *intestinalis*.

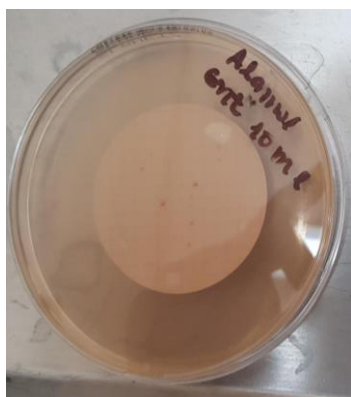


Figura 40 - Placa com colónias típicas de cor vermelha



Figura 41 - Placa com os pontos marcados das colónias típicas de cor vermelha, contadas



Figura 42 - Placa com colónias típicas confirmadas

Os resultados exprimem-se sob forma de unidade formadora de colónias (UFC) por 100 ml de amostra.

### 5.8 Pesquisa e quantificação da bactéria de *E. coli*, pelo método de Filtração por Membrana

Procedeu-se à filtração da amostra ou das suas diluições, através de membrana filtrante de porosidade 0,45 µm, que foi colocada sobre o meio de cultura gelosado seletivo, contendo lactose e incubado a  $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$ , durante  $(21 \pm 3)$  h, para a pesquisa de bactérias coliformes, de coliformes fecais e *E. coli*. Após incubação, observou-se o crescimento das colónias (Figura 43), tendo-se contado como bactérias coliformes presumíveis todas as colónias de cor amarela ou laranja, independentemente do seu tamanho e de mostrarem ou não o desenvolvimento de cor amarela no meio de cultura por baixo da membrana filtrante.

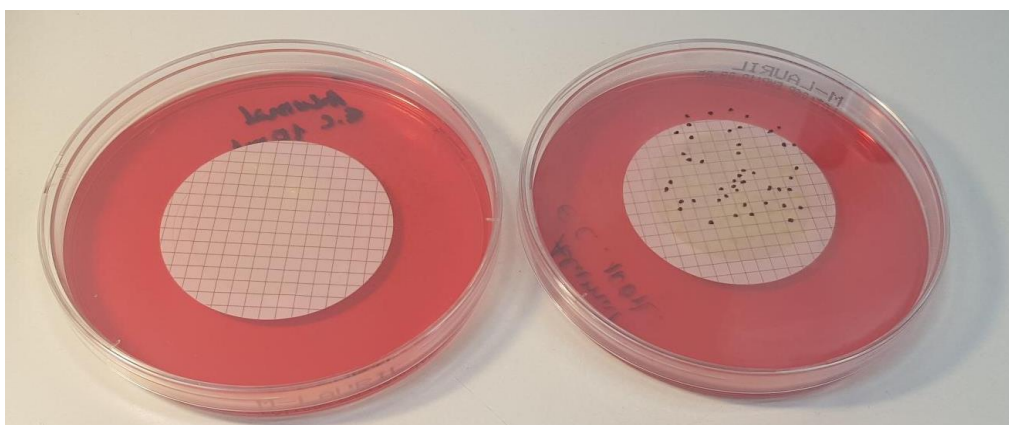


Figura 43 - Placa da membrana no meio filtrante e placa com contagem do meio filtrante

Para os testes de confirmação replicaram-se todas as colónias presumíveis de bactérias coliformes ou um número representativo (pelo menos cinco colónias de cada tipo) para um meio de cultura nutritivo (não selectivo) para se proceder ao teste da oxidase.

Consideram-se bactérias coliformes todas as colónias que fermentam a lactose e são oxidase negativa.

Todas as colónias confirmadas como bactérias coliformes foram replicadas para tubos com meio de cultura Fluorocult-DEV, a  $(44 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ , durante  $(21 \pm 3)$  h (Figura 44) após a incubação observou-se a fermentação da lactose e a fluorescência sob a radiação

ultravioleta, a mudança de cor do meio, para amarelo (Figura 45), confirmou-se como coliformes fecais.

Todos os tubos confirmados como coliformes fecais foram observados sob a radiação ultravioleta, para a pesquisa de *E. coli*. Nos casos de fluorescência negativa, após 24 h de incubação, este período foi prolongado por mais ( $21 \pm 3$ ) h, após que se observou a emissão de fluorescência que, sendo positiva, é indicativa da presença de *E. coli*. A fluorescência negativa pressupõe a efectivação de um teste de produção de indol, adicionando 0,2 a 0,3 ml de reagente de Kovac`s. O aparecimento de um anel vermelho confirma a presença de *E. coli*.

Sendo a fluorescência positiva, não é necessária a realização da prova de produção de indol, uma vez que, para a identificação de *E. coli*, é suficiente detectar a presença da enzima  $\beta$ -D-glucuronidase (MUG+).

Caso a prova de fluorescência, após 48 h de incubação no meio de Fluorocult-DEV, se apresente negativa, executa-se a prova de Indol. Se esta prova for negativa significa a ausência de *Escherichia coli*.

Se a prova de indol for positiva, é necessária a realização de testes bioquímicos complementares, como a prova de utilização de citrato, como única fonte de carbono.

A partir do isolamento em nutriente agar, replicam-se as colónias para o meio de Simmons Citrato Agar, que vai a incubar a ( $36 \pm 2$ ) °C, durante ( $44 \pm 4$ ) h. A *Escherichia coli* não tem capacidade de utilizar o citrato como única fonte de carbono, pelo que não deverá revelar crescimento neste meio de cultura.



Figura 44 - Tubos de ensaio com Fluorocult

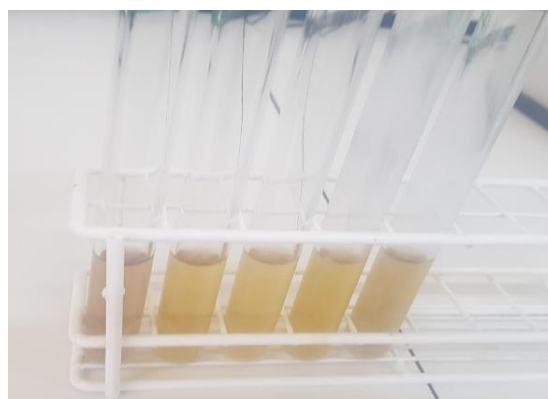


Figura 45 -Tubos de ensaio que passaram para coloração amarela.

Todos os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colónias por 100 ml da amostra (ufc/100 ml) (ISO9308-1:2000).

## **5.9 Controlo da qualidade interno e limpeza e higiene das salas de trabalho**

O controlo da qualidade interno tem como objectivo assegurar que todo o processo analítico está controlado e que, conseqüentemente, os resultados são fiáveis.

A limpeza do chão das salas do sector de Biologia é efectuada diariamente. A limpeza das bancadas de trabalho foi efectuada antes e depois das sessões de trabalho analítico. pelos técnicos do sector, utilizando, para o efeito, soluções desinfectantes e bactericidas ou álcool a 70% (v/v).

As rampas de filtração foram esterilizadas à chama, antes de se iniciar o procedimento analítico e desinfectadas com álcool a 70% (v/v).

As superfícies e o interior dos equipamentos foram sujeitos a operações de limpeza periódicas: mensal (estufas e câmaras de fluxo laminar), trimestral (frigoríficos e autoclaves) ou anual (arca congeladora).

### **5.9.1 Controlo da qualidade dos Meios de cultura, soluções de diluição, reagentes e águas utilizadas na sua preparação**

O objetivo do controlo da qualidade de meios de cultura é garantir a confiança dos resultados e que os meios de cultura utilizados serão sempre aceites com uma determinada sensibilidade.

O controlo dos meios de cultura e das soluções de diluição foi efectuado após a sua preparação e depois de se encontrarem à temperatura ambiente, para cada lote de meio de cultura ou solução preparada internamente, no laboratório.

### **5.9.2 Controlo ambiental**

O controlo da qualidade ambiental foi efectuado para verificar se, durante o processamento das amostras, não houve contaminação por factores ambientais. Este controlo é efectuado com placas de sedimentação, de 90 mm de diâmetro, contendo gelose nutritiva e aberta, durante 15 min, nas zonas de trabalho, enquanto se processavam as amostras.

As placas foram incubadas a 30°C, durante 3 dias, e foi efectuada a contagem das colónias que se desenvolveram. Na Tabela 6 apresenta-se os critérios de aceitação para o controlo ambiental.

Tabela 6 - Critérios de aceitação para o controlo ambiental

<b>Controlo ambiental</b>	
<b>Placa de sedimentação</b>	
Bancada	<10 ufc / placa /15 min
Câmara de fluxo laminar	0 ufc / placa /15 min
Placas de contato	<10 ufc / 25 cm <sup>2</sup>

Sempre que os valores encontrados excederam os critérios de aceitação, foi realizada uma análise das causas, para avaliação do impacto, nos resultados das amostras efectuadas. Quando, dessa análise, não resultaram quaisquer conclusões, os resultados das amostras foram desprezados e repetidas as recolhas das amostras, sendo realizadas novas análises.

### **5.10 Controlo de qualidade para os métodos analíticos quantitativos**

O controlo da qualidade dos métodos analíticos tem por objectivo avaliar:

- Modo como é efectuada a limpeza das salas de trabalho;
- Modo como se efectua o controlo interno da qualidade;
- Critério de aceitação dos resultados;
- Critérios de aceitação dos equipamentos.

#### **5.10.1 Análise dos brancos**

A inclusão de brancos, em cada série de amostras efectuadas, permite avaliar as condições de esterilidade ao longo do processo analítico, bem como eventuais alterações dos meios de cultura e reagentes. Foi efectuada um ensaio de branco, por dia, por cada parâmetro e por cada analista, sendo os resultados aceites apenas quando não houve nenhum crescimento. Nos casos em que se registou crescimento, num ensaio em branco, foi feita uma análise das causas, para avaliação do impacto nos resultados das amostras efectuadas

nesta série. Face à ausência de uma conclusão, os resultados desta amostra foram desprezados e repetidas as amostras e efectuadas novas análises.

### **5.10.2 Análise dos duplicados**

A análise dos duplicados permite avaliar o desempenho dos analistas, a correcta aplicação do método de ensaio, repetibilidade e a detecção de possíveis erros aleatórios.

Foi efectuado um ensaio de branco, por dia, por cada parâmetro e por cada analista. A avaliação dos resultados foi realizada de acordo com os critérios de precisão (CP), calculados com base nos duplicados dos anos anteriores e com o mínimo de 15 resultados para cada parâmetro.

Quando os valores dos ensaios em duplicados não cumpriram o estipulado, foi feita uma análise de causa, para avaliação do impacto dos resultados das amostras efectuadas nesta série; no caso de análises inconclusivas, os resultados desta amostra foram desprezados, sendo repetidas as recolhas das amostras e efectuadas novas análises.

Quando o resultado a emitir para uma dada amostra resultou de uma análise de duplicados, o valor dado como resultado foi sempre o valor mais elevado.

#### **5.10.2.1 Determinação dos critérios de precisão (CP)**

Os critérios de precisão são calculados anualmente com base nos valores de duplicados obtidos na rotina laboral, para cada parâmetro (carta de duplicados). Os valores dos duplicados são convertidos em logaritmos e calculada a sua amplitude. Calcula-se a média dividindo o somatório de amplitude dos logaritmos pelo nº de observações.

De acordo com o critério de precisão (CP) determinado (equação 1), os valores dos duplicados do ano seguinte são, ou não, aceites com uma precisão de 95%.

$$CP = 3,27 * \text{média} \qquad \text{Equação (1)}$$

Em que:

CP- Critério de precisão;

Média – É a media dos valores dos duplicados calculados durante o ano.

### 5.10.3 Cartas de controlo

A partir do material de referência quantitativo são construídas cartas de controlo a partir da análise de 20 lentículas com um número quantificável de microrganismos utilizando os métodos de rotina, em dias consecutivos, ou o mais próximo possível. Os resultados destas contagens são convertidos em logaritmos e com estes valores calculam-se a média e o desvio-padrão (equação 2).

$$S=0,8865x \hat{R} \qquad \hat{R} = \frac{1}{(n-1)} \sum_{i=2}^n |X_i - X_{i-1}| \qquad \text{Equação (2)}$$

Em que:

- n- Número de observações;
- s- Desvio padrão;
- $\hat{R}$  - Amplitude móvel;
- $X_i$ - Posição/número de ordem da observação.

Na construção da carta são calculados os limites de controlo inferiores e superiores de aviso e de acção, considerando o seguinte:

Limites de aviso:  $(x \pm 2 s)$

Limites de acção:  $(x \pm 3 s)$ .

Os critérios de análise das cartas de controlo são os seguintes:

- Existência de um ponto que se encontra fora do limite de alarme;
- Existência de 2 resultados consecutivos fora do mesmo limite aviso;
- Existência de 9 resultados consecutivos do mesmo lado da média;
- Existência de 6 resultados consecutivos de denotam a tendência crescente ou decrescente.

Na obtenção de valores que se situem fora dos limites de controlo, foram verificadas as condições de preparação dos meios de cultura utilizados, as temperaturas de incubação e testes de confirmação, e estabelecidas as acções correctivas que se julguem necessárias.

### 5.11 Controlo de qualidade analítico para métodos miniaturizados

Nos métodos miniaturizados foram efectuados os seguintes controlos:

- Um branco / parâmetro / analista por dia de trabalho;
- Um duplicado / parâmetro / analista por dia de trabalho;
- Um ensaio em paralelo / parâmetro / mensalmente;
- Um ensaio com o material de referência / parâmetro / quinzenalmente;
- Um controlo positivo (controlo de eficácia do crescimento) e controlo negativo (controlo de inibição de crescimento) no início da utilização de cada novo lote, interno ou externo.

### **5.11.1 Ensaio em paralelo**

Os ensaios em paralelo são efectuados mensalmente, mediante a análise da mesma amostra por analistas diferentes. Os resultados obtidos permitiram avaliar a precisão intermédia e são utilizados para o cálculo das incertezas associadas aos diferentes métodos.

### **5.11.2 Controlo de qualidade externo / Ensaio interlaboratoriais**

Os ensaios interlaboratoriais permitem avaliar a reprodutibilidade dos resultados, o desempenho dos laboratórios por comparação com outros laboratórios e comparar os métodos. Os relatórios ou os resultados enviados pelas entidades promotoras são analisadas quando recebidos. É verificado se os resultados obtidos nos laboratórios estão de acordo com os esperados e se existe tendência positiva ou negativa dos resultados que vão obtendo, ao longo das várias distribuições.

Sempre que os relatórios contemplem o cálculo de z-score, os resultados são considerados não satisfatórios se apresentarem valores  $< - 3,01$  ou  $> +3,01$ .

Sempre que haja valores que não se situem dentro dos limites aceitáveis, é preenchido um relatório de não conformidade e são verificadas as condições de preparação dos meios de cultura utilizados, a temperatura de incubação e testes de confirmação, de modo que se possam estabelecer as acções correctivas que se julgarem necessárias.

## CAPÍTULO 6

### 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A monitorização da qualidade das águas balneares é de extrema importância pois os resultados das análises são utilizados para avaliar a qualidade e fornecer informação ao público sobre as zonas balneares. Das 40 amostras de águas balneares alvo de estudo no presente trabalho, para os parâmetros *Escherichia coli* e Enterococos intestinais, 39 amostras foram analisadas utilizando o método de Microplaca e 1 foi analisada pelos métodos de Filtração por Membrana, Microplaca e Colilert/Enterolert. Os resultados de *E. coli* e Enterococos das águas balneares que apresentaram indícios de contaminação fecal, encontram-se descritos por concelho onde se relacionou o Número Mais Provável, por 100 ml durante os dias de amostragem, por concelho.

#### 6.1 Resultado das análises microbiológicas de Cascais

O concelho de Cascais possui diversas praias, diferentes entre si e pertencentes à zona designada por Costa do Estoril, somente uma praia apresenta actualmente uso suspenso devido à falta de segurança decorrente da inexistência de sedimentos (areia), a Praia do Abano.

Em 2017, a grande maioria das águas balneares do concelho apresentaram níveis de qualidade excelentes, excepto as praias da Duquesa e Conceição. Nas Figuras 46 e 47, são apresentados os resultados das águas balneares alvo deste estudo em Cascais.

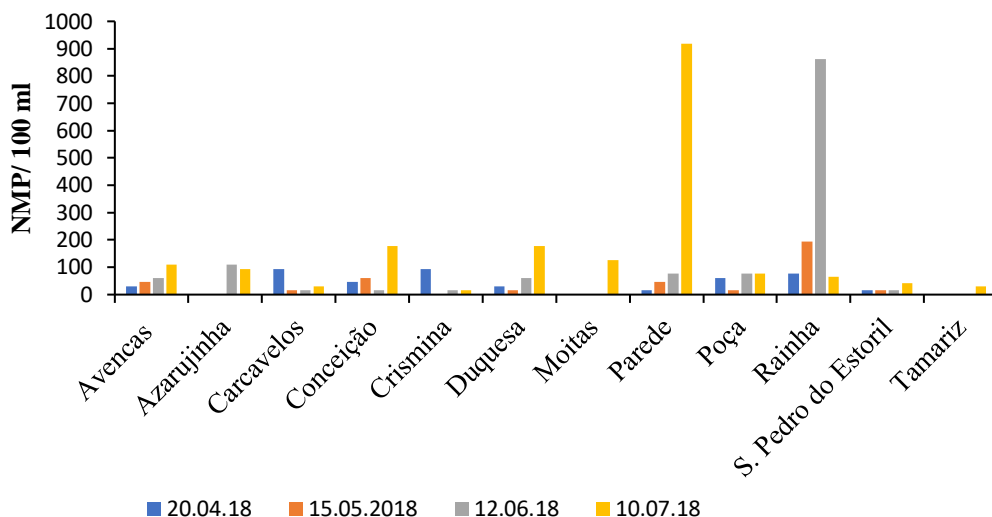


Figura 46 - Resultados das análises de Escherichia coli das amostras do conselho de Cascais

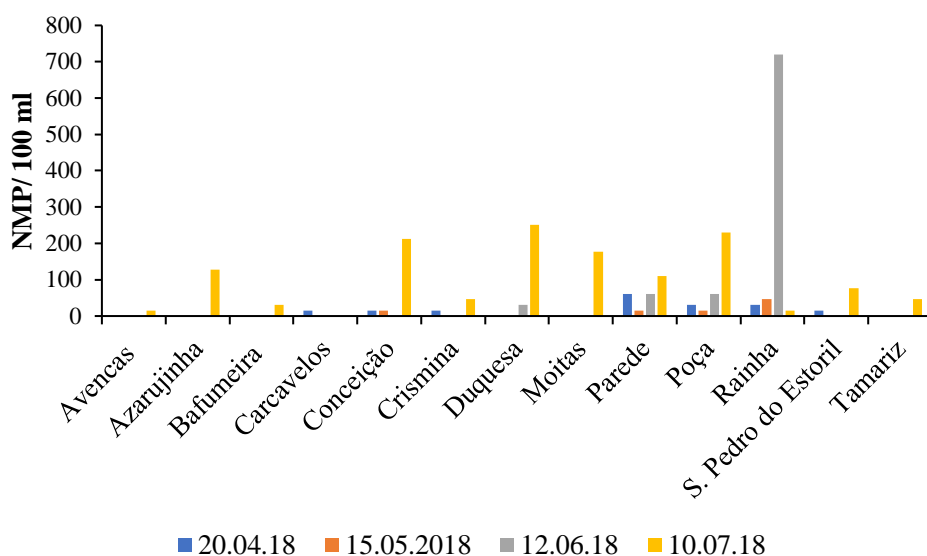


Figura 47 - Resultados das análises de Enterococcos intestinais das amostras do conselho de Cascais

No concelho de Cascais, a amostra da Praia da Rainha recolhida no dia 12.06.18, o resultado das análises para os parâmetros *E. coli* e Enterococcos intestinais estão muito acima da norma de qualidade (Anexo I do Decreto-Lei n.º 113/2012), assim como a amostra recolhida na praia da Parede, no dia 10.07.2018, para o parâmetro *E. coli*.

As restantes amostras analisadas neste conselho apresentaram contaminação fecal, mas dentro dos valores da norma de qualidade, ou seja, qualidade excelente ou boa.

## 6.2 Resultado das análises microbiológicas de Mafra

O Concelho de Mafra possui 11 quilómetros de costa e 13 praias, a sua maioria localizadas na pitoresca vila piscatória da Ericeira. Essas praias são de mar batido, ar bastante iodado, areia grossa e clara, quase todas elas surgem enquadradas por bonitas arribas rochosas. Nas Figuras 48 e 49 são apresentados os resultados da monitorização das águas balneares analisadas neste concelho.

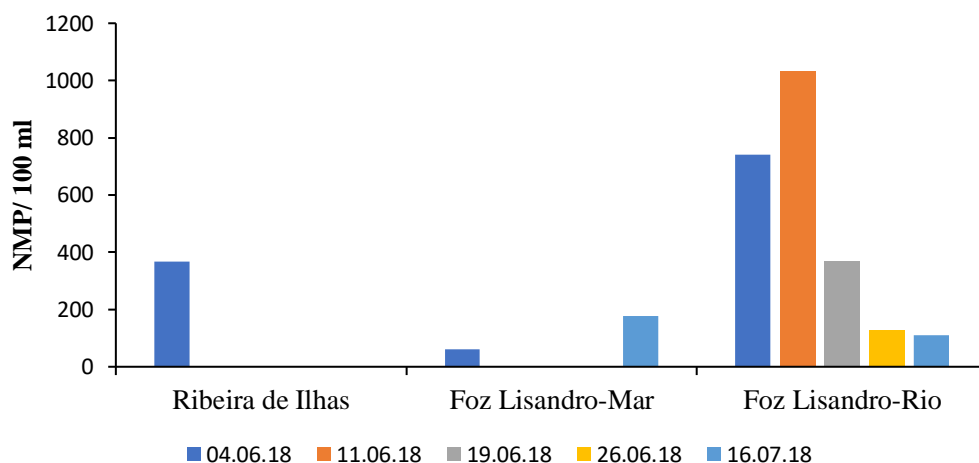


Figura 48 - Resultados das análises de *Escherichia coli* das amostras do concelho de Mafra.

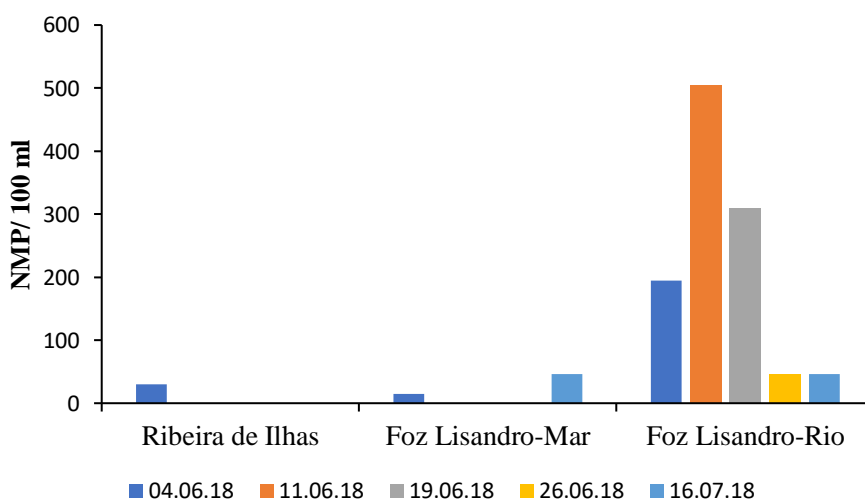


Figura 49 - Resultados das análises de *Enterococcus* intestinais das amostras do concelho de Mafra

No conselho de Mafra, as amostras analisadas que apresentaram indícios de contaminação fecal foram: Ribeiras das Ilhas, Foz Lisandro Mar e Rio. A amostra de água balnear com maior concentração de contaminação fecal para os dois parâmetros analisados *E. coli* e *Enterococcus* intestinais foi a da Foz Lisandro Rio nos dias 11.06.18. e 16.07.18. No dia

11.06.18 houve contaminação fecal de curta duração, e tem se verificado que este tipo de poluição tem ocorrido várias vezes durante o ano. Tal contaminação pode ser devida ao rio Lisandro afluente à praia.

As praias da Ribeira de ilha e Foz Lisandro Mar apresentaram indícios de contaminação fecal para os dois parâmetros analisados, mas estando todas as amostras abaixo dos valores da norma de qualidade para a classificação de qualidade excelente (Anexo I do Decreto-Lei n.º 113/2012).

As restantes amostras analisadas deste conselho não apresentaram indícios de contaminação para os ambos os parâmetros.

### 6.3 Resultado das análises microbiológicas do conselho de Sintra

Actualmente o concelho de Sintra possui 6 águas balneares monitorizadas, existem outras, mas de difícil acesso que não dispõem de apoios de praia nem vigilância. As águas balneares de Sintra foram consideradas de qualidade “Excelente” nos últimos anos. Em 2018, as praias do Magoito e Maças apresentaram focos de poluição fecal durante o período de Maio a Junho. Os resultados da monitorização são apresentados nas Figuras 50 e 51.

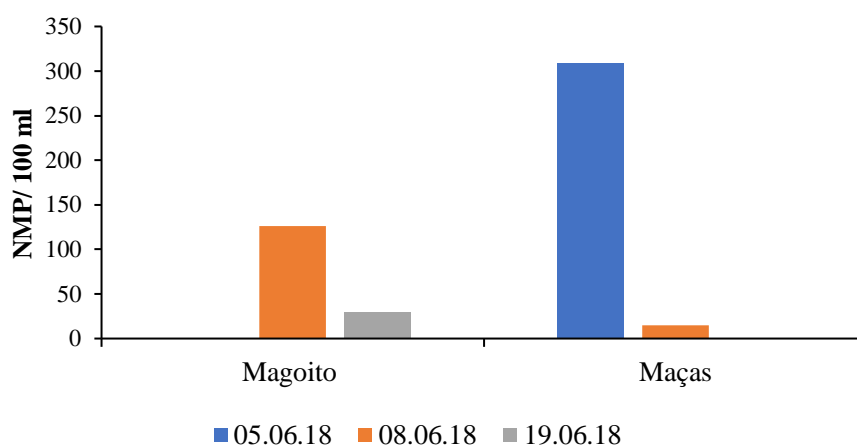


Figura 50 - Resultados das análises de *Escherichia coli* das amostras do concelho de Sintra

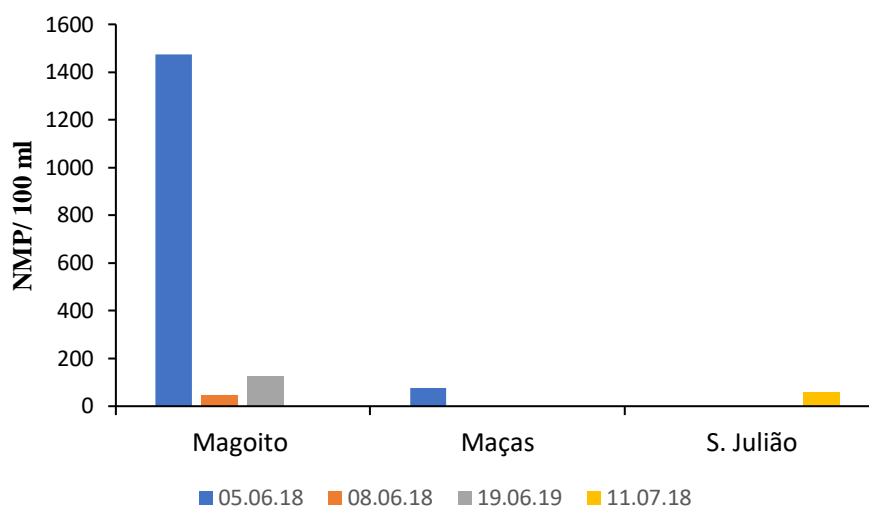


Figura 51 - Resultados das análises de Enterococos intestinais das amostras do concelho de Sintra

No concelho de Sintra, a amostra de água balnear da praia das Maças recolhida no dia 05.06.18, apresentou concentrações elevadas de contaminação fecal para o parâmetro *E. coli*, estando ainda assim a abaixo dos valores da norma de qualidade para a classificação de qualidade boa ou aceitável (Anexo I do Decreto-Lei n.º 113/2012).

A amostra de água balnear da praia do Magoito apresentou concentrações muito elevadas (1474 NMP/100 ml), ultrapassando os valores da norma da qualidade de contaminação de Enterococos intestinais no dia 05.07.2018. Tal facto deveu-se à falha de energia ocorrida na Estação de Tratamento de Águas Residuais do Magoito, que teve como consequência a descargas de águas residuais sem o devido tratamento, na segunda maior praia do concelho de Sintra, originando assim poluição de curta duração.

A Praia de São Julião, apresentou contaminação fecal somente no parâmetro Enterococos intestinais, mas dos valores da norma para a classificação de qualidade excelente.

#### 6.4 Resultado das análises microbiológicas de Oeiras

As águas balneares do concelho de Oeiras apresentam boa qualidade. A qualidade das águas e dos areais de região de Oeiras continua a ser alvo da distinção de prémios nacionais, tendo sido a Praia da Torre distinguida, em 2017, como Praia com Qualidade Ouro pela Quercus. Os resultados das análises efectuadas neste conselho são apresentados nas Figuras 52 e 53.

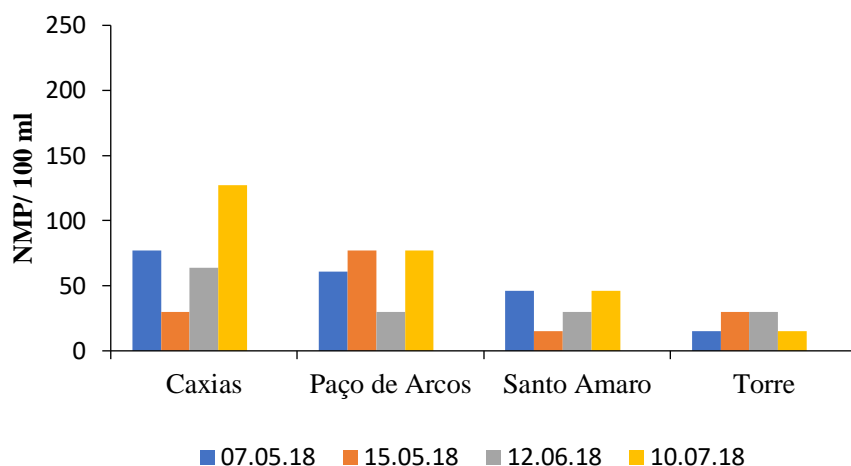


Figura 52 - Resultados das análises de *Escherichia coli* das amostras do concelho de Oeiras

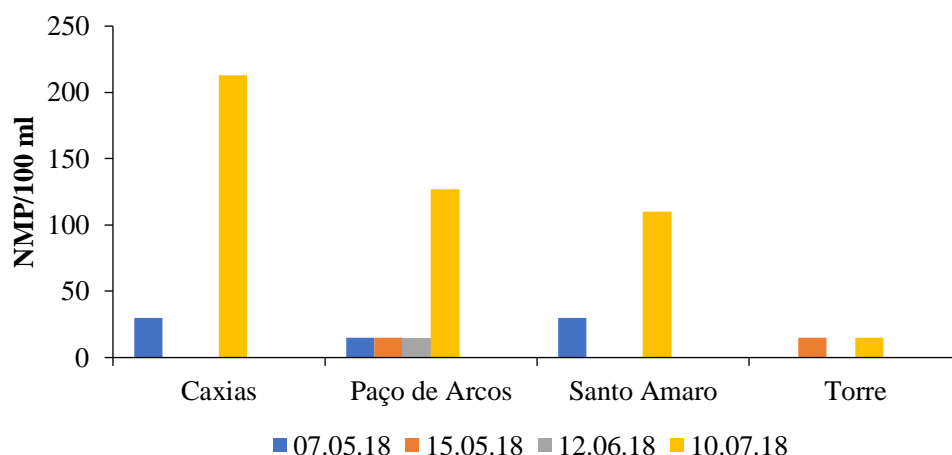


Figura 53 - Resultados das análises de Enterococos intestinais das amostras do concelho de Oeiras.

Das amostras recolhidas no concelho Oeiras, nenhuma apresentou poluição fecal significativa, estando todas as amostras abaixo dos valores da norma de qualidade para a classificação de qualidade excelente ou boa (Anexo I do Decreto-Lei n.º 113/2012). A amostra com os valores mais elevados para os dois parâmetros estudados é a de Caxias recolhida no dia 10.07.2018 e seguida pela amostra de Paços de Arco recolhida no dia 10.07.18 (Figuras 52 e 53).

As amostras das praias de Santo Amaro e Torre apresentaram indícios de contaminação para os dois parâmetros *Escherichia coli* e Enterococos (Figuras 50 e 51), mas os valores são inferiores ao limite de deteção.

## 6.5 Resultado das análises microbiológicas de Almada

A avaliação da qualidade da água das praias do concelho de Almada tem sido efectuada periodicamente, sendo atribuída classificação global “EXCELENTE”, de 2011 a 2017. Esta classificação tem contribuído ao longo dos anos para a atribuição do galardão “Bandeira Azul” às praias do município.

Em 2018 e até à data da realização deste estudo, a situação não foi diferente dos anos anteriores, como se observa nas Figuras 54 e 55. Todas as águas balneares analisadas, neste concelho, estiveram abaixo do valor da norma de qualidade máximo referido.

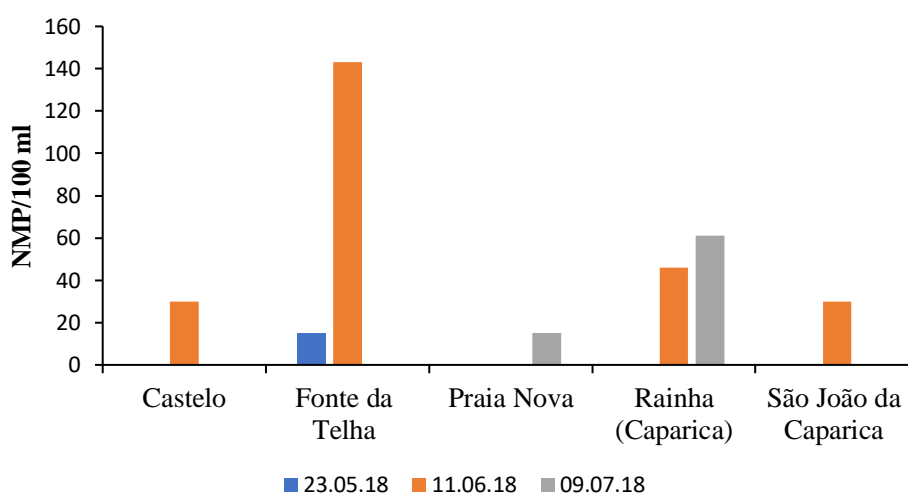


Figura 54 - Resultados das análises de *Escherichia coli* das amostras do concelho de Almada

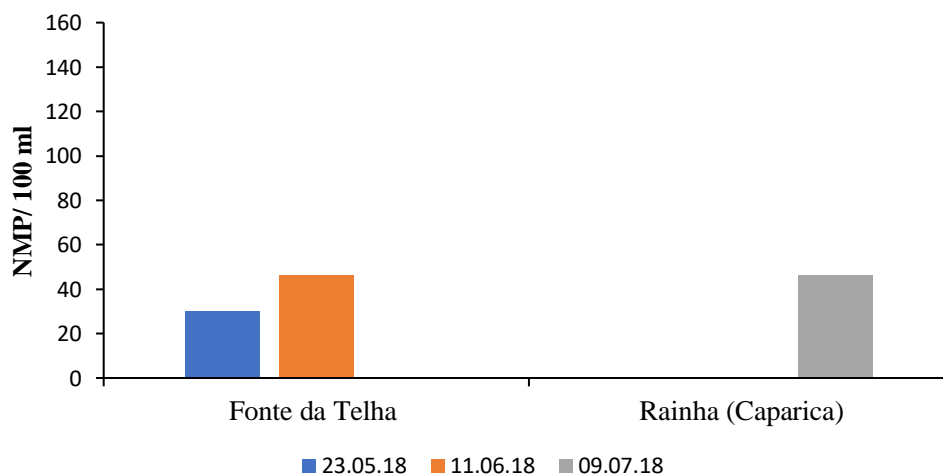


Figura 55 - Resultados das análises de Enterococcos intestinais das amostras do concelho de Almada

Das amostras recolhidas no concelho de Almada, nenhuma apresentou poluição fecal significativa, estando todas as amostras abaixo dos valores da norma de qualidade para a

classificação de qualidade excelente (Anexo I do Decreto-Lei n.º 113/2012). A amostra com os valores mais elevados dos dois parâmetros estudados é a da Fonte da Telha recolhida no dia 11.06.2018 (Figuras 54 e 55), seguida da amostra da praia da Rainha (Caparica).

As amostras das praias Castelo, Praia Nova e São João apresentaram indícios de contaminação fecal somente para o parâmetro *Escherichia coli* (Figura 54), tendo-se verificado que para o parâmetro Enterococos os valores são inferiores ao limite de deteção.

## **6.6 Resultado das análises microbiológicas do conselho de Sesimbra**

O concelho de Sesimbra possui ao longo da sua costa marítima 6 praias, 4 das quais monitorizadas pela Agência Portuguesa do Ambiente. A avaliação da água das praias do concelho de Sesimbra tem sido efectuada periodicamente, sendo atribuída classificação global “Excelente”, até à data. Esta classificação tem contribuído ao longo dos anos para a atribuição do galardão “Bandeira Azul” às praias do concelho.

Este ano não foi diferente, os resultados da monitorização da qualidade das águas balneares das amostras analisadas neste conselho tiveram resultados satisfatórios, o parâmetro Enterococos intestinais apresentou concentrações < 15 NMP/100 ml em todas as amostras analisadas, somente a lagoa da albufeira apresentou 15 NMP/100 ml para o parâmetro *Escherichia Coli*, na amostra recolhida no dia 22.05.2018, mas ainda abaixo dos valores da norma de qualidade para a classificação de qualidade excelente (Anexo I do Decreto-Lei n.º 113/2012).

## **6.7 Resultado das Análise da comparação dos três métodos**

Devido à existência de diversos métodos para análise microbiológica disponíveis comercialmente, para a deteção *E. coli* e Enterococos intestinais em águas, têm sido realizadas várias pesquisas visando testar a eficiência dos mesmos na avaliação da qualidade microbiológica de águas de diferentes origens.

Numa amostra recolhida numa água balnear interior, foi realizado ensaios utilizando diferentes técnicas para pesquisa e quantificação de *Escherichia coli* e Enterococos intestinais, as técnicas utilizadas foram: filtração por membrana, Microplacas e Colilert/

Enterolert. Na Tabela 7 são representados os resultados obtidos nas técnicas para comparação dos três métodos.

Tabela 7 - Resultado da comparação dos três métodos

Parâmetros	Métodos de Análise			
	Filtração (ufc/100 ml)	Microplacas (NMP/100 ml)	Colilert (NMP/100 ml)	Enterolert (NMP/100 ml)
<i>Escherichia coli</i>	49	141	49	-
Enterococos intestinais	56	161	-	117

Na Tabela 7 observou-se que a quantificação *Escherichia coli* e Enterococos intestinais pelos métodos das microplacas, os resultados foram mais elevados em relação às duas outras técnicas. Para maior ilustração dos resultados na Figura 56 apresentam-se os resultados para os diversos métodos de determinação dos parâmetros microbiológicos.

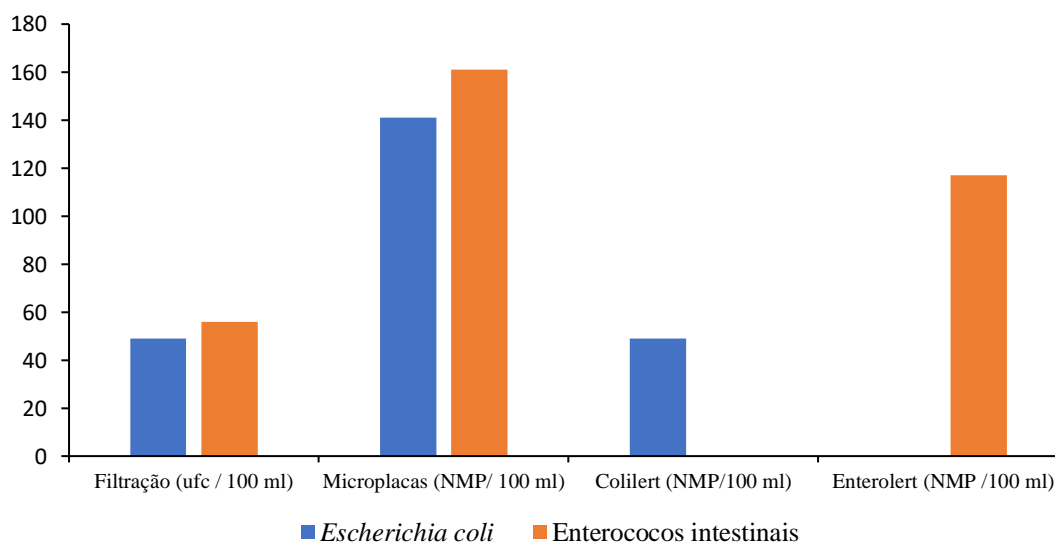


Figura 56 - Resultado da comparação dos três métodos

Os resultados da quantificação de bactérias em águas balneares, utilizando o método de filtração por membrana, foram inferiores aos das outras técnicas para a detecção dos microrganismos citados. As técnicas utilizadas, para comparação, não apresentaram diferença significativa nos resultados.

As técnicas Colilert e Enterolert, em termos de execução são mais práticas e rápidas, permitem a obtenção de resultados mais céleres, em 24 h, o que representa uma grande vantagem para detecção de episódios de contaminação das águas balneares.

Com base nos resultados encontrados no presente estudo, podemos compará-los com estudos que vêm sendo realizadas por diversos autores:

Eccles *et al.* (2004) realizaram um estudo comparativo utilizando a Técnica da Membrana Filtrante e a técnica Colilert para o isolamento e enumeração de *E. coli* em lago de esgoto tratado e não observaram uma variação considerável no índice de recuperação do microrganismo, em qualquer das técnicas estudadas.

Niemela *et al.* (2003) descreveram um estudo envolvendo 20 laboratórios de 13 países europeus, visando comparar a eficiência da técnica Colilert com a técnica convencional da Membrana Filtrante, que é a técnica recomendada nos países europeus. Os resultados deste estudo mostraram que a tecnologia de substrato definido detectou contagens significativamente mais elevadas de coliformes e *E. coli*, quando comparado com a técnica padrão, o que revelou menor eficiência da técnica da Membrana Filtrante em detectar a presença destes microrganismos em águas potáveis.

Chao *et al.* (2003) compararam a eficiência do método Colilert com o método de Filtração em Membrana, para enumeração de coliformes totais e *E. coli*, em 125 amostras de água de rios, nascentes, observaram que a quantificação dos microrganismos coliformes totais e *E. coli* foi semelhante, em ambos os métodos utilizados, obtendo, portanto, resultados semelhantes entre o método convencional e o método rápido.

## **6.8 Controlo da qualidade para os métodos analíticos quantitativos**

### **6.8.1 Resultados da análise dos brancos**

Quanto aos brancos analisados, nenhum deles apresentou crescimento, todos tiveram resultados igual a 0, o que significa que as condições de esterilidade, ao longo do processo analítico, bem como também eventuais alterações de meios de cultura e reagentes, estão em conformidade.

### **6.8.2 Resultado da análise dos critérios de precisão dos duplicados de 2017**

De acordo com o critério de precisão determinado em 2017 para *E. coli* e Enterococos intestinais, os valores dos CP são apresentados nas Figuras 57 e 58.

<b>n= 45</b>
<b>Somatório Ampl.= 1,8374</b>
<b>Média= 0,04176</b>
<b>Critério Precisão= 0,13655</b>

Figura 57 - Resultados do CP para *E. coli*

<b>n= 32</b>
<b>Somatório Ampl.= 1,4119</b>
<b>Média= 0,04412</b>
<b>Critério Precisão= 0,14428</b>

Figura 58 - Resultados do CP para Enterococos

Em 2017, obteve-se 0,14 de critério de precisão *E. coli* e Enterococos intestinais, (para os valores > 61NMP/100 ml) – Método Microplacas. De acordo com o critério de precisão determinado, os valores dos duplicados de 2018 serão aceites com precisão de 95%. As cartas de controlo dos critérios de precisão de 2017 são apresentados nas Figuras 59 e 60, para os dois parâmetros analisados.

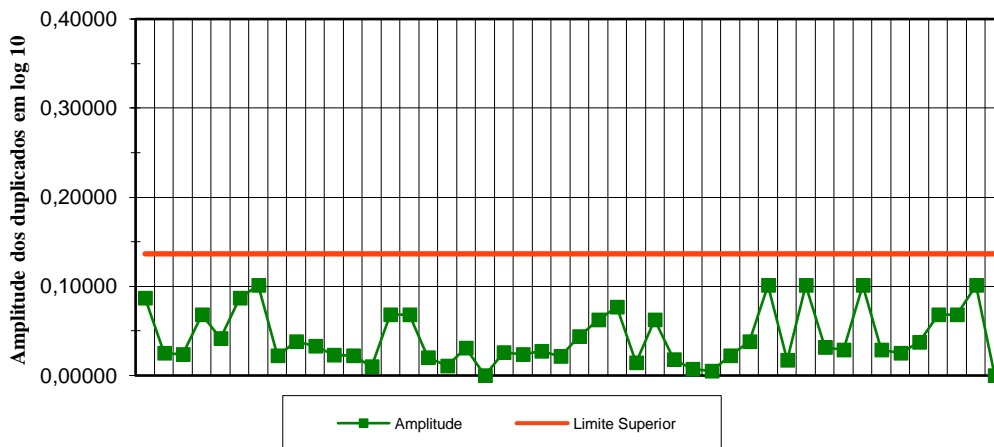


Figura 59 - Carta de controlo de duplicados de amostras de 2017 para *Escherichia Coli*

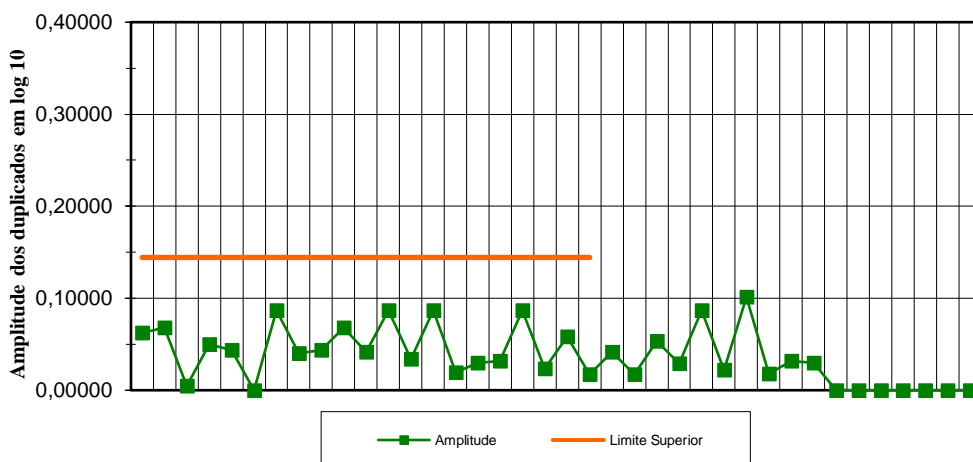


Figura 60 - Carta de controlo de duplicados de amostras de 2017 de Enterococos intestinais

Analisando as Figuras 59 e 60, do critério de precisão para *E. coli* e Enterococos intestinais, todos os duplicados analisados em 2017, encontravam-se abaixo do limite estabelecido, o que evidencia o bom desempenho dos analistas na aplicação do método de ensaio, repetibilidade e a detecção de possíveis erros aleatórios.

### 6.8.3 Resultado da análise de duplicados de rotina de 2018

As cartas de controlo dos resultados da análise de duplicados de rotina de 2018 são apresentadas nas Figuras 61 e 62, onde foram analisados 14 duplicados, os pontos após as 14 observações nas cartas de controle não foram determinados.

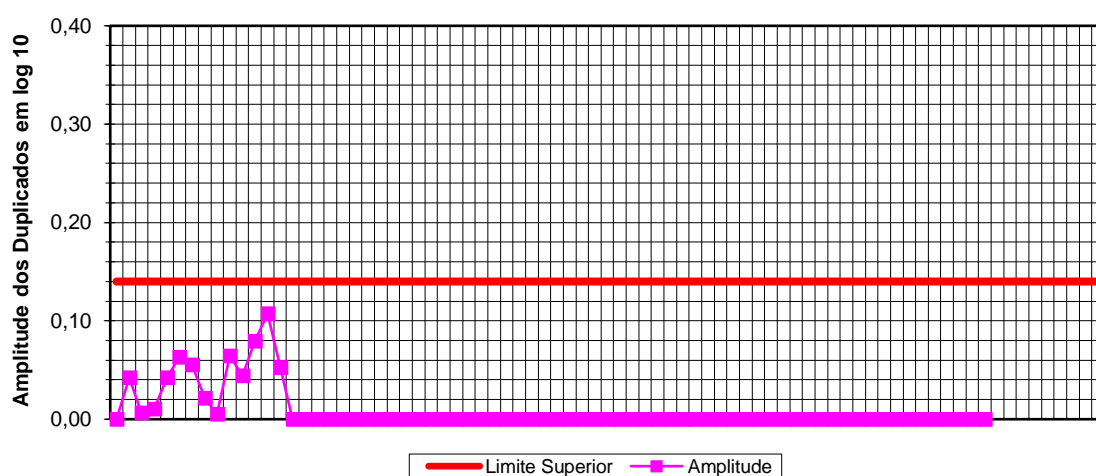


Figura 61 - Carta de controlo dos duplicados de amostras de 2018 de *E. coli*

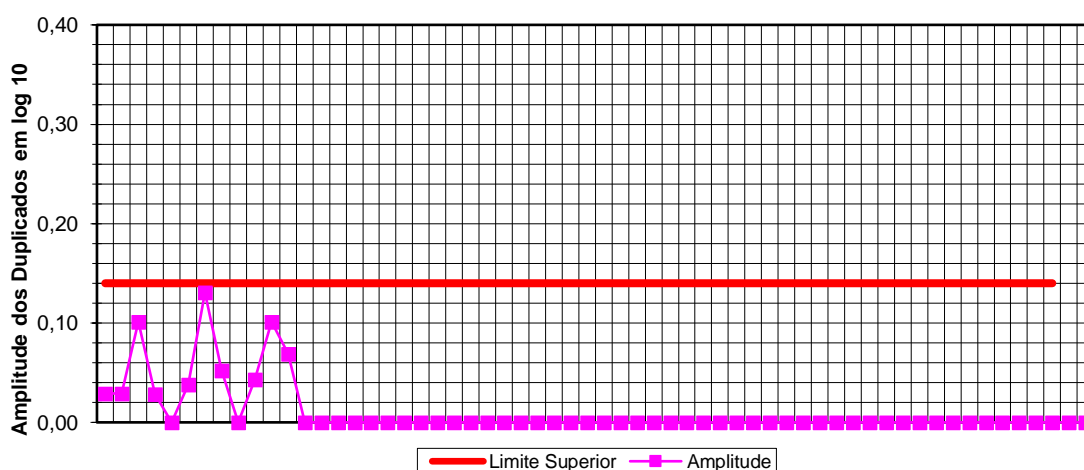


Figura 62 - Carta de controlo dos duplicados de amostras de 2018 de Enterococos intestinais

Nas Figuras 61 e 62 observar-se que os valores dos ensaios em duplicados, para a *E. coli* e o Enterococos intestinais, estão dentro do limite estipulado, pelo que, neste caso, não será necessário realizar análise de causa para avaliação do impacto, uma vez que todos se encontram abaixo do valor do Critério de Precisão. Este facto evidencia o bom desempenho dos analistas na aplicação do método de ensaio, repetibilidade e a detecção de possíveis erros aleatórios.

## 6.9 Resultado do Controlo da qualidade externo

Os resultados do ensaio interlaboratorial para os parâmetros *Escherichia coli* e Enterococos intestinais é apresentado na Tabela 8.

Tabela 8 - Resultados do ensaio interlaboratorial

Parâmetro	Z-Score
<i>Escherichia coli</i> - Microplacas	0,85
Enterococos intestinais - Microplacas	0,46

### Cálculo de z-score

Valores z- score  $\leq 2,0$  – SATISFATÓRIO;

Valores  $2,0 < z\text{-score} < 3,0$  – QUESTIONÁVEL;

Valores z- score  $\geq 3,0$  – INSATISFATÓRIO.

Observando a Tabela 8 verificar-se que os resultados obtidos no laboratório são considerados satisfatórios, porque os valores do z- score  $\leq 2,0$ , uma vez que os ensaios interlaboratoriais permitem avaliar a reprodutibilidade dos resultados, o desempenho dos laboratórios por comparação com outros laboratórios e comparar os métodos.



## CAPÍTULO 7

### 7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS

Em Portugal, a qualidade das águas balneares tem tido uma evolução positiva. A qualidade das águas balneares cumpriu com a meta estabelecida pela Directiva Europeia 2006/7/CE, de que em 2015 mais de 80 % das águas balneares foram classificadas como excelente. Do estudo efectuado, verificou-se que tem havido uma melhoria na qualidade das águas balneares da Administração da Região Hidrográfica do Tejo (ARH - Tejo), ao longo dos últimos anos.

A monitorização das águas balneares é feita de forma regular e eficiente, os planos de monitorização são eficazes, permitindo uma gestão eficiente do ambiente que nos rodeia e dos seus recursos, bem como a salvaguarda da saúde pública.

Pela análise dos resultados obtidos, é possível concluir que, das praias avaliadas nos concelhos de Almada, Cascais, Mafra, Oeiras, Sesimbra e Sintra, os parâmetros Enterococos intestinais e *Escherichia coli*, nas amostras de águas balneares, apresentaram, na sua maior parte, valores inferiores aos valores referido da norma de qualidade para a classificação de qualidade excelente (Anexo I do Decreto-Lei n.º 113/2012), com excepção das praias das águas balneares da Parede, Foz Lisandro-Rio, Maçãs, Magoito e Rainha (Cascais), onde pontualmente existem focos de poluição fecal bastante elevados aos valor referido da norma de qualidade para a classificação de qualidade excelente, boa ou aceitável.

Em todas as análises efectuadas, ao longo deste trabalho, as que mais se evidenciaram, com a presença de contaminação fecal, foram as praias da Foz do Lisandro-Rio, Rainha e Magoito.

As técnicas utilizadas para comparação, não apresentaram diferença significativa nos resultados, as técnicas Colilert e Enterolert, em termos de execução são mais práticas e rápidas, permitem a obtenção de resultados mais céleres, em 24 h, o que representa uma grande vantagem para detecção de episódios de contaminação das águas balneares em relação as técnicas Microplacas e Filtração por Membrana.

Quanto ao controle da qualidade dos resultados, os brancos analisados nenhum deles apresentou crescimento, todos tiveram resultados igual a 0, o que significa que as

condições de esterilidade, ao longo do processo analítico, bem como também eventuais alterações de meios de cultura e reagentes, estão em conformidade.

Os critérios de precisão *E. coli* e Enterococos intestinais, foram  $> 61$  NMP/100 ml, Método Microplacas, de acordo com o critério de precisão determinado, os valores dos duplicados de 2018 foram aceites com precisão de 95%.

Os duplicados, para a *E. coli* e o Enterococos intestinais, estão dentro do limite estipulado, este facto evidenciou o bom desempenho dos analistas na aplicação do método de ensaio, repetibilidade e a detecção de possíveis erros aleatórios.

Os Resultado da Análise de Duplicados de rotina de 2018, foram considerados satisfatórios, os valores do z- score  $\leq 2.0$ , o desempenho dos métodos do laboratório em comparação com outros laboratórios, foram considerados positivos.

Os principais indicadores de contaminação das águas balneares identificados foram descargas de águas residuais “tratadas”, lixo abandonado na areia e dunas, sobrelotação das praias por parte dos banhistas, admissão de animais domésticos sem recolha das suas fezes, abandono na areia de peixes e crustáceos utilizados na actividade da pesca de rede, aves marinhas, matéria orgânica no meio envolvente à praia, todos são factores que podem influenciar negativamente a qualidade das águas das praias.

A contaminação fecal tem origem em esgotos urbanos, actividades agropecuárias, processos industriais, drenagem pluvial urbana, e chega às águas balneares através de duas vias principais: descargas directas na praia ou em áreas próximas e através das ribeiras afluentes que podem transportar elevadas cargas resultantes de fontes de poluição difusa e pontual.

Uma das formas para a resolução do problema da deterioração da qualidade de águas balneares por avarias ou mal funcionamento de ETAR ligadas a pontos de rejeição, é desenvolver diligências para que a entidade gestora do ponto de rejeição informe imediatamente as entidades competentes. Seria também desejável que as entidades gestoras desenvolvessem e implementassem mecanismos para minimizar as descargas consequentes das avarias, nomeadamente possuindo bacias de retenção.

A qualidade das areias das praias é influenciada positivamente pela recolha frequente do lixo abandonado na areia, pela remoção mecânica diária de lixos, pela colocação de recipientes de lixo adequados às dimensões da praia e espaços adjacentes; pelo tratamento

das areias para redução do número de microrganismos; pela limitação do acesso às praias por trajectos bem definidos; pela identificação e tratamento de fontes de contaminação adjacentes à praia.

Por esse motivo, é necessário criar um Programa de Vigilância da Qualidade Microbiológica das Areias em Zonas Balneares, de forma a avaliar a qualidade bacteriológica e micrológica das areias nas praias.



## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAE (2018). Página do Programa Bandeira Azul. Associação Bandeira Azul da Europa. Disponível em: <https://bandeiraazul.abae.pt/galardoados/galardoados-2018/>. Consultado em: 20 Maio de 2018.

APA (2018). Agência Portuguesa do Ambiente. Disponível em: <http://www.apambiente.pt/index.php?ref=16&subref=7&sub2ref=818&sub3ref=1290>. Consultado em: 25 de Abril de 2018.

APA (2018). Agência Portuguesa do Ambiente. Obtido de Ambiente Portugal ambição para o futuro, disponível em: <http://snirh.pt/index.php?idMain=1&idItem=2.1>. Consultado em: 20 de maio de 2018.

Bedri Z., Corkery A., O'Sullivan J. J., Deering L. A., Demeter K., Meijer W. G., O'Hare G., Masterson B. (2016). Evaluating a microbial water quality prediction model for beach management under the revised EU Bathing Water Directive, *Journal of Environmental Management* 167, 49-58.

Blackwell, B. (2007). The value of a recreational beach visit: An application to Mooloolaba beach and comparisons with other outdoor recreation sites. *Economic Analysis and Policy*, 77-98.

Bordalo, A. A. (2003). Microbiological water quality in urban coastal beaches: the influence of water dynamics and optimization of the sampling strategy. *Water Research*, 37, 3233-3241.

Budnick, G.E.; Howard, R.T. & Mayo, D.R. (1996). Evaluation of Enterolert for Enumeration of Enterococci in Recreational Waters. *Applied and Environmental Microbiology*. 3881-3884.

Carvalho, K. Q.; Lima, S. B.; Passig, F. H.; Gusmão, L. K.; Souza, D. C.; Kreutz, C. *et al.* (2015). Influence of urban area on the water quality of the Campo river basin, Paraná state, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, v.75, n.4, 96-106. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.00413suppl>. Consultado em: 21 Julho de 2018.

Chao, K. K.; Chao, C. C.; Chao, W. L. (2003). Suitability of the traditional microbial indicators and their enumerating methods in the assessment of fecal pollution of subtropical freshwater environments. *J. Microbiol Immunol Infect*, v.36, n.4, 288- 293.

Cordeiro, M. S. (2014). Correlação entre e. Coli, coliformes fecais, totais e salmonella ssp em alimentos prontos a comer. Dissertação de mestrado, Instituto Superior de Ciências da Saúde Egaz Moniz. Disponível em: <https://comum.rcaap.pt/bitstream/10400.26/12082/1/Cordeiro%2C%20Magda%20Sofia%20Cardoso.pdf>. Consultado em: 31 de Janeiro de 2019.

Crowther, J., D. Kay e M. D. Wryer. (2001). Relationships between microbial water quality and environmental conditions in coastal recreational waters: the field coast, UK. *Water Research*, Vol. 35, N.º 17, 4029-4038.

Decreto-Lei nº 113/2012, de 23/5, Diário da República n.º 100/2012, Série I. Disponível em: <https://dre.pt/application/conteudo/177865>. Consultado em: 21 de Janeiro de 2019.

Decreto-Lei nº 135/2009, de 3/6, Diário da República n.º 107/2009, Série I. Disponível em: <https://dre.pt/pesquisa/-/search/177865/details/maximized>. Consultado em: 21 de Janeiro de 2019.

Directiva 2006/7/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 15 de fevereiro. Disponível em: <https://eurlex.europa.eu/legalcontent/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006L0007&from=PT>. Consultado em: 20 de Maio de 2018.

DRA (2017). Direção Regional de Agricultura. Meios de cultura utilizados em microbiologia, pp. <https://dica.madeira.gov.pt/index.php/outros-temas/diversos/1825-meios-de-cultura-utilizados-em-microbiologia>. Consultado em: 29 de Junho de 2018.

Eccles, J. P.; Searle, R.; Holt., D.; Dennis, P. J. A comparison of methods used to enumerate *Escherichia coli* in conventionally treated sewage sludge. (2004). *J. Appl. Microbiol.*, v.96, n.2, 375-383.

Edberg, S., Edberg, M. (1988). A defined substrate technology for the enumeration of microbial indicators of environmental pollution. *The Yale Journal of Biology and Medicine*. 61: 389-399.

EEA (2018). European Environment, Agency Relatório da AEA N°2/2018 Report No 2/2018 European Bathing Water Quality in 2017. Disponível em:

Germano, P. M. L.; Germano, M. I. S (2001). Higiene e vigilância sanitária de alimentos. São Paulo:Varela, p.629.

<https://www.eea.europa.eu/publications/european-bathing-water-quality-in-2017>.

Consultado em: 30 de Maio de 2018.

IDEXX (2013). Colilert Test Kit. [Versão Electrónica]. Disponível em: <http://www.idexx.com/resource-library/water/colilert-procedure-en.pdf>. Consultado em: 28 de Junho de 2018.

IHRH (2000). “Ribeiras de Lavra e Perafita Estudo da sua Despoluição”, Relatório da 2ª Fase, Instituto de Hidráulica e Recursos Hídricos.

Ismaili, A.; Philipott, D.J., Dytoc, M.T. & Sherman, P.M. (1995). Signal transduction responses following adhesion of verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Infection Immunity*. *Infection Immunity*. p. 3316- 3326.

ISO 19458 (2006) (s.d.). Water Quality Sampling for microbiological analysis.

ISO 7899-1 (1998) Water Quality- Detection and Enumeration of Intestinal Enterococci in Surface and wastewater - part 1: Miniaturized method (Most Probable Number) by inoculation medium.

ISO 7899-2 (2000). Water Quality - Detection and enumeration of intestinal enterococci. Part 2: Membrane filtration method.

ISO 9308-1 (2000). Water Quality - Detection and enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria in surface and waste water.

ISO 9308-2 (2012) Water Quality- Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria.

ISO 9308-3 (1998) Water Quality- Detection and enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria in surface and waste water.

Kashefipour, S., Lin, B., & Falconer, R. (2006). Modelling the fate of faecal indicators in a coastal basin. *Water Research*, vol. 40, pp. 1413-1425.

Leecaster, M. K. e S. B. Weisberg. (2001). Effect of sampling frequency on shoreline microbiology assessments. *Marine Pollution Bulletin*, Vol. 42-11, 1150-1154.

Lei n.º 44/2017, de 19/06, Diário da República n.º 116/2017, Série I. Disponível em: <https://dre.pt/application/conteudo/107524707>. Consultado em: 20 de Abril de 2018.

Lei n.º 58/2005, de 29/12, Diário da República n.º 249/2005, Série I-A. Disponível em: <https://dre.pt/application/conteudo/469068>. Consultado em: 20 de Abril de 2018.

Lew, D. K., & Larson, D. M. (2005). Valuing recreation and amenities at San Diego County beaches. *Coastal Management*, 33(1), 71-86.

LRA (2011). Manual de Amostragem 6ª Edição. 1-20.

LRA (2013). Manual de Métodos Analíticos. *Pesquisa e Quantificação de Enterococos Intestinais*, 1-8.

LRA (2017). Procedimentos Analítico. Quantificação de Bactérias Coliformes e E.Coli pelo Método de COLILERT. 1-6.

Monteiro, A (2000). Inativação Bacteriológica. Dissertação de Mestrado, Instituto Superior Técnico de Lisboa Disponível em: [https://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/2409/3/DM\\_7121.pdf](https://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/2409/3/DM_7121.pdf). Consultado em: 20 de janeiro de 2018.

Moriya T, M. J. (2008). Assepsia e antissepsia: técnicas de esterilização. pp. 71-41. Disponível em: <https://pt.scribd.com/document/352116509/Assepsia-e-Antissepsia-pdf-pdf10>. Consultado em: 10 de julho 2018.

Niemela, S. I.; Lee, J. V.; Fricker; C. R. (2003). A comparison of the international standards organisation reference method for the detection of coliforms and *Escherichia coli* in water with a defined substrate procedure. *J. Appl. Microbiol.*, v.95, 1285-1292.

NP-4346:1998. (s.d.). Qualidade da água. *Regras gerais para a quantificação de microrganismos em meio de cultura*. 003.

Pelczar Jr, J. M; Chan, Sinton, L. W., R. J. Davies-Colley e R. G. Bell. (1994). Inactivation of enterococci and fecal coliforms from sewage and meat works effluents in seawater chambers. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 60-6, 2040-2048.

Pinto, A. G. N.; Horbe, A. M. C.; Silva, M. S. R.; Miranda, S. A. F.; Pascoaloto, D. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/aa/v39n3/v39n3a18.pdf>. Consultado em: 20 de Junho de 2018.

REA (2018). Relatório do Estado Ambiente. Obtido em <https://rea.apambiente.pt/content/%C3%A1guas-balneares>. Consultado em: 22 de Novembro de 2018.

Roca, E., & Villares, M. (2008). Public perceptions for evaluating beach quality in urban and semi-natural environments. *Ocean & Coastal Management*, 51(4), 314-329.

Santos, H. M. C. (2009). Efeitos da acção antrópica sobre a hidrogeoquímica do rio Negro na orla de Manaus/AM. *Acta Amazonica*, v. 39, n. 3, 627 – 638.

Silva, R. M. B., (2011), Avaliação dos Efeitos do Estuário do AVE na Qualidade das águas Balneares do Concelho de Vila do Conde. Dissertação de Mestrado, Universidade Fernando Pessoa Porto. Disponível em: [https://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/2409/3/DM\\_7121.pdf](https://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/2409/3/DM_7121.pdf). Consultado em: 30 de janeiro de 2018.

SNIRH (2018). Sistema Nacional de Informação de Recursos Hídricos. Obtido em <http://snirh.pt/index.php?idMain=1&idItem=2.1>. Consultado em: 22 de Abril de 2018.

Turner, S.J.; Lewis, G.D. & Bellamy, A.R. (1997). Detection of sewage-derived *Escherichia coli* in a rural stream using multiplex PCR and automated DNA detection. *Water Science Technology*. v. 35, n 11-12, 337-342.





WHO (2001). World Health Organization. Bathing water quality and human health. Protection of the human environment water, sanitation and health, Geneva Disponível em: [http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/rehabilitacionbal/bathing\\_water\\_quality\\_and\\_human\\_health.pdf](http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/rehabilitacionbal/bathing_water_quality_and_human_health.pdf). Consultado em: 27 de Novembro de 2018.

WHO (2011b). Environmental burden of disease associated with inadequate housing. Methods for quantifying health impacts of selected housing risks in the WHO European Region. Summary Report. WHO Regional Office for Europe. Disponível em: [http://www.euro.who.int/data/assets/pdf\\_file/0003/142077/e95004.pdf?ua=1](http://www.euro.who.int/data/assets/pdf_file/0003/142077/e95004.pdf?ua=1). Consultado em: 27 de Novembro de 2018.

Yan, Z., Buldyrev, S. V., Kumar, P., Giovambattista, N., Debenedetti, P. G., Stanley, H. (2007). Structure of the first and second neighbor shells of simulated water: Quantitative relation to translational and orientational order. *Phys. Rev.*, 76, 05201.1-5.

## ANEXOS

### Anexo I - Protocolo de estágio entre a APA e o ISEL

	 	
---	---	---

**PROTOCOLO DE COOPERAÇÃO**  
**ENTRE O INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA,**  
**A AGÊNCIA PORTUGUESA DO AMBIENTE, I.P.**  
**E A ESTUDANTE ALCINA DA GRAÇA LEONARDO**

Entre

o Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, pessoa coletiva nº 600 016 234, com sede na Rua Conselheiro Emídio Navarro, 1, 1959-007 Lisboa, neste ato representado pelo seu Presidente, Professor Doutor Jorge Alberto Mendes de Sousa, adiante designado por ISEL, na qualidade de primeiro outorgante,

a Agência Portuguesa do Ambiente, I.P., pessoa coletiva nº 510 306 624, com sede na Rua da Murgueira, nº9/9ª, 2610-124 Amadora, neste ato representada pelo Presidente do seu Conselho Diretivo, Dr. Nuno Lacasta, adiante designado por APA, na qualidade de segundo outorgante,

e

a estudante Alcina da Graça Leonardo, portador do título de residência com o número 475V5873V, NIF 289618002 residente em Lisboa Odívelas, Arroja, Rua Dr. João Santos n.º 13, na qualidade de terceiro outorgante, é celebrado e mutuamente aceite o Protocolo que se rege pelas cláusulas seguintes:

**CLÁUSULA 1ª**  
**Objetivo**


1. O presente protocolo tem como objetivo a realização de estágio da estudante do ISEL Alcina da Graça Leonardo, no âmbito do trabalho final do mestrado em Engenharia da Qualidade e Ambiente.
2. Durante a vigência do estágio a aluna Alcina da Graça Leonardo mantém o seu estatuto de estudante do ISEL.
3. Em anexo são apresentados o resumo e o plano de trabalho, que constam da proposta de TFM.

**CLÁUSULA 2ª**  
**Duração, local e horário**

1. O estágio terá início no dia 9 de abril de 2018 e término a 31 de julho de 2018.
2. O estágio será realizado nas instalações da APA.

GAQ.MD.09.03  
Pg. 1/2

Rua Conselheiro Emídio Navarro 1  
1959-007 Lisboa- Portugal  
Tel: (+351) 218 317 000  
Fax: (+351) 218 317 162  
Web: www.isel.pt



**CLÁUSULA 3ª**  
**Orientação do estágio**

Os responsáveis pela orientação do estágio devem estabelecer entre si os contactos necessários tendo em vista o bom cumprimento dos objetivos do estágio. São nomeados em representação do ISEL a Professora Doutora Maria Teresa Loureiro dos Santos e em representação da APA a Drª. Maria Ana Cunha, como orientadores do presente estágio.

**CLÁUSULA 4ª**  
**Seguro escolar**

A estudante é abrangida pelo seguro escolar, cuja apólice consta em anexo ao presente protocolo e cujo pagamento é da responsabilidade do ISEL.

**CLÁUSULA 5ª**  
**Obrigações da estudante**

A estudante fica obrigada ao cumprimento de todas as normas estabelecidas pela APA, nomeadamente no que concerne ao sigilo profissional, às regras de utilização e manutenção de recursos materiais colocados à sua disposição e às disposições relativas a segurança e saúde no trabalho.

**CLÁUSULA 6ª**  
**Vigência**

O presente protocolo é válido durante o período de realização do estágio.

**CLÁUSULA 7ª**  
**Disposições finais**

1. As dúvidas e omissões, bem como eventuais atualizações deste protocolo, serão resolvidas pelos outorgantes.
2. Feito em três exemplares ficando um exemplar em poder do ISEL, outro em poder da APA e outro da estudante.

G.A.O.M.D.09.03 Pág. 2/3

Rua Conselheiro Emídio Navarro 1  
1959-007 Lisboa- Portugal  
Tel: (+351) 218 317 000  
Fax: (+351) 218 317 162  
Web: www.isel.pt



CLÁUSULA 8ª

Aceitação

As partes envolvidas declaram aceitar o presente protocolo, com todas as cláusulas que ficam exaradas, e vão assinar.

Lisboa, 06 de abril de 2018

Pelo ISEL

Professor Doutor Jorge Alberto Mendes de Sousa  
Presidente do ISEL

Pela APA

Dr. Nuno Lacasta  
Presidente do Conselho Diretivo da APA, I.P.P

*Alcina da Graça Leonardo*

Alcina da Graça Leonardo  
A Estudante

## Anexo II - Publicações do trabalho

- Poster - 18.º Encontro de Engenharia Sanitária e Ambiental (ENASB) e o 18.º Simpósio Luso-Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental (SILUBESA).

### Caracterização Microbiológica de Amostras no Âmbito da Monitorização de Águas Balneares



A. G. Leonardo a., M. A. Cunha b., M. T. Santos a  
 a Área Departamental de Engenharia Química, Instituto Superior de Engenharia de Lisboa (ISEL), Instituto Politécnico de Lisboa, R. Conselheiro Emídio Navarro 1, 1959-007 Lisboa, Portugal  
 b Laboratório de Referência do Ambiente, Agência Portuguesa do Ambiente (APA), Rua da Murgueira, 9/9A -Zambujal Ap. 75852610-124 Amadora, Portugal



#### Resumo

A monitorização da qualidade das águas balneares é de extrema importância, pois permite identificar e qualificar como praias com qualidade para banhos, protegendo desta forma a saúde pública. Este trabalho tem como objetivo caracterizar e avaliar a qualidade das águas balneares, costeiras e interiores, através da análise de parâmetros microbiológicos, nomeadamente bactéria *Escherichia coli* e *Enterococos* intestinais. Pretende-se ainda implementar e validar de métodos de análise.

#### Introdução

A costa Portuguesa estende-se por muitos quilómetros, contando com vastos areais e belas paisagens que combinados com o clima mediterrânico, tornam as praias portuguesas locais irresistíveis, onde os banhos de mar constituem uma atividade recreativa muito praticada (SNIRH, 2018).

As águas balneares (AB) são definidas como “as águas superficiais, quer sejam interiores, costeiras ou de transição, em que se preveja um grande número de banhistas e onde a prática banhar não tenha sido interdita ou desaconselhada de modo permanente (ou seja, pelo menos durante uma época balnear completa)” (Lei n.º 58/2005). Na Figura 1 é apresentada a classificação das AB em 2017.

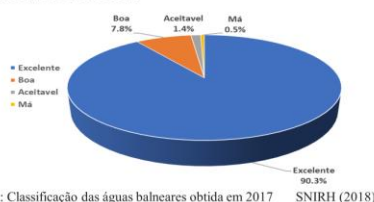


Figura 1: Classificação das águas balneares obtida em 2017 SNIRH (2018)

Os resultados da monitorização efectuada durante a época balnear são disponibilizados ao público à medida que são analisados e no caso de se verificarem resultados anormais o público é alertado.

A legislação aplicável às águas balneares é o Decreto-Lei 135/2009, de 3 de Junho com a redação que lhe foi dada pelo Decreto Lei n.º 113/2012, de 23 de Maio (Tabela 1)

Tabela 1: Limites de classificação de Águas costeiras e transição

Parâmetro	Qualidade			Métodos de análise de referência
	Excelente	Boa	Aceitável	
Enterococos intestinais (ufc/100ml)	(*) 100	(*) 200	(**) 185	ISO 7899-1 ou ISO 7899-2
<i>Escherichia coli</i> (ufc/100ml)	(*) 250	(*) 500	(**) 500	ISO 9308-3 ou ISO 9308-1

A qualidade das AB representa não só um factor de saúde pública como também um importante indicador de qualidade ambiental e de desenvolvimento turístico. Numa primeira fase foram recolhidas amostras de águas balneares das praias na zona de Cascais para determinação dos parâmetros diversos parâmetros microbiológicos.

#### REFERÊNCIAS

- [1] SNIRH, 2018. Sistema Nacional de Informação de Recursos Hídricos. Obtido em <http://snirh.pt/index.php?idMain=1&idItem=2.1>. Acedido em: 22 de Abril de 2018
- [2] Decreto-Lei n.º 135/2009, de 3 de Junho de 2009.
- [3] Decreto Lei n.º 113/2012, de 23 de Maio de 2012.
- [4] ISO-19458:2006. (6.4.1). Water Quality Sampling for microbiological analysis.
- [5] ISO7899-1:1998- Water Quality- Detection and Enumeration of Intestinal Enterococci in Surface and waste water - part 1: Miniaturized method (Most Probable Number) by inoculation medium.
- [6] ISO- ISO-9308-3:1998- Water Quality- Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria.
- [7] ISO- ISO-9308-2:2012- Water Quality- Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria.

#### Materiais e Métodos

A amostragem foi realizada de acordo ISO-19458:2006.

As amostras de AB foram recolhidas nas praias Conceição, Duquesa, Poça e Rainha (Cascais) de forma direta (Figura 2) e indireta (Figura 3) a 30 cm de profundidade, numa coluna de água de cerca de 1,3 m. Os recipientes utilizados foram de plástico (500 ml) (Figura 4), tendo sido enchido cerca de 3/4 do seu volume.

Após a recolha das amostras de AB, os recipientes foram colocados em caixa termina para conservação a temperatura de (2 a 8 °C) (Figura 5).



Figura 2: Recolha directa de amostras de AB



Figura 3: Recolha indirecta de amostras de AB



Figura 4: Frascos amostragem de plástico (500 ml)



Figura 5: Caixa térmica para conservação e transporte das amostras

Os métodos analíticos utilizados visavam a pesquisa e quantificação de *Enterococos* intestinais (MICROPLACAS ISO-7899-1:1998 e COLILERTE ISO-9308-2:2012) e de *Escherichia coli* (MICROPLACAS ISO-7899-1:1998 ENTEROLET).

#### Resultados

Na Tabela 2 são apresentados os resultados obtidos para os referidos microrganismos das amostras de AB.

Tabela 2: Resultados das análises microbiológicas – pelo de método de MICROPLACAS

Águas balneares	<i>Escherichia Coli</i> NMP/100ml	<i>Enterococos</i> NMP/100ml
Conceição	46	15
Duquesa	30	>15
Poça	61	30
Rainha	77	30

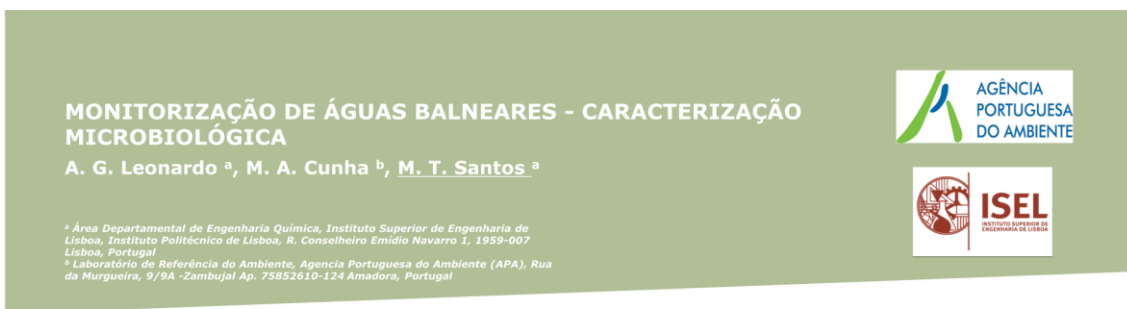
#### Conclusões

Pela análise dos resultados obtidos é possível concluir que das 4 praias avaliadas os parâmetros *Enterococos* intestinais e *Escherichia coli* apresentavam concentrações inferiores a 100NMP\100ml, sendo que a classificação destas águas é considerada excelente.

O presente trabalho ainda se encontra em execução.

Agradecimentos  
 Agência Portuguesa do Ambiente (APA)

- Poster - Fórum de Engenharia Química e Biológica 2018, decorrido nos dias 8, 9 e 10 de maio de 2018, no ISEL.



## RESUMO

A monitorização da qualidade das águas balneares é de extrema importância, pois permite identificar e qualificar as praias com qualidade para banhos, protegendo desta forma a saúde pública. Este trabalho tem como objetivo caracterizar e avaliar a qualidade das águas balneares, costeiras e interiores da zona de ARH-tejo, através da análise de parâmetros microbiológicos, nomeadamente bactéria *Escherichia coli* e *Enterococos* intestinais. Pretende-se ainda implementar e validar novos métodos de análise. Foram analisadas águas balneares de 13 praias do concelho de Cascais e 4 praias do concelho de Oeiras, tendo-se verificado que os referidos parâmetros apresentaram concentrações inferiores aos valores de referência, sendo a classificação destas águas considerada como excelente.

## INTRODUÇÃO

As águas balneares são definidas como "as águas superficiais, quer sejam interiores, costeiras ou de transição, em que se preveja um grande número de banhistas e onde a prática balnear não tenha sido interdita ou desaconselhada de modo permanente (ou seja, pelo menos durante uma época balnear completa)" (Lei n.º 58/2005 e Lei n.º 44/2017, de 19/06).

Face à implementação da legislação Europeia ocorreu uma evolução positiva na qualidade das águas balneares nos países da comunidade europeia. Os resultados da monitorização efetuada durante a época balnear são disponibilizados ao público à medida que são analisados e no caso de se verificarem resultados anormais o público é alertado.

Em Portugal existem cerca de 737 águas identificadas como balnear, mas só 603 foram monitorizadas em 2017. O número de águas balneares monitorizadas, tem evoluído consideravelmente nas últimas décadas, passando de 336 em 1993 para 603 em 2017. A evolução da qualidade das águas balneares costeiras e de transição é apresentada na Figura 1.

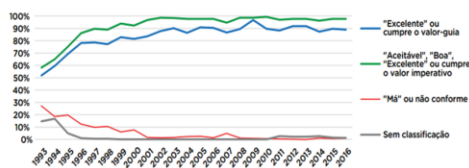


Figura 1. Evolução da qualidade das águas balneares costeiras e de transição, (APA, 2017)

A evolução da qualidade das águas balneares interiores é apresentada na Figura 2.

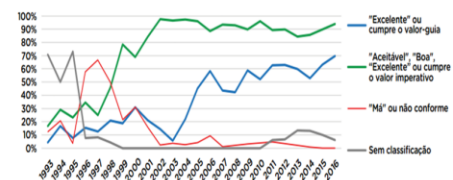


Figura 2. Evolução da qualidade das águas balneares interiores (APA, 2017)

## MATERIAIS E MÉTODOS

A recolha das amostras águas balneares foi realizada de acordo com o procedimento de amostragem apresentado na ISO-19458:2006. De cada água foi recolhido um volume de 500 mL em recipientes de plástico.

Os métodos analíticos utilizados visavam a pesquisa e quantificação de *Enterococos* intestinais (MICROPLACAS ISO-7899-1:1998 e COLÍFERTE ISO-9308-2:2012) e de *Escherichia coli* (MICROPLACAS ISO-7899-1:1998 ENTEROLET).

## CONCLUSÕES

Em Portugal a qualidade das águas balneares tem tido uma evolução positiva, tendo cumprido com a meta de 2015, em que mais de 80 % são classificadas como excelentes. Do estudo efetuado verificou-se que tem havido uma melhoria na qualidade das águas balneares da região ARH- Tejo, ao longo dos últimos anos. A monitorização das águas balnear é feita de forma regular e eficiente, os planos de monitorização são eficazes, permitindo uma gestão eficaz do Ambiente e dos seus recursos, bem como a salvaguarda da saúde pública. Os principais indicadores de contaminação das águas balneares identificados foram descargas de águas residuais, lixo abandonado na areia e dunas, sobrelotação das praias por parte dos banhistas, admissão de animais domésticos sem recolha das suas fezes, abandono na areia de peixes e crustáceos utilizados na atividade da pesca de rede, aves marinhas, matéria orgânica.

### REFERÊNCIAS

- APA (2017). Agência Portuguesa do Ambiente. Disponível em <http://www.apambiente.pt/index.php?ref=16&subref=78&sub2ref=818&sub3ref=1290>. Acesso em: 25 de abril de 2018.
- ISO- 9308-2:2012- Water Quality- Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria.
- ISO- 9308-3:1998- Water Quality- Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria.
- ISO-19458:2006. (s.d.). Water Quality Sampling for microbiological analysis.
- ISO7899-1:1998- Water Quality- Detection and Enumeration of Intestinal Enterococci in Surface and wastewater - part 1: Miniaturized method (Most Probable Number) by inoculation medium.
- Decreto-Lei nº135/2009, de 3 de Junho de 2009.
- Decreto Lei nº 113/2012, de 23 de Maio de 2012.

## RESULTADOS

### Oeiras

As águas balneares do concelho de Oeiras apresentam boa qualidade, tendo sido distinguidas com prémios nacionais, ex. Praia da Torre com Qualidade Ouro pela Quercus (2017). Os resultados das análises para 2018 são apresentados nas Figuras 3 e 4.



Figura 3. *Escherichia coli* das amostras de Oeiras



Figura 4. *Enterococos* intestinais de Oeiras

### Cascais

O concelho de Cascais possui diversas praias, diferentes entre si e pertencentes à zona designada por Costa do Estoril. 1 praia apresenta uso suspenso devido à falta de segurança decorrente da inexistência de sedimentos, a Praia do Abano. Em 2017, a grande maioria das águas balneares apresentaram níveis de qualidade excelentes, exceto as praias da Duquesa e Conceição. Nas Figuras 5 e 6 são apresentados os resultados águas balneares para 2018.

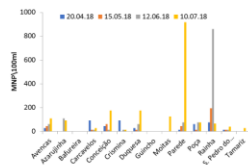


Figura 5. *Escherichia coli* das amostras de Cascais

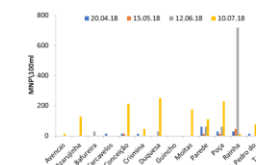


Figura 6. *Enterococos* intestinais de Cascais

### Sintra

O concelho de Sintra possui 6 águas balneares monitorizadas consideradas de qualidade excelente. Existem outras, mas de difícil acesso que não dispõem de apoios de praia nem vigilância. Os resultados da monitorização para 2018 são apresentados nas Figuras 7 e 8.

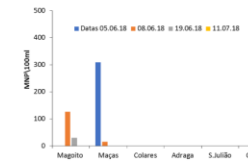


Figura 7. *Escherichia coli* de Sintra

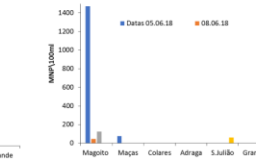


Figura 8. *Enterococos* de Sintra



### Anexo III - Símbolos de informação sobre a qualidade anual para cada água balneares.

São adaptados os seguintes símbolos de informação sobre a classificação anual para cada água balnear:



**Banho desaconselhado**



**Proibido tomar banho**

Código da cor	Classe ou estatuto relevante a qualidade das águas balneares
	Qualidade Excelente
	Qualidade Boa
	Qualidade Aceitável
	Qualidade Má
	Sem Classificação (ou ainda não reuniu o número suficiente de amostragem para ser classificada)
	Não identificada (identificada pela primeira vez na presente época balnear)

## Anexo IV - Perfil de água balnear da Fonte da Telha



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,  
DO MAR, DO AMBIENTE  
E DO ORDENAMENTO DO TERRITÓRIO



AGÊNCIA  
PORTUGUESA  
DO AMBIENTE

Administração da Região  
Hidrográfica do Tejo e Oeste

### Perfil de Água Balnear da Fonte da Telha

#### Identificação da Água Balnear

Nome da Água Balnear	FONTE DA TELHA
Código da Água Balnear	PTCX7L
Ano de Identificação	1991
Categoria/Tipo	Água balnear costeira/Costa Atlântica Mesotidal Moderadamente Exposta
Nome da Zona Costeira	Costa da Caparica

#### Fotografia



Fonte: APA/ ARHTO

#### Localização Geográfica e Administrativa da Água Balnear

País	Portugal
Distrito	Setúbal
Concelho	Almada
Freguesia	Costa da Caparica
Nome Bacia Hidrográfica	Bacia Hidrográfica do Rio Tejo
Código Bacia Hidrográfica	PTRH5
Nome da Massa de Água	CWB-I-4
Código da Massa de Água	PTCOST11



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,  
DO MAR, DO AMBIENTE  
E DO ORDENAMENTO DO TERRITÓRIO



AGÊNCIA  
PORTUGUESA  
DO AMBIENTE

Administração da Região  
Hidrográfica do Tejo e Oeste

## Descrição da Água Balnear e Zona Envolvente

### Características da Água Balnear

Praia extensa de areia fina e branca, com envolvente rica em património natural protegido, designadamente a *Paisagem Protegida da Arriba Fóssil da Costa de Caparica* e a *Mata Nacional dos Medos*. Cordão dunar a norte. Existência de núcleo piscatório. Na proximidade existe local privilegiado para a prática de mergulho.

<b>Tipologia da Praia:</b>	Tipo 2 - Praia não urbana com uso intensivo
<b>Tipo de substrato:</b>	Arenoso
<b>Extensão da frente de praia:</b>	7253
<b>Acessos viários:</b>	A partir da Costa da Caparica- estrada florestal; a partir do Seixal – avenida do Mar.
<b>Acessos pedonais:</b>	Escadaria para descida a partir da estrada florestal
<b>Afluência:</b>	Muito elevada em fins de semana na época balnear. Capacidade de carga: 2004 utentes
<b>Declive da zona de banhos:</b>	Suave e mais acentuado na zona sul
<b>Atividades Recreativas:</b>	Surf, windsurf, mergulho
<b>Instrumento de Ordenamento:</b>	POOC Sintra-Sado e Plano de Ordenamento da Paisagem Protegida da Arriba Fóssil da Costa da Caparica (PPAFCC)

### Equipamentos e Serviços

<b>Vigilância:</b>	Sim	<b>Posto Socorros:</b>	Sim	<b>Recolha de Lixo:</b>	Sim
<b>Sanitários:</b>	Sim	<b>Duche:</b>	Sim	<b>Limpeza de Praia:</b>	Sim
<b>Acesso deficientes:</b>	Sim	<b>Animais domésticos:</b>	Não	<b>Painel informativo:</b>	Sim
<b>Apoios de praia:</b>	Sim	<b>Estacionamento:</b>	Sim	<b>Capacidade estacionamento:</b>	

### Condições Hidrológicas e Meteorológicas

#### Hidrodinâmica:

<b>Regime de marés:</b>	Maré semi-diurna. Mesotidal: 2-4m
<b>Temperatura da água:</b>	Temperatura da água varia entre os 17°C e os 19°C na época balnear.
<b>Regime de ventos:</b>	Ventos dominantes de Norte/Noroeste nos meses de verão
<b>Temperatura do ar:</b>	A temperatura do ar nos meses mais quentes varia em média entre os 18°C e os 29°C.

#### Precipitação (época balnear):

Nº horas sol (época balnear): 10h

Mais informação sobre marés pode ser consultada em: <http://www.hidrografico.pt/previsao-mares.php>

Mais informação sobre ondas pode ser consultada em: <http://www.maretec.mohid.com/ww3/>

### Zona Envolvente

Dunas baixas a norte e grande proximidade de arriba fóssil a sul. Área urbana de origem clandestina e degradada. Percursos pedestres e parques de merendas na Mata Nacional dos Medos. Campos de golfe na Aroeira.

<b>Risco Arribas:</b>	Inexistente
-----------------------	-------------



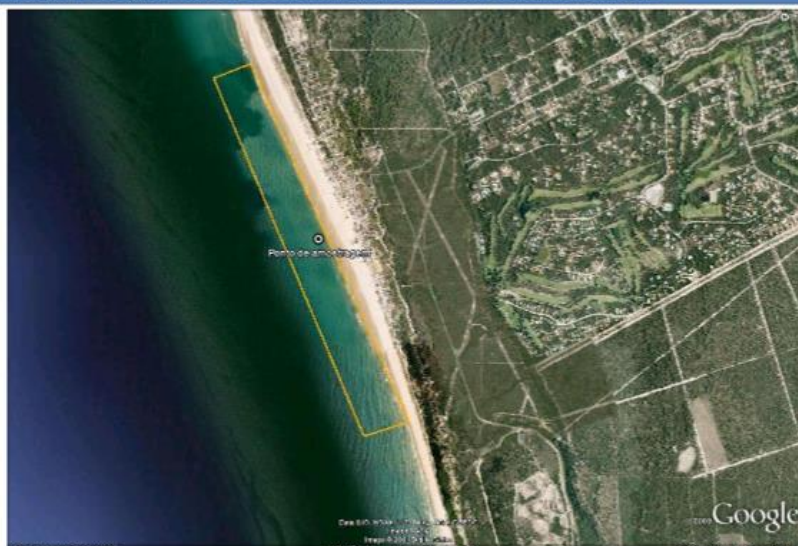
MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,  
DO MAR, DO AMBIENTE  
E DO ORDENAMENTO DO TERRITÓRIO



AGÊNCIA  
PORTUGUESA  
DO AMBIENTE

Administração da Região  
Hidrográfica do Tejo e Oeste

### Delimitação da Água Balnear e Localização do Ponto de Monitorização



#### Coordenadas do Ponto de Monitorização:

Aproximadamente no enfiamento da estrada de acesso, frente ao apoio de praia Paleio e Mar, por trás dos balneários  
Latitude 38,571429°, Longitude -9,197475°  
Sistema de Coordenadas: ETRS89.

#### Avaliação da Qualidade da Água Balnear

Durante a época balnear são monitorizados indicadores microbiológicos de contaminação fecal pela ARH do Tejo, I.P., nas águas balneares designadas da sua área de intervenção, de acordo com a legislação em vigor, Decreto-Lei 135/09, de 3 de Junho, com as alterações introduzidas pelo Decreto-Lei 113/2012, de 23 de Maio. As águas balneares são classificadas de acordo com os níveis destes indicadores na água. Os *standards* europeus utilizados para classificar as águas balneares surgem de recomendações da Organização Mundial de Saúde e estão relacionados com questões de saúde pública. Os resultados da monitorização desta água balnear e mais informação sobre a avaliação da qualidade das águas balneares pode ser encontrada no sítio da APA: [www.apambiente.pt](http://www.apambiente.pt) e [www.snirh.pt](http://www.snirh.pt).

#### Avaliação da Qualidade da Água Balnear entre 2008 e 2012

Ano	2008	2009	2010	2011	2012
Classificação	Boa*	Acetável*	Boa*	Excelente**	Excelente**

\* Classificação segundo o Decreto-Lei nº236/98, de 1 de Agosto.

\*\* Classificação segundo o Decreto-Lei nº135/09, de 3 de Junho (que substitui o anterior), com as alterações introduzidas pelo Decreto-Lei nº 113/2012, de 23 de Maio.

#### Descrição da Bacia de Drenagem

O uso do solo na bacia drenante desta água balnear é constituído principalmente por zonas florestais com alguns aglomerados urbanos. Há uma forte ocupação urbana na zona da água balnear.

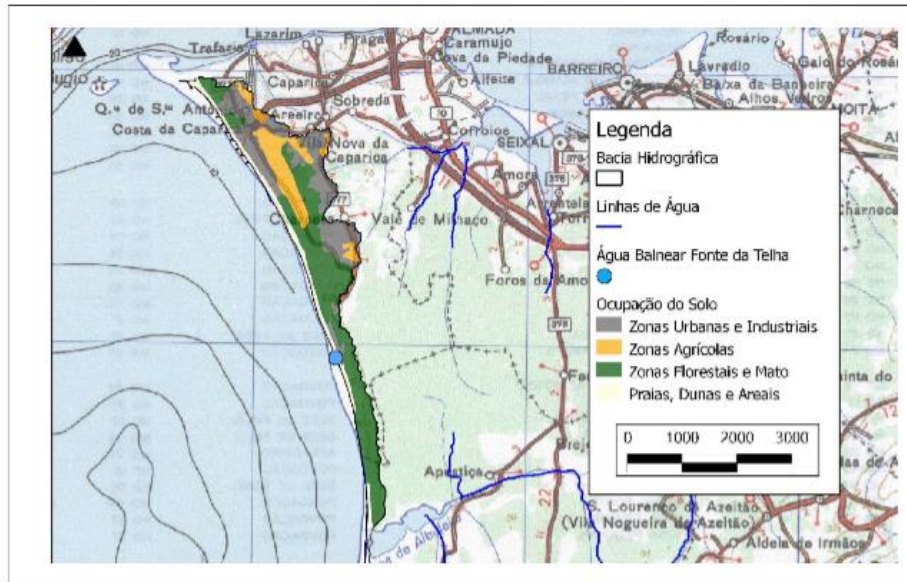


MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,  
DO MAR, DO AMBIENTE  
E DO ORDENAMENTO DO TERRITÓRIO



AGÊNCIA  
PORTUGUESA  
DO AMBIENTE

Administração da Região  
Hidrográfica do Tejo e Oeste





MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,  
DO MAR, DO AMBIENTE  
E DO ORDENAMENTO DO TERRITÓRIO



AGÊNCIA  
PORTUGUESA  
DO AMBIENTE

Administração da Região  
Hidrográfica do Tejo e Oeste

### Identificação das fontes potenciais de poluição, avaliação do risco e medidas de gestão

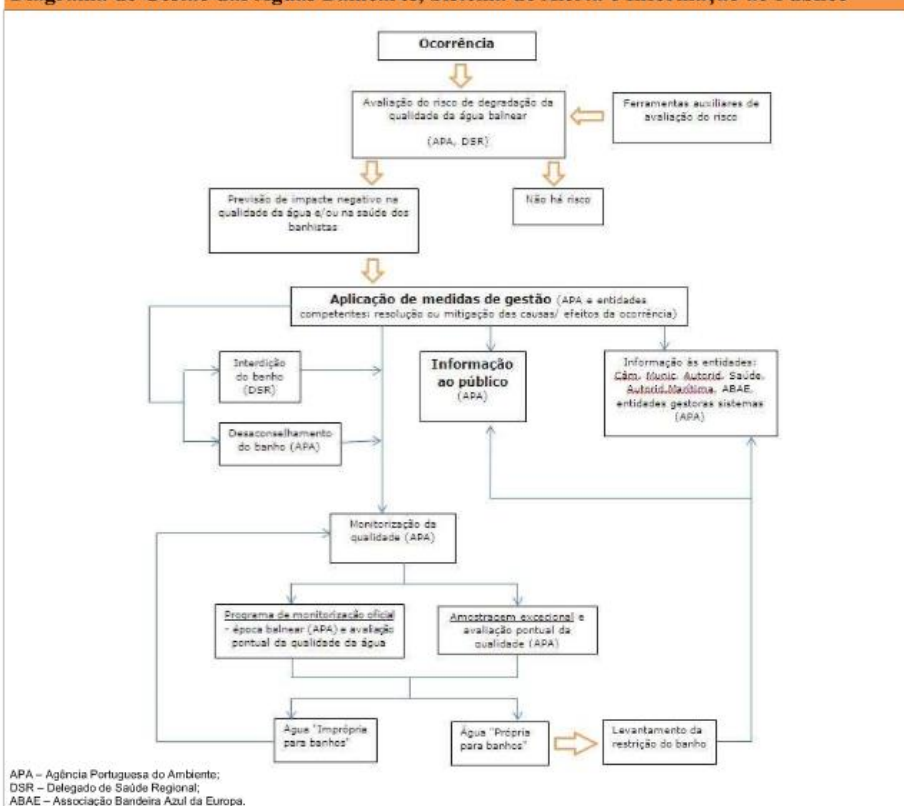
#### Potenciais Fontes de Poluição

Não existem fontes de poluição significativas na envolvente desta água balnear.

#### Risco de Ocorrência de Episódios de Poluição de Curta Duração

Não há historial de ocorrência de fenómenos de poluição de curta duração.

### Diagrama de Gestão das Águas Balneares, Sistema de Alerta e Informação ao Público



### Implementação de um Sistema de Alerta

Em caso de risco de ocorrência de fenómenos de poluição, será colocado um aviso a desaconselhar o banho.



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,  
DO MAR, DO AMBIENTE  
E DO ORDENAMENTO DO TERRITÓRIO



AGÊNCIA  
PORTUGUESA  
DO AMBIENTE

Administração da Região  
Hidrográfica do Tejo e Oeste

Avaliação do risco de proliferação de organismos potencialmente patogénicos	
<b>Cianobactérias</b>	Improvável
<b>Fitoplâncton</b>	Improvável
<b>Macroalgas</b>	Improvável
Medidas de Gestão	
Em caso de sintomas de bloom de fitoplâncton ou cianobactérias, desaconselhar a prática de banhos, ativar um programa de monitorização e alertar os serviços de saúde. Em caso de presença de excesso de macroalgas deve ser ativada a limpeza imediata da água e do areal.	

Identificação das Autoridades Competentes		
Gestão da Água Balnear	APA, I.P./ ARH do Tejo e Oeste	Av. Almirante Gago Coutinho, nº 30 - 1049-066 Lisboa Tel: 218430400 Fax: 218430404 Correio eletrónico: geral@apambiente.pt arht.geral@apambiente.pt
Autarquia	C.M. Almada	Lgo. Luís de Camões, 2800 - 158 Almada Tel: 212724534 Fax: 212724555 Email: gab.presidencia@cma.m-almada.pt
Saneamento	SMAS Almada	Praceta Ricardo Jorge, 2 Pragal - 2800-709 Almada Tel: 242726000 Fax: 242741629 Email: geral@smasalmada.pt
Autoridade de Saúde	A.R.S. Lisboa	Av. Estados Unidos da América, nº 77 - 1749 - 096 Lisboa Tel: 218424817 Fax: 218499740 Email: portal.arslvt@arslvt.min-saude.pt
Autoridade marítima	Capitania do Porto de Setúbal	Praça da República, 2904 - 537 Setúbal Tel: 265548270 Fax: 265548279 Email: capitania.setubal@marinha.pt



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,  
DO MAR, DO AMBIENTE  
E DO ORDENAMENTO DO TERRITÓRIO



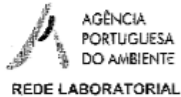
AGÊNCIA  
PORTUGUESA  
DO AMBIENTE

Administração da Região  
Hidrográfica do Tejo e Oeste

Ficha Técnica		
<b>Título</b>		
Perfil de água balnear da Fonte da Telha		
<b>Resumo</b>		
Este documento apresenta o primeiro perfil de água balnear realizado para a Fonte da Telha		
<b>Autor</b>		
APA, I.P./ ARH do Tejo e Oeste		
<b>Data de Produção</b>		
Março de 2011 (atualização em Maio de 2013)		
<b>Data de Revisão</b>		
Março de 2015		
<b>Motivo de Revisão</b>		
De acordo com o art.º 9º do Decreto-Lei 135/2009, de 3 de Junho, com as alterações introduzidas pelo Decreto-Lei 113/2012, de 23 de Maio, os perfis serão revistos se a classificação da água balnear se alterar ou se existirem alterações significativas na água balnear ou na zona envolvente. Classificação Boa – revisão de 4 em 4 anos; Aceitável - 3 em 3 anos; Má - 2 em 2 anos. Os perfis serão ainda atualizados se forem identificadas outras fontes de poluição.		
Fontes de Informação Relevante		
APA, I.P./ ARH do Tejo e Oeste	Informação sobre a qualidade pontual das águas balneares. Informação sobre Perfis de Água Balnear.	<a href="http://www.apambiente.pt">www.apambiente.pt</a>
SNIRH	Informação sobre águas balneares e qualidade das águas balneares.	<a href="http://www.snirh.pt">www.snirh.pt</a>
EEA	Informação sobre Ambiente na União Europeia.	<a href="http://www.eea.europa.eu/">www.eea.europa.eu/</a>
Lisboa, Maio de 2013		

## Anexo V - Registos de Resultados das Análises Microbiológica

Neste anexo é composto por alguns dos registos das Análises feitas ao longo deste trabalho.

	LRA – SETOR DE BIOLOGIA
	<b>REGISTO DE RESULTADOS DE ANÁLISE MICROBIOLÓGICA</b> <b>- MÉTODOS MINIATURIZADOS -</b> <b>Bactérias Coliformes, E. coli e Enterococos Intestinais</b>

Nº amostra	Data de colheita	Local de colheita	Observações
	05/06/18	Maçãs	

Bactérias coliformes	Dil./Toma	N.º de poços positivos	Resultado (NMP/100mL)
<input type="checkbox"/> Colilert			
<b>E. coli</b>	1:2	17	327
<input type="checkbox"/> Colilert <input checked="" type="checkbox"/> Microplaca	1:20	2	
<b>Enterococos intestinais</b>	1:2	8	143
<input type="checkbox"/> Enterolert <input checked="" type="checkbox"/> Microplaca	1:20	1	

Nº amostra	Data de colheita	Local de colheita	Observações
	05/06/18	Adrogo	


  

Bactérias coliformes	Dil./Toma	N.º de poços positivos	Resultado (NMP/100mL)
<input type="checkbox"/> Colilert			
<b>E. coli</b>	1:2	0	< 15
<input type="checkbox"/> Colilert <input checked="" type="checkbox"/> Microplaca	1:20	0	
<b>Enterococos intestinais</b>	1:2	0	< 15
<input type="checkbox"/> Enterolert <input checked="" type="checkbox"/> Microplaca	1:20	0	

O Técnico: Alcina Leonardo

Data de início do ensaio: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Data de fim do ensaio: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

 AGÊNCIA PORTUGUESA DO AMBIENTE REDE LABORATORIAL	LRA – SETOR DE BIOLOGIA	
	<b>REGISTO DE RESULTADOS DE ANÁLISE MICROBIOLÓGICA</b> <b>- MÉTODOS MINIATURIZADOS -</b> <b>Bactérias Coliformes, E. coli e Enterococos Intestinais</b>	

Nº amostra	Data de colheita	Local de colheita	Observações
	05/06/18	Magalhães	

Bactérias coliformes	Dil./Toma	N.º de poços positivos	Resultado (NMP/100mL)
<input type="checkbox"/> Colilert			
<b>E. coli</b>	1:2	64	34.659
<input type="checkbox"/> Colilert <input checked="" type="checkbox"/> Microplaca	1:20	31	
<b>Enterococos intestinais</b>	1:2	53	2059
<input type="checkbox"/> Enterolert <input checked="" type="checkbox"/> Microplaca	1:20	12	

Nº amostra	Data de colheita	Local de colheita	Observações
	05/06/18	F. Colares	

Bactérias coliformes	Dil./Toma	N.º de poços positivos	Resultado (NMP/100mL)
<input type="checkbox"/> Colilert			
<b>E. coli</b>	1:2	64	10.687
<input type="checkbox"/> Colilert <input checked="" type="checkbox"/> Microplaca	1:20	21	
<b>Enterococos intestinais</b>	1:2	64	8329
<input type="checkbox"/> Enterolert <input checked="" type="checkbox"/> Microplaca	1:20	18	


O Técnico: Alcina Leonardo

Data de início do ensaio:   /  /  

Data de fim do ensaio:   /  /  

Registos de introdução e validação de resultados com rastreabilidade na base de dados LabWay

Imp.044.LAB.1

	LRA – SETOR DE BIOLOGIA
	<b>REGISTO DE RESULTADOS DE ANÁLISE MICROBIOLÓGICA</b> <b>- MÉTODOS MINIATURIZADOS -</b> <b>Bactérias Coliformes, E. coli e Enterococos Intestinais</b>

Nº amostra	Data de colheita	Local de colheita	Observações
	05/06/18	F. de Lousa	Dupl. cu do
<b>Bactérias coliformes</b> <input type="checkbox"/> Colilert	Dil./Toma	N.º de poços positivos	Resultado (NMP/100mL)
<b>E. coli</b> <input type="checkbox"/> Colilert <input checked="" type="checkbox"/> Microplaca	1:2	64	8329
	1:2	18	
<b>Enterococos intestinais</b> <input type="checkbox"/> Enterolert <input checked="" type="checkbox"/> Microplaca	1:2	55	1976
	1:20	6	

Nº amostra	Data de colheita	Local de colheita	Observações
<b>Bactérias coliformes</b> <input type="checkbox"/> Colilert	Dil./Toma	N.º de poços positivos	Resultado (NMP/100mL)
<b>E. coli</b> <input type="checkbox"/> Colilert <input type="checkbox"/> Microplaca			
<b>Enterococos intestinais</b> <input type="checkbox"/> Enterolert <input type="checkbox"/> Microplaca			


O Técnico: Alcina Leonar

Data de início do ensaio: 1/1

Data de fim do ensaio: 1/1

Registos de introdução e validação de resultados com rastreabilidade na base de dados LabWay

Imp.044.LAB.1

 AGÊNCIA PORTUGUESA DO AMBIENTE REDE LABORATORIAL	LRA – SETOR DE BIOLOGIA
	REGISTO DE RESULTADOS DE ANÁLISE MICROBIOLÓGICA - MÉTODOS MINIATURIZADOS - Bactérias Coliformes, <i>E. coli</i> e Enterococos Intestinais

Nº amostra	Data de colheita	Local de colheita	Observações
	12.06.18	Rainha	

Bactérias coliformes	Dil./Toma	N.º de poços positivos	Resultado (NMP/100mL)
Bactérias coliformes <input type="checkbox"/> Collert			
<i>E. coli</i> <input type="checkbox"/> Collert <input checked="" type="checkbox"/> Microplaca	1:2 1:20	36 4	864
Enterococos intestinais <input type="checkbox"/> Enterolert <input checked="" type="checkbox"/> Microplaca	1:2 1:20	33 2	720

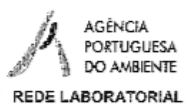
Nº amostra	Data de colheita	Local de colheita	Observações
		Rainha	Duplicado

Bactérias coliformes	Dil./Toma	N.º de poços positivos	Resultado (NMP/100mL)
Bactérias coliformes <input type="checkbox"/> Collert			
<i>E. coli</i> <input type="checkbox"/> Collert <input checked="" type="checkbox"/> Microplaca	1:2 1:20	33 4	764
Enterococos intestinais <input type="checkbox"/> Enterolert <input checked="" type="checkbox"/> Microplaca	1:2 1:20	34 21	796

O Técnico: Alcina Leonardo

Data de início do ensaio: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Data de fim do ensaio: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

	LRA – SETOR DE BIOLOGIA
	<b>REGISTO DE RESULTADOS DE ANÁLISE MICROBIOLÓGICA</b> <b>- MÉTODOS MINIATURIZADOS -</b> <b>Bactérias Coliformes, E. coli e Enterococos Intestinais</b>

Nº amostra	Data de colheita	Local de colheita	Observações
	12.06.18	conceição	

Bactérias coliformes	Dil./Toma	N.º de poços positivos	Resultado (NMP/100mL)
<input type="checkbox"/> Colilert			
<b>E. coli</b> <input type="checkbox"/> Colilert <input checked="" type="checkbox"/> Microplaca	1:2 1:20	0 0	< 15
<b>Enterococos intestinais</b> <input type="checkbox"/> Enterolert <input checked="" type="checkbox"/> Microplaca	1:2 1:20	0 0	< 15

Nº amostra	Data de colheita	Local de colheita	Observações
	12.06.18	Bajumeira	


  

Bactérias coliformes	Dil./Toma	N.º de poços positivos	Resultado (NMP/100mL)
<input type="checkbox"/> Colilert			
<b>E. coli</b> <input type="checkbox"/> Colilert <input checked="" type="checkbox"/> Microplaca	1:2 1:20	0 0	< 15
<b>Enterococos intestinais</b> <input type="checkbox"/> Enterolert <input checked="" type="checkbox"/> Microplaca	1:2 1:20	0 0	< 15

O Técnico: Alcina Leonardo

Data de início do ensaio: 1/1/1

Data de fim do ensaio: 1/1/1

 AGÊNCIA PORTUGUESA DO AMBIENTE REDE LABORATORIAL	LRA – SETOR DE BIOLOGIA
	REGISTO DE RESULTADOS DE ANÁLISE MICROBIOLÓGICA - MÉTODOS MINIATURIZADOS - Bactérias Coliformes, <i>E. coli</i> e Enterococos Intestinais

Nº amostra	Data de colheita	Local de colheita	Observações
	12.06.18	Costas	

Bactérias coliformes	Dil./Toma	N.º de poços positivos	Resultado (NMP/100mL)
Bactérias coliformes <input type="checkbox"/> Collert			
<i>E. coli</i> <input type="checkbox"/> Collert <input checked="" type="checkbox"/> Microplaca	1:20 1:20	3 0	64
Enterococos intestinais <input type="checkbox"/> Enterolert <input checked="" type="checkbox"/> Microplaca	1:2 1:20	0 0	2 15

Nº amostra	Data de colheita	Local de colheita	Observações

Bactérias coliformes	Dil./Toma	N.º de poços positivos	Resultado (NMP/100mL)
Bactérias coliformes <input type="checkbox"/> Collert			
<i>E. coli</i> <input type="checkbox"/> Collert <input type="checkbox"/> Microplaca			
Enterococos intestinais <input type="checkbox"/> Enterolert <input type="checkbox"/> Microplaca			

O Técnico: Alcina Leonardo

Data de início do ensaio: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Data de fim do ensaio: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

	LABORATÓRIO – SECTOR DE BIOLOGIA
	<b>REGISTO DE RESULTADOS</b> <b>- ANÁLISE MICROBIOLÓGICA -</b>

Nº amostra	Data de colheita	Local de colheita	Observações
	18/07/18	Pra. du Alumar	

	Dil./Toma	Presuntivo	Confirmação		Resultado (ufc/100mL)
			Oxidase	Lactose	
<b>Bactérias coliformes</b> (filtração por membrana)					
<b>Coliformes fecais</b> (filtração por membrana)			Confirmação Lactose		Resultado (ufc/100mL)
<b>E. coli</b> (filtração por membrana)	Dil./Toma	Presuntivo	Confirmação		Resultado (ufc/100mL)
			Oxid.	Lactose	Fluo-resc.
	100	49	(S)	(S)	49
	10	2			
<b>Enterococos intestinais</b> (filtração por membrana)	Dil./Toma	Presuntivo	Confirmação		Resultado (ufc/100mL)
	100	89	56		56
	10	11			
<b>C. perfringens</b> (filtração por membrana)	Dil./Toma	Presuntivo	Confirmação		Resultado (ufc/100mL)
<b>Microrganismos totais</b> (incorporação)	Dil./Toma	Resultado a 22°C (ufc/mL)		Resultado a 37°C (ufc/mL)	
	0,1mL				
	1mL				
<b>Salmonela - Pesquisa</b> (filtração por membrana)	Resultado (presença/ausência)				
	(ver 4.111.LAB)				

O Técnico: Alcina Leonardo

Data de início do ensaio: 18/07/18

Data de fim do ensaio:      /      /