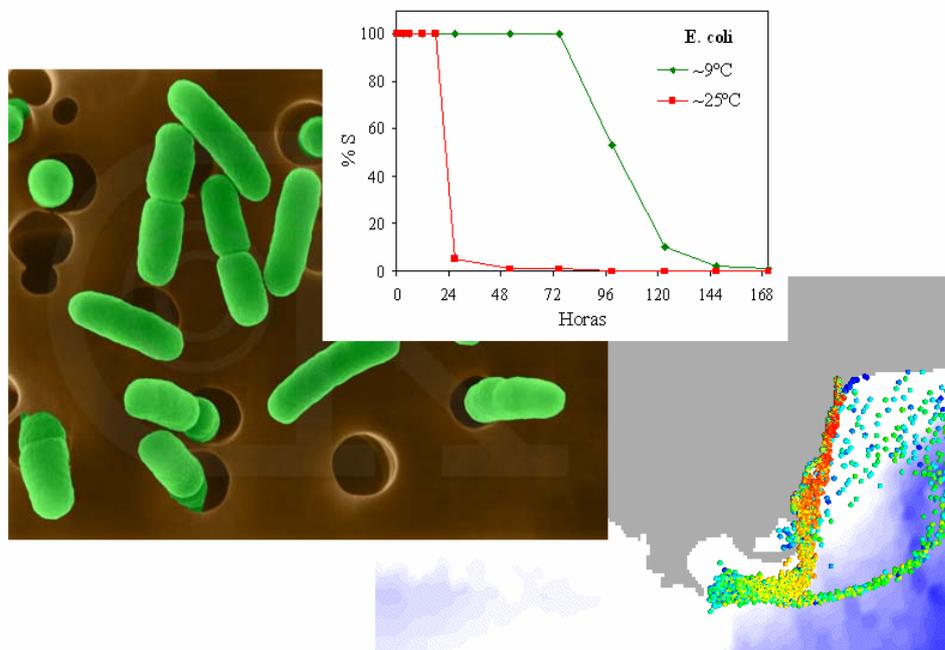




## Ensaio de mortalidade bacteriana em função de parâmetros ambientais seleccionados

Relatório técnico



Novembro, 2004

Ficha de Documentação		
Classificação:	Distribuição	Observações
Confidencial	Reservado ao Cliente	
<b>Título:</b> <b>Ensaio de mortalidade bacteriana em função de parâmetros ambientais seleccionados (relatório técnico)</b>		
<b>Palavras-chave:</b> Contaminação fecal, modelação numérica, qualidade da água, ensaios de mortalidade bacteriana		
<b>Resumo</b> <p>O estudo aqui apresentado teve como objectivo avaliar o efeito do stress ambiental na viabilidade dos indicadores de contaminação fecal. O objectivo deste estudo estendeu-se também à comparação dos resultados dos testes realizados com as previsões de dois modelos de mortalidade bacteriana em função de parâmetros ambientais utilizado no sistema de modelação MOHID.</p> <p>Neste estudo apenas foram considerados aqueles que são apontados na bibliografia como os principais factores ambientais que contribuem para a mortalidade destas bactérias indicadoras, nomeadamente a temperatura, a salinidade e a radiação solar. Os indicadores de contaminação fecal escolhidos para os testes foram os coliformes fecais e a <i>E. coli</i>. Os ensaios foram realizados em laboratório sob condições controladas, com um desenho experimental projectado para testar diferentes regimes dos parâmetros ambientais propostos. Estes ensaios englobaram assim diferentes regimes de radiação solar (ciclo diário e escuridão permanente), regimes de salinidade diferentes (18 UPS e 32 UPS), e regimes de temperatura distintos (aproximadamente 9°C e 25°C).</p> <p>Os resultados comprovam o efeito dos parâmetros estudados na mortalidade dos indicadores fecais geralmente referidos na bibliografia. Estes efeitos podem ser resumidos em: (1) aumento de mortalidade em função do aumento da radiação solar à qual os ensaios foram expostos, (2) aumento de mortalidade em função de um aumento da pressão osmótica (aumento de salinidade do meio), e (3) aumento da mortalidade em função do aumento da temperatura da água. A comparação dos resultados experimentais com as previsões calculadas pelos dois modelos considerados revelaram a capacidade destes em estimar a evolução temporal dos indicadores de contaminação fecal quando expostos a stress ambiental.</p>		
<b>Entidade que produziu o documento:</b> MARETEC 		
<b>Entidade para quem foi produzido o documento:</b> SANEST		
<b>Autor:</b> Marcos Mateus	<b>Título:</b> Mestre	
<b>Verificação:</b> Ramiro Neves	<b>Título:</b> Eng. Mecânico, Doutor	
<b>Contribuição:</b> Os ensaios experimentais apresentados neste trabalho foram realizados em Agosto de 2004 pela Dr. Sandra Mesquita, sob a supervisão da Prof. Doutora Helena Galvão, no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências do Mar e Ambiente da Universidade do Algarve.		
<b>Data de produção:</b> Novembro de 2004	<b>Nº de páginas:</b> 42	

## Resumo

O estudo aqui apresentado teve como objectivo avaliar o efeito do stress ambiental na viabilidade dos indicadores de contaminação fecal. O objectivo deste estudo estendeu-se também à comparação dos resultados dos testes realizados com as previsões de dois modelos de mortalidade bacteriana em função de parâmetros ambientais utilizado no sistema de modelação MOHID.

Neste estudo apenas foram considerados aqueles que são apontados na bibliografia como os principais factores ambientais que contribuem para a mortalidade destas bactérias indicadoras, nomeadamente a temperatura, a salinidade e a radiação solar. Os indicadores de contaminação fecal escolhidos para os testes foram os coliformes fecais e a *E. coli*. Os ensaios foram realizados em laboratório sob condições controladas, com um desenho experimental projectado para testar diferentes regimes dos parâmetros ambientais propostos. Estes ensaios englobaram assim diferentes regimes de radiação solar (ciclo diário e escuridão permanente), regimes de salinidade diferentes (18 UPS e 32 UPS), e regimes de temperatura distintos (aproximadamente 9°C e 25°C).

Os resultados comprovam o efeito dos parâmetros estudados na mortalidade dos indicadores fecais geralmente referidos na bibliografia. Estes efeitos podem ser resumidos em: (1) aumento de mortalidade em função do aumento da radiação solar à qual os ensaios foram expostos, (2) aumento de mortalidade em função de um aumento da pressão osmótica (aumento de salinidade do meio), e (3) aumento da mortalidade em função do aumento da temperatura da água. A comparação dos resultados experimentais com as previsões calculadas pelos dois modelos considerados revelaram a capacidade destes em estimar a evolução temporal dos indicadores de contaminação fecal quando expostos a stress ambiental.

---

# Conteúdo

---

<b>1</b>	<b>Introdução</b>	<b>2</b>
1.1	Enquadramento do trabalho . . . . .	4
<b>2</b>	<b>Metodologia</b>	<b>5</b>
2.1	Desenho experimental . . . . .	5
2.1.1	Ensaio 1 . . . . .	6
2.1.2	Ensaio 2 . . . . .	6
2.1.3	Ensaio 3 . . . . .	6
2.2	Amostragem e análise de microrganismos indicadores . . . . .	8
2.3	Parâmetros calculados . . . . .	9
2.4	Modelos numéricos de mortalidade . . . . .	9
<b>3</b>	<b>Resultados e discussão</b>	<b>12</b>
3.1	Parâmetros físico-químicos . . . . .	12
3.2	Evolução temporal dos indicadores . . . . .	14
3.3	Comparação com os resultados dos modelos . . . . .	25
<b>4</b>	<b>Relevância dos modelos utilizados</b>	<b>35</b>
<b>5</b>	<b>Conclusões</b>	<b>38</b>
<b>6</b>	<b>Referências bibliográficas</b>	<b>40</b>

---

# 1. Introdução

---

Nas actuais medidas de gestão dos recursos aquáticos, a utilização de microorganismos como indicadores do estado ou qualidade da água constitui uma prática comum a nível mundial. A Directiva da Água da Comunidade Europeia (76/160/CE) estabelece as normas de qualidade de águas balneares em relação a várias substâncias para os países membros, tendo esta legislação ambiental o objectivo de proteger a qualidade das águas superficiais ao controlar as descargas que a possam comprometer.

As normas mais importantes destas legislações estão relacionadas com a contaminação fecal de uma forma geral, e mais especificamente com o grupo de bactérias coliformes. Habitualmente são utilizados como indicadores da qualidade bacteriológica da água os seguintes grupos de bactérias: coliformes fecais (CF), coliformes totais (CT) e enterococcus fecais (EF). Estas bactérias tem sido associadas à presença de microorganismos patogénicos em águas de recreio [1, 2], revelando uma contaminação fecal de origem em animais homeotérmicos (habitualmente designados de animais de “sangue-quente”). Neste sentido, águas onde estas bactérias são encontradas poderão sugerir a existência de descargas provenientes de viveiros (criações de aves, gado, etc.) ou de origem humana. Os efeitos na saúde pública resultantes da exposição e ingestão inadvertida aquando da utilização de águas de recreio contaminadas com estes indicadores abrangem uma extensa lista de sintomas, da qual se salienta o aparecimento de infecções gastrointestinais, infecções pulmonares e das vias respiratórias e problemas de irritação de olhos e pele.

O aumento verificado nas últimas décadas de descargas de efluentes provenientes de Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETARs) directamente no meio ambiente, muitas das vezes em zonas próximas de locais de utilização pública da água, tem levado à formulação de questões relacionadas com a capacidade de sobrevivência de microrganismos indicadores sob diferentes condições ambientais [3]. Nesse âmbito, têm sido efectuados exaustivos estudos que tem ajudado a compreender que impacto factores ambientais como o pH, a temperatura, a radiação solar (UV e visível), a

predação, o stress osmótico, a disponibilidade de nutrientes, os níveis de turvação e a concentração de oxigénio podem ter na composição das comunidades bacterianas, e até que ponto são determinantes para as taxas de inactivação dos indicadores após a sua entrada no meio aquático receptor. No caso da persistência das bactérias indicadoras de contaminação fecal, vários estudos [4-8] têm demonstrado que estes parâmetros contribuem para o declínio destes organismos, mas apontam para um maior impacto da radiação solar, temperatura e salinidade.

Tais estudos apresentam particular interesse para a área da modelação numérica da dispersão de plumas de emissários ou outras fontes de contaminação em meios aquáticos. Uma vez que frequentemente se derivam funções de resposta das comunidades bacterianas aos parâmetros ambientais em estudo, um dos produtos destes ensaios são modelos de decaimento ou mortalidade destes indicadores [9-11]. Estes modelos acabam por ser incorporados em modelos de circulação e dispersão, conferindo assim maior realismo às simulações do alcance de emissões de águas contaminadas em meios receptores e no seu impacto na qualidade da água local de zonas adjacentes. Esta metodologia foi incorporada e tem sido utilizada no sistema de modelação *MOHID* nos últimos anos.

No que respeita aos requisitos de controlo apropriados necessários para obter determinados padrões de qualidade da água, decisões fiáveis estão dependentes da capacidade de relacionar de uma forma quantitativa as descargas com alterações espaciais e temporais no meio receptor. E estas relações são particularmente sensíveis às condições ambientais naturais. A dependência dos factores biológicos e ambientais levanta, no entanto, sérios problemas no que respeita a tentar estabelecer relações causa/efeito e quantificá-las, uma vez que os dados necessários podem não estar disponível para todos os cenários possíveis.

Estes constrangimentos criam a necessidade de uma melhor compreensão de como os processos que determinam a qualidade da água evoluem no tempo e no espaço. Assim, torna-se imperativo possuir a capacidade de traçar cenários da evolução das descargas de água contaminada em diferentes condições, e os modelos matemáticos são geralmente utilizados para este efeito. A utilização destas ferramentas, que compreendem a simulação de processos hidrodinâmicos e biológicos, para determinar a evolução de uma pluma no meio receptor e para estimar a sua concentração de indicadores

fecais no tempo é o melhor método de integrar a grande quantidade de informação necessária (a variação de cada parâmetro envolvido no espaço e no tempo). Para além disto, a utilização destas ferramentas de modelação ajuda a complementar os métodos tradicionais de amostragem e monitorização. Por estas razões, a utilização de modelos numéricos no estudo dos impactos na qualidade da água tem-se generalizado [12-14].

## 1.1 Enquadramento do trabalho

Na última década tem sido investido um grande esforço na identificação e erradicação de fontes pontuais de contaminação fecal ao longo de toda a Costa do Estoril, e até ao momento este esforço tem provado ser eficaz. Uma vez que esta zona é um destino turístico popular durante os meses de Verão, a melhoria da qualidade da água para assim minimizar os riscos de saúde pública tem sido uma das grandes preocupações das entidades envolvidas em tal esforço. Parte deste trabalho tem exigido a utilização de ferramentas numéricas de estudo do meio em causa, nomeadamente dos factores determinantes da qualidade da água.

Considerando o impacto que os indicadores de contaminação fecal podem ter na saúde pública, juntamente com o facto de tais indicadores serem utilizados como critério de avaliação da qualidade das praias, este trabalho teve como principal linha de orientação determinar o impacto de alguns parâmetros ambientais na evolução temporal das populações de agentes patogénicos que atingem as águas costeiras via efluentes urbanos.

Pretendeu-se determinar de uma forma mais específica o alcance que os efeitos da salinidade, temperatura e radiação solar no ambiente aquático poderão ter na sobrevivência de microorganismos indicadores como a *E. coli* e os coliformes totais.

Este trabalho teve também como objectivo comparar resultados de ensaios experimentais de mortalidade com resultados obtidos através de alguns modelos de mortalidade recolhidos na literatura e utilizados habitualmente nas simulações de dispersão das plumas de emissários ou de outras emissões pontuais na costa do Estoril. Esta tarefa permite ganhar sensibilidade para os resultados obtidos nestas simulações e determina até que ponto os modelos utilizados reflectem o efeito das condições ambientais de um modo satisfatório.

---

## 2. Metodologia

---

Esta secção compreende a descrição de todos os procedimentos envolvidos nos ensaios de mortalidade dos indicadores bacterianos de contaminação fecal e na comparação dos resultados dos mesmos com os resultados de modelos de mortalidade bacteriana em função de alguns parâmetros ambientais.

### 2.1 Desenho experimental

A metodologia eleita para este estudo do impacto do stress ambiental na mortalidade de indicadores microbiológicos da qualidade da água consistiu na realização de testes em laboratório com condições ambientais controladas. Dada a sua fácil implementação e controle das condições, optou-se por este método em detrimento da realização de testes *in situ*. Esta metodologia é frequentemente utilizada em testes desta natureza, como revelam os inúmeros trabalhos publicados a descrever o efeito de parâmetros ambientais na mortalidade dos indicadores de contaminação fecal (p.e., [15, 16]).

Foram realizados três ensaios para determinar o efeito na inactivação de coliformes totais (CT) e de *E. coli* induzido pelas diferentes condições ambientais (radiação, salinidade e temperatura). Cada ensaio apresentava um esquema de montagem experimental específico para cada um dos parâmetros em causa, e em cada um deles foram realizados 3 replicados para cada conjunto de condições distinto de condições. Sempre que se variou o parâmetro em estudo em cada um dos ensaios, tentou-se manter os outros fixos para garantir que a sua contribuição fosse igual em todos os replicados.

A estratégia de amostragem foi a mesma para todos os ensaios. Nas primeiras 12 horas de teste foram realizadas recolhas para a análise em intervalos de 3 horas. A partir das 12 horas de teste foi realizada uma nova amostragem num intervalo de 12 horas e daí em diante foram realizadas amostragens em intervalos de 24 horas. Os ensaios foram projectados para ter uma duração máxima aproximada de 123 horas (aproximadamente 5 dias), sendo no entanto por vezes necessário prolongar este período como consequência da mortalidade baixa verificada em alguns testes. Assim os tempos

de incubação onde se realizaram amostragem foram: 0, 3, 6, 9, 12, 24, 48, 75, 99 e 123 horas. Todos os ensaios tiveram início por volta das 12 horas. No total, foram efectuadas aproximadamente 192 amostragens para análise dos indicadores biológicos em estudo.

As condições específicas para cada ensaio estão descritas na tabela 2.1, mas segue-se uma explicação mais detalhada de cada um deles.

### 2.1.1 Ensaio 1

Este ensaio teve como objectivo determinar o efeito de diferentes regimes de radiação na inactivação dos dois tipos de bactérias indicadoras escolhidos. Para tal, optou-se por realizar o ensaio no exterior para aproveitamento da luz solar natural. Montaram-se três 3 microcosmos (aquários de vidro com uma capacidade de 40L) que ficaram expostos ao ciclo diário de radiação (período diurno + período nocturno) e três microcosmos que foram totalmente revestidos com película preta de modo a evitar a exposição à luz, garantindo assim a escuridão total durante todo o período de teste. Estes microcosmos serviram de controlo para os seus resultados serem comparados com os resultados dos microcosmos expostos à luz. Optou-se por utilizar a exposição à luz natural em detrimento do recurso a lâmpadas solares, garantindo assim uma aproximação mais correcta ao efeito do ciclo diário de radiação na mortalidade dos indicadores.

### 2.1.2 Ensaio 2

Este ensaio teve como objectivo estudar o efeito da pressão osmótica sobre a sobrevivência de *E. coli* e CT. Assim, montaram-se microcosmos para serem expostos a regimes diferentes de salinidade: três onde foi colocada água com salinidade de 18 UPS (Unidades Práticas de Salinidade) e três onde foi colocada água com salinidade de 32 UPS. Todos os microcosmos foram expostos ao ciclo diário de radiação.

### 2.1.3 Ensaio 3

Finalmente, este ensaio pretendeu testar o efeito induzido por dois regimes de temperatura na inactivação dos microorganismos indicadores. Foi escolhido um regime de baixas temperaturas ( $9^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ) e um regime de temperaturas médias ( $25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ).

Tabela 2.1: Condições ambientais projectadas para cada ensaio realizado.

<b>Ensaio</b>	<b>Radiação</b>	<b>Salinidade (UPS)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>
1	Ciclo diário (exterior) Escurecimento	32	Ambiente ( $\simeq 25^{\circ}\text{C}$ )
2	Ciclo diário (exterior)	32 18	Ambiente ( $\simeq 25^{\circ}\text{C}$ )
3	Ciclo diário (interior)	32	$25^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$ $9^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$

Por questões logísticas e dada a necessidade de refrigeração necessária à manutenção dos microcosmos em regime de baixas temperaturas, optou-se pela montagem deste ensaio no interior do laboratório. Tal opção condicionou, no entanto, a intensidade luminosa à qual o ensaio foi sujeito. Foram então ligados 3 microcosmos a um sistema de refrigeração regulado para  $9^{\circ}\text{C}$  e os restantes três foram mantidos à temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ).

A água utilizada nos ensaios foi colhida junto à saída de uma ETAR em fase de preia-mar. Os valores de salinidade, oxigénio dissolvido e temperatura da água no local de recolha foram de 34 UPS, 71% saturação e  $18^{\circ}\text{C}$  respectivamente. A partir do volume de água colhida (aproximadamente 140 L para os ensaios 1 e 2 realizados em simultâneo e 80L para o ensaio 3), retirou-se uma aliquota de 500 mL para o isolamento e cultura dos microrganismos utilizados nos ensaios. As culturas de *E. coli* e de CT foram isoladas mediante a utilização de meios de cultura e temperaturas de incubação específicos para cada um dos dois tipos de bactérias<sup>1</sup>.

Cada microcosmo foi cheio com um volume de 10 L de água. Os volumes da água utilizados nos microcosmos foram previamente filtrados por membranas de fibra de vidro de  $1,2\ \mu\text{m}$  de porosidade para remoção de material particulado de maiores dimensões e de potenciais predadores de modo a tentar minimizar o impacto destes agentes no resultado dos testes. Todos os microcosmos foram equipados com meios mecânicos de arejamento, sendo todo o material utilizado na montagem dos ensaios descontaminado por passagem numa solução de HCL a 10%, seguindo-se a neutralização numa solução de NaOH a 0,1% e finalmente a passagem por água destilada (procedimento

<sup>1</sup>Meio de cultura A1 (Difco) incubado a  $44,5^{\circ}\text{C}$  para selecção de *E. coli* e mEndo Agar (Difco) incubado a  $35^{\circ}\text{C}$  para selecção de CT.

realizado três vezes).

Para todos os ensaios foi acertada a salinidade da água para 32 UPS através da adição de água destilada, excepto no ensaio 2 (pressão osmótica) em que em três microcosmos foi acertado o valor de salinidade até 18 UPS. Em cada ponto temporal amostrado foram registados os valores de temperatura ambiente, temperatura da água em cada microcosmo, radiação e salinidade.

## 2.2 Amostragem e análise de microrganismos indicadores

A determinação dos valores de coliformes totais e de *E. coli* foi efectuada pela aplicação dos testes de substrato cromogénico Colilert<sup>®</sup> da IDEXX Laboratories Inc. (Westbrook, ME, USA), de acordo com a metodologia proposta pela American Public Health Association [17].

Esta metodologia é baseada na actividade das enzimas beta-galctosidase e beta-glucuronidase possibilitando a detecção em simultâneo de coliformes totais e de *E. coli*. O meio de cultura contém indicadores específicos que possibilitam determinar de um modo simples o consumo de determinado nutriente. Nos testes utilizados o ONPG (nutriente) apresenta uma coloração amarela ao ser metabolizado por coliformes, e o MUG (nutriente) fica fluorescente sob luz UV quando metabolizado pela *E. coli*.

Seguindo as instruções do fabricante dos testes, adicionou-se a cada 100 mL de amostra o conteúdo do meio de cultura correspondente a uma análise, que foi homogeneizado por agitação manual e colocado num tabuleiro de incubação e leitura. O tabuleiro foi colocado na máquina seladora e depois de selado foi incubado durante um período de 18h a 35 °C. Decorrido este período, procedeu-se à enumeração de poços positivos para CT (número de poços com coloração amarela) e *E. coli* (número de poços que apresentaram fluorescência sob luz quando expostos a luz UV). Recorrendo à tabela de probabilidades fornecida pelo fabricante dos testes, determinou-se então o tamanho da população viável, expresso em UFC / 100ml (Unidades Formadoras de Colónias).

## 2.3 Parâmetros calculados

Para além da representação gráfica da evolução das populações cultivadas ao longo do tempo em resposta aos parâmetros ambientais, foi também estimada a percentagem de sobrevivência (% S) para cada ensaio. Este valor foi obtido através da seguinte formula:

$$\%S = 100 \times \frac{N}{N_o} \quad (2.1)$$

em que  $N$  representa a concentração do indicador no tempo  $t$  e  $N_o$  a concentração do mesmo indicador no inicio do ensaio ( $t = 0$ ). Este parâmetro ilustra de uma forma mais óbvia a evolução da sobrevivência relativa da população no tempo, o que por vezes não é tão claro através da simples análise da variação de concentrações no tempo.

## 2.4 Modelos numéricos de mortalidade

As variáveis ambientais são frequentemente tidas em consideração na construção de equações gerais utilizadas para estimar a densidade de indicadores microbiológicos. Estas equações são obtidas utilizando análises de regressão múltipla derivadas de conjuntos de observações.

Os modelos de mortalidade de indicadores microbiológicos de contaminação fecal são utilizados para estimar o impacto da temperatura, salinidade e radiação solar no decaimento destes organismos (alguns modelos podem incorporar outros factores). A taxa de mortalidade das bactérias indicadoras é representada por uma equação de primeira ordem (a Lei de Chick para a desinfecção), que refere que a taxa de perda é proporcional à concentração:

$$\frac{\partial N}{\partial t} = -kN \quad (2.2)$$

sendo  $N$  é a concentração inicial de bactérias no efluente e  $k$  a taxa de decaimento de primeira ordem ( $d^{-1}$ ) ou coeficiente de mortalidade. Este parâmetro é geralmente descrito na forma do somatório da contribuição de cada parâmetro individual:

$$k = k_b + k_i + k_s + k_p \quad (2.3)$$

onde  $k_b$  corresponde mortalidade em função da temperatura e salinidade,  $k_i$  a taxa de mortalidade devido à radiação solar,  $k_s$  o acréscimo/decrécimo

liquido devido à ressuspensão/deposição, e  $k_p$  a mortalidade induzida pela predação. Nos modelos aqui utilizados a contribuição dos processos ressuspensão/deposição e predação não são considerados.

No primeiro modelo utilizado [18], o efeito cumulativo dos três parâmetros é expresso sob a forma de:

$$k = (0.8 + 0.02S) \times 1.07^{(T-20)} + \frac{\alpha \cdot I_o}{k_e \cdot h} (1 - e^{-k_e \cdot h}) \quad (2.4)$$

em que  $S$  e  $T$  correspondem à salinidade (UPS) e temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ), respectivamente. Este modelo incorpora a parameterização para determinar a intensidade da luz em profundidade, tomando em consideração a luz que atinge a superfície da água e calculando a extinção na coluna de água em função da concentração de matéria orgânica. No segundo termo da equação, onde é obtido o efeito da mortalidade,  $I_o$  é a radiação solar à superfície ( $\text{W m}^{-2}$ ),  $\alpha$  uma constante de proporcionalidade utilizada para converter as unidades de radiação utilizadas por default neste modelo,  $k_e$  o coeficiente de extinção da luz na coluna de água ( $\text{m}^{-1}$ ) e  $h$  a altura da coluna de água (m).

O segundo modelo considerado foi derivado a partir de determinações de taxas de mortalidade de *E. coli* realizadas em laboratório e *in situ* no mar Cantábrico [9]. Neste modelo, a combinação do efeito simultâneo dos factores ambientais é expressa como:

$$k = 2.533 \times 1.04^{(T-20)} \times 1.012^S + 0.113i_z \quad (2.5)$$

onde  $S$  e  $T$  correspondem à salinidade e temperatura do meio receptor, respectivamente,  $i_z$  e à radiação à profundidade  $z$  (m). Neste modelo o efeito da luz é ligeiramente diferente, uma vez que não se calcula explicitamente a sua extinção, sendo antes utilizados valores de radiação para diferentes profundidades estimados fora deste modelo. Esta aproximação pode ser facilmente adaptada em modelos hidrodinâmicos que calculam a extinção da luz em profundidade.

A mortalidade bacteriana é geralmente expressa na forma do T90, que é o tempo a partir do qual 90% da população deixa de ser detectável nas medições, o que significa uma redução logarítmica no numero de patogénicos [19]. Assumindo um decaimento de primeira ordem, este método alternativo de expressar a taxa efectiva de decaimento descreve o declínio das bactérias

no tempo que demora a alcançar 90% da mortalidade do número original de bactérias. Este valor é calculado de acordo com [18]:

$$T_{90} = \frac{2.303}{k} \quad (2.6)$$

---

## 3. Resultados e discussão

---

### 3.1 Parâmetros físico-químicos

Os parâmetros ambientais foram registados para cada microcosmos no momento de cada amostragem. Para evitar redundância e excesso de informação apresenta-se apenas na tabela 3.1 os valores máximos e mínimos registados para os diversos parâmetros físico-químicos no decorrer dos três ensaios realizados e as medições da radiação solar realizadas no momento das amostragens. Na figura 3.1 estão representados estes valores, sendo conveniente realçar que no caso da simulação 1 apenas se representam os valores dos microcosmos expostos ao ciclo diário de luz. Os valores apresentados correspondem à média dos valores dos três microcosmos de cada situação específica dentro de cada simulação. Não se encontram representados os valores relativos ao ensaio 3 dadas as condicionantes inerentes a este ensaio.

Registaram-se valores mínimos na temperatura da água nas amostragens efectuadas durante o período nocturno (entre as 21h e as 3h), sendo os valores máximos de temperatura obtidos em amostragens efectuadas entre as 13h e as 15h. No caso do ensaio 3 a variação de temperatura para os aquários mantidos à temperatura ambiente (regime de temperatura média) registou uma oscilação de aproximadamente 3°C. Excepto no ensaio 3, verificou-se por vezes uma variação da temperatura da água dos outros ensaios, reflectindo de alguma forma a variação da temperatura ambiente do local onde foram montados os microcosmos.

Os valores de radiação medidos referem-se a radiação PAR (radiação activa fotossintética) e os valores máximos e mínimos registados (para os ensaios 1 e 2 realizados no exterior), foram obtidos em amostragens realizadas no período entre as 12h e as 15h. No ensaio 3, realizado no interior do laboratório com condições de radiação controladas, os valores foram bastante inferiores aos registados para os ensaios 1 e 2, nunca ultrapassando 2 W m<sup>-2</sup>.

Os valores de salinidade apresentaram ligeiras variações pontuais nos ensaios 1 e 2, mas mantendo-se constantes ao longo dos testes no ensaio 3.

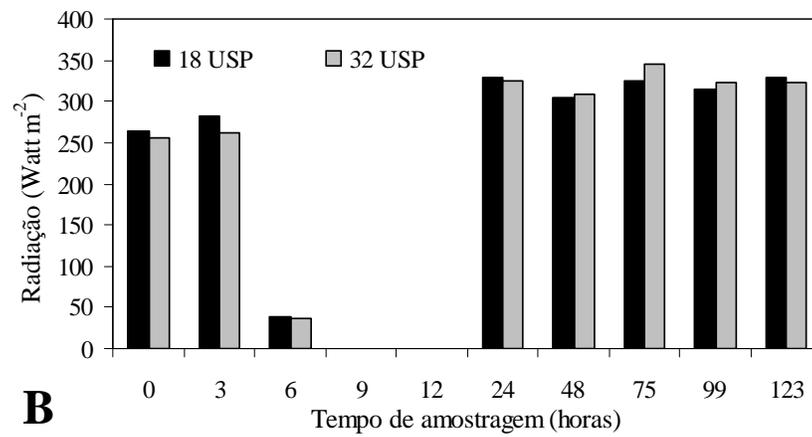
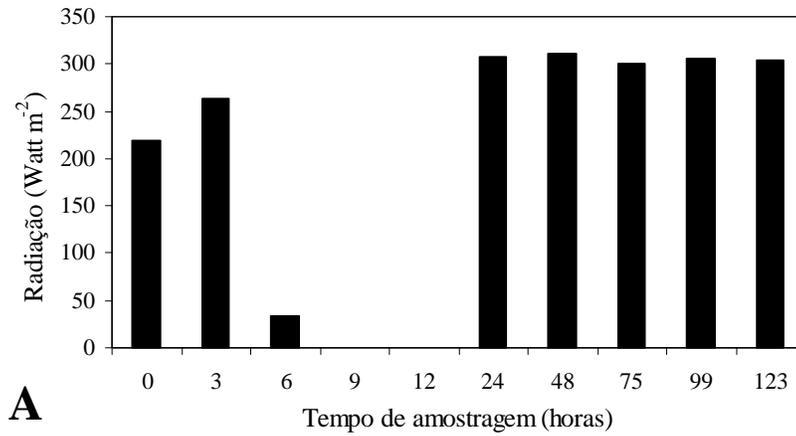


Figura 3.1: Medição pontual da radiação solar no momento de cada recolha de amostras; (a) ensaio 1; (b) ensaio 2.

Tabela 3.1: Valores máximos e mínimos dos parâmetros físico-químicos observados no decorrer dos ensaios.

		Temperatura da água (°C)	Temperatura ambiente (°C)	Radiação (W m <sup>-2</sup> )	Salinidade (UPS)
<b>Ensaio #1</b>					
24h escuridão	máx.	39.8	41.8	-	33
	mín.	25.9	25.8	-	32
ciclo diário	máx.	43	41.8	341.5	33
	mín.	25.6	25.8	32.1	32
<b>Ensaio #2</b>					
salinidade 18 UPS	máx.	43.5	41.8	352.2	18.5
	mín.	25.7	25.8	32.9	18.0
salinidade 32 UPS	máx.	44.3	41.8	367.6	33
	mín.	25.9	25.8	35.9	32
<b>Ensaio #3</b>					
Temperatura baixa	máx.	12	29.8	1.3	32
	mín.	6	24	0.5	32
Temperatura média	máx.	28	29.8	0.6	32
	mín.	24.8	24	0.5	32

## 3.2 Evolução temporal dos indicadores

Os resultados obtidos nos ensaios representados nas figuras 3.2 a 3.4 confirmam os efeitos das pressões ambientais frequentemente referidos na bibliografia. Este efeito pode ser resumido em:

- mortalidade mais elevada em amostras expostas à luz solar relativamente a amostras mantidas no escuro;
- uma mortalidade mais elevada em populações sujeitas a maior pressão osmótica;
- maior viabilidade das populações em temperaturas mais baixas.

De uma forma geral foi observada uma elevada redução nas concentrações de ambos os indicadores no período inicial de 48 horas. Esta redução atingiu cerca de 2 unidades logarítmicas. Apesar da duração máxima dos ensaios 1 e 2 ter sido de 123 horas, a população de indicadores desapareceu ao fim de aproximadamente 100 horas. O mesmo já não aconteceu no ensaio

3 onde mesmo ao fim de 168 horas ainda se verificaram concentrações relativamente elevadas de indicadores. Esta ocorrência poderá ser justificada em parte pela baixa radiação solar a que este ensaio foi sujeito durante todo o período de testes, uma vez estar situado dentro das instalações do laboratório onde apenas recebia luz artificial.

## Ensaio 1

Verifica-se um declínio das populações mais acentuado nos testes expostos ao ciclo diário de radiação solar. Este declínio é, no entanto, mais marcado no caso da *E. coli* que ao fim de 48 horas de teste já desceu para aproximadamente 100 *CFU/100ml*. A diferença entre os dois regimes de radiação não é tão evidente no caso dos CT no gráfico representado na figura 3.2 uma vez que é utilizada uma escala logarítmica para as concentrações de indicadores. Por esse motivo optou-se por representar também a evolução temporal da percentagem de sobrevivência das populações, como se pode ver na figura 3.5. Neste caso é mais claro o impacto verificado nas primeiras horas dos ensaios, onde se verifica que em ambos os indicadores a percentagem de sobrevivência em as amostras expostas à radiação cai para aproximadamente 25% em apenas 12 horas. A mesma percentagem só é alcançada nos testes ao escuro cerca de 30 horas depois.

## Ensaio 2

Talvez a característica mais marcante nos resultados obtidos na simulação 2 seja a discrepância nos resultados entre os dois indicadores, que apresentam curvas de decaimento distintas (figura 3.3). Enquanto que no caso da *E. coli* se verifica uma acentuada quebra nos valores de %S nas 3 horas iniciais dos testes, o mesmo não acontece para os CT onde os valores se mantêm constantes durante as 48 horas iniciais de incubação.

O ensaio 2 revela também a uma diferença induzida pelo choque osmótico. Os testes realizados no regime mais elevado de salinidade (32 UPS) um impacto deste parâmetro mais acentuado no decréscimo das populações de ambos indicadores. Este efeito é mais acentuado nas primeiras 24 horas no caso da *E. coli* e nas primeiras 48 horas nos CT.

## Ensaio 3

Os resultados deste ensaio (figura 3.4) revelam um maior impacto na mortalidade das populações no caso dos testes expostos à temperatura ambiente ( $25\pm 3^\circ\text{C}$ ) em relação aos testes a baixa temperatura ( $9\pm 3^\circ\text{C}$ ). Este efeito é mais óbvio no caso da *E. coli* nas primeiras 24 horas. Para os CT o efeito da temperatura é semelhante de uma forma geral, muito embora se verifique uma redução mais acentuada nas primeiras horas para temperaturas baixas. Nas 24 horas iniciais a percentagem de sobrevivência desceu para aproximadamente 20% em ambos os indicadores revelando de uma forma clara o efeito da temperatura. Convém ainda salientar que os CT atingiram as 170 horas de ensaio (mais de 7 dias) com uma concentração média superior a 10000 *UFC/100ml*. Os dois tipos de bactérias indicadoras testados registaram uma capacidade de sobrevivência por períodos de tempo bastante elevados em regime de baixas temperaturas, sendo no entanto de salientar a manutenção de valores mais elevados de CT ao longo de todo o ensaio.

A sobrevivência dos dois tipos de bactérias nos ensaios realizados foi diferente em cada um dos regimes de exposição a radiação. As curvas de sobrevivência (figuras 3.5 a 3.7) demonstram que o T90 é maior em situação de baixa ou nenhuma radiação solar, reflectindo uma capacidade de sobrevivência maior nestes regimes de luz. Ambos os indicadores apresentaram um comportamento semelhante em resposta a este conjunto de condições.

O efeito negativo da luz solar na sobrevivência de bactérias entéricas no meio aquático, observado neste estudo, é conhecido desde há várias décadas [3]. As proteínas celulares e ácidos nucleicos apresentam uma elevada absorção da radiação UV e assim o efeito letal deste comprimento de onda<sup>1</sup> está relacionado com alterações fotoquímicas induzidas pela absorção molecular [20]. Analisando os resultados de uma forma geral, pode-se concluir que a radiação solar pode ser apontada como o principal factor de mortalidade dos indicadores de contaminação fecal na água. Para muitas bactérias parece existir uma relação linear entre o T90 e a temperatura e a radiação solar [21]. Esta característica é fundamental quando se estudam os métodos

---

<sup>1</sup>A região de absorção máxima pelos ácidos nucleicos ronda os 265nm, que corresponde ao comprimento de onda com maior efeito na mortalidade.

**Ensaio 1:** Ensaio com diferentes regimes de radiação

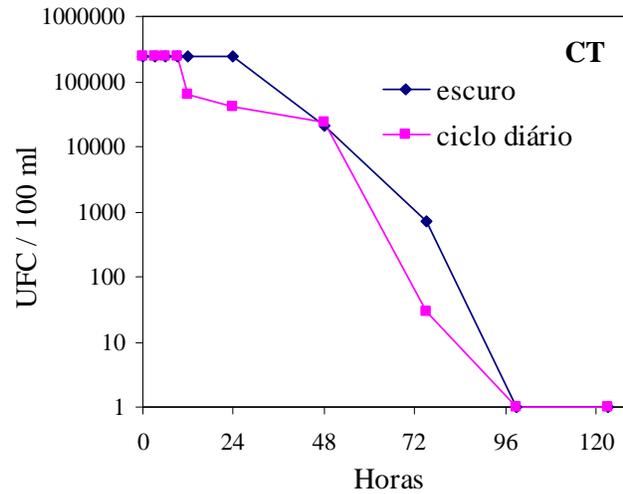
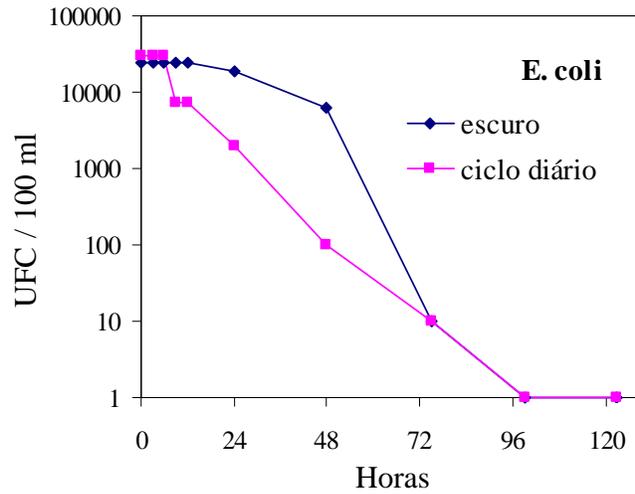


Figura 3.2: Evolução temporal das populações dos indicadores em resposta aos diferentes regimes de radiação solar. Os valores apresentados correspondem à média dos valores dos três microcosmos de cada situação específica dentro de cada simulação.

**Ensaio 2:** Ensaaios com diferentes regimes de salinidade

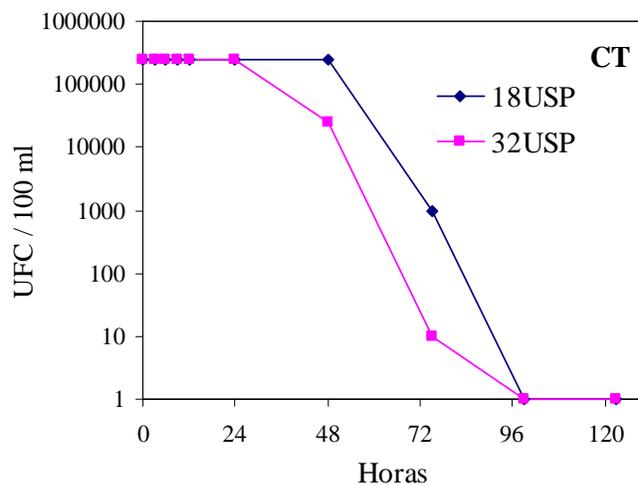
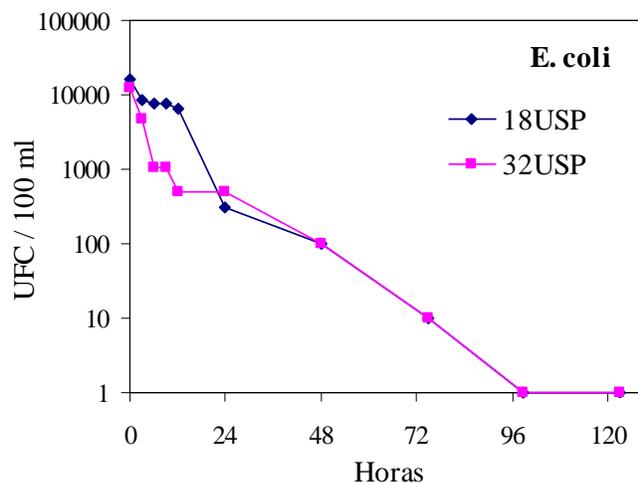


Figura 3.3: Evolução temporal das populações dos indicadores em resposta aos diferentes regimes de salinidade. Os valores apresentados correspondem à média dos valores dos três microcosmos de cada situação específica dentro de cada simulação.

### Ensaio 3: Ensaio com diferentes regimes de temperatura

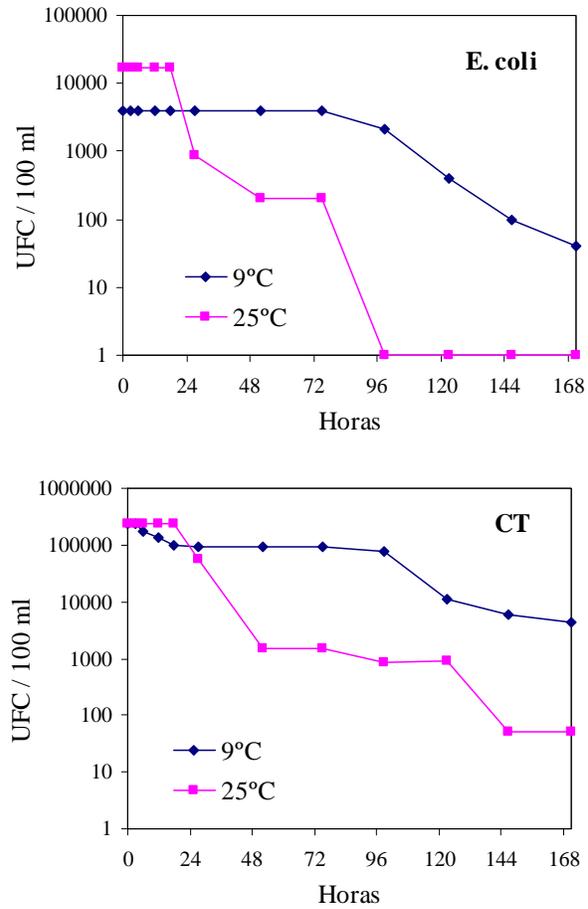


Figura 3.4: Evolução temporal das populações dos indicadores em resposta aos diferentes regimes de temperatura. Os valores apresentados correspondem à média dos valores dos três microcosmos de cada situação específica dentro de cada simulação.

de descarga de efluentes com contaminação fecal num meio receptor. Assim, a descarga sub superficial de uma pluma de emissário pode contribuir para uma redução substancial dos efeitos da luz e das temperaturas baixas, aumentando os valores de T90 em várias dezenas de horas [22].

Os resultados obtidos nos ensaios apontam para o facto de os dois indicadores testados apresentarem respostas semelhantes aos parâmetros ambientais estudados, podendo assim fornecer uma informação similar como indicadores de contaminação fecal em águas naturais. Este tipo de resultado encontra-se descrito também em relação à utilização de *E. coli* e de CF para o mesmo tipo de condições experimentais [23, 24].

Na bibliografia são igualmente referidos valores muito distintos de T90 entre ensaios realizados com bactérias indicadoras sob regime de exposição a radiação solar durante o período de Inverno e o período de Verão, variando os coeficientes de inactivação consoante a estação do ano. Porém, neste trabalho apenas se verificou a influência da ausência total de radiação e de uma exposição a radiação intensa, característica dos meses de Verão. Para meses de Inverno, os resultados sugerem uma mortalidade mais baixa destas bactérias como resultado de níveis mais baixos de radiação, típicos desta época do ano.

A mortalidade mais elevada em microcosmos de salinidade elevada expostos ao mesmo regime de radiação que microcosmos de baixa salinidade foi já observada noutros estudos [23]. A análise das curvas de sobrevivência (figuras 3.5 a 3.7) reflecte claramente um aumento do efeito da pressão osmótica em microcosmos expostos ao mesmo regime de radiação. Pode-se concluir que um meio receptor de salinidade elevada induzirá uma maior mortalidade destes indicadores. Uma vez que a *E. coli* apresenta um T90 significativamente inferior ao dos CT nestes regimes, poderá ser um indicador menos fiável de contaminação fecal em ambientes marinhos.

A diferença entre as %S obtidas para CT e para *E. coli* sob o mesmo regime de radiação solar poderá ser explicada pela susceptibilidade intrínseca de cada tipo de microrganismo indicador aos diferentes comprimentos de radiação solar e regime de salinidade. Este facto foi já demonstrado em estudos de sobrevivência [23] realizados com *E. coli* em água doce mantida no escuro, e que revelaram valores de T90 na ordem das 100 horas.

O impacto da temperatura na mortalidade também foi verificado de uma

**Ensaio 1:** Ensaios com diferentes regimes de radiação

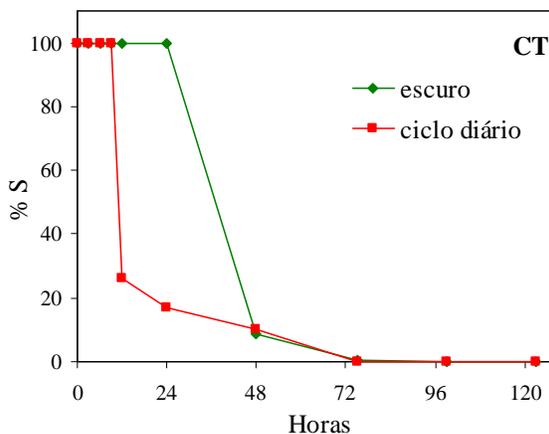
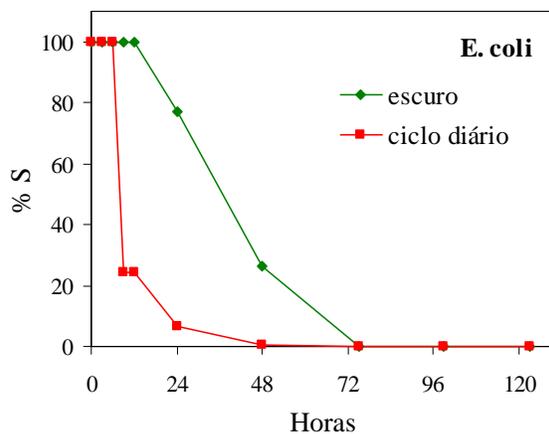


Figura 3.5: Evolução temporal da percentagem de sobrevivência das populações dos indicadores em resposta aos diferentes parâmetros ambientais considerados nos ensaios.

## Ensaio 2: Ensaio com diferentes regimes de salinidade

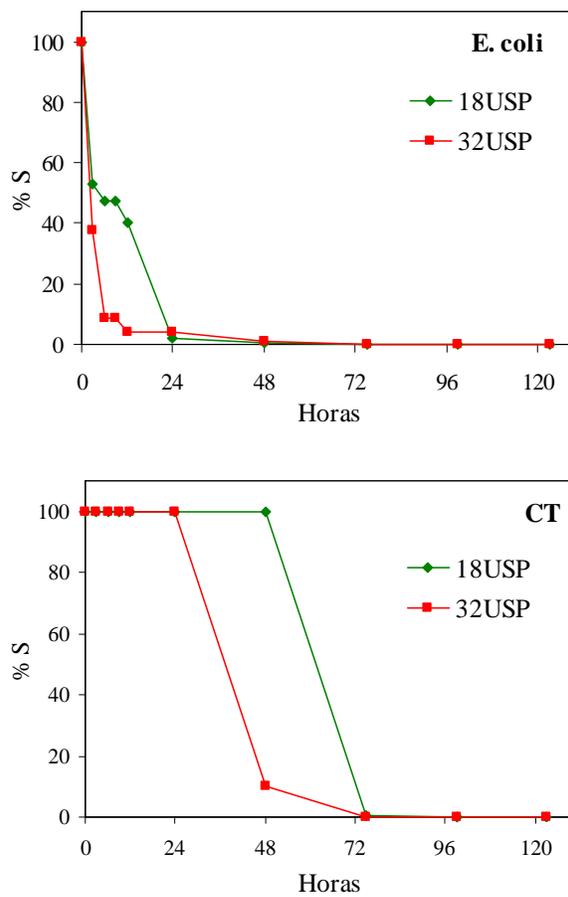


Figura 3.6: Evolução temporal da percentagem de sobrevivência das populações dos indicadores em resposta aos diferentes parâmetros ambientais considerados nos ensaios.

**Ensaio 3:** Ensaios com diferentes regimes de temperatura

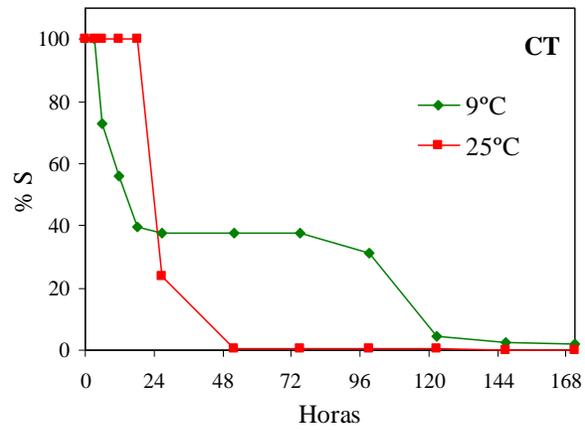
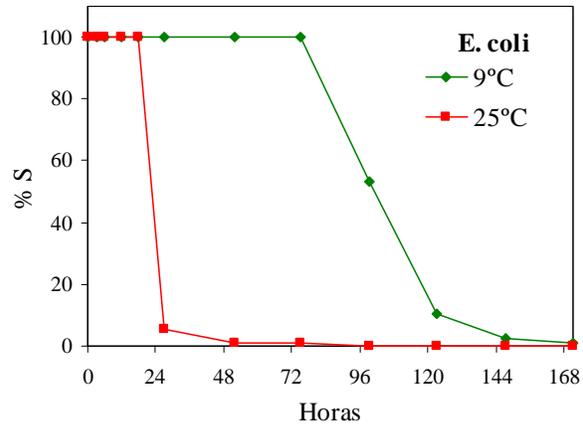


Figura 3.7: Evolução temporal da percentagem de sobrevivência das populações dos indicadores em resposta aos diferentes parâmetros ambientais considerados nos ensaios.

forma clara nos ensaios realizados. No estudo deste efeito há a salientar o facto de ambos os indicadores ainda apresentarem concentrações elevadas ao fim de 160 horas de ensaio nos testes em temperaturas baixas. Desta forma fica patente o efeito que temperaturas elevadas da água têm na mortalidade e a capacidade que estes organismos têm de resistir em águas frias, possivelmente devido à sua capacidade de latência. Este efeito determinante da temperatura tem sido referido em outros estudos (p.e., [25, 26]). O efeito da temperatura pode, no entanto, ser insignificante durante períodos de luz [27], mas tem sido observado que as taxas de mortalidade dos coliformes no escuro estão relacionadas com este parâmetro ambiental, revelando a sua importância nestes regimes [8].

O prolongado tempo de viabilidade observado em alguns testes, ainda que em alguns casos com concentrações relativamente baixas, resultam da capacidade destes microorganismos se adaptarem a ambientes hostis. O ambiente existente nos hospedeiros dos microorganismos indicadores fornece as condições de temperatura e de disponibilidade de nutrientes para o seu crescimento [28]. O stress induzido pela exposição a condições ambientais adversas induz estas bactérias a um estado “viável mas não cultivável”, geralmente apontado como uma “estratégia” de sobrevivência.

Este comportamento poderá também contribuir para uma resistência acrescida ao efeito das condições ambientais durante as primeiras horas do ensaio. Como se pode observar nas curvas de decaimento dos indicadores, a concentração dos mesmos tende a manter-se constante durante as primeiras horas de ensaio. Este padrão recorrente nos resultados pode igualmente indicar alguma limitação no método de quantificação que poderá estar a subestimar a concentração inicial de indicadores.

Esta capacidade de sobrevivência tem como consequência imediata a incapacidade de enumeração dos microorganismos pelas habituais metodologias de cultivo. Deste modo, a realização de ensaios como os descritos neste relatório, recorrendo à utilização em simultâneo de metodologias de enumeração que permitam detectar a fracção não cultivável de bactérias nos ensaios efectuados, representa um avanço no sentido de esclarecer verdadeiramente quais os tempos de permanência reais de microrganismos indicadores no meio ambiente. As metodologias de cultivo podem ser, neste sentido, incapazes de determinar o verdadeiro tempo de duração dos indicadores em ambientes aquáticos. Do ponto de vista da saúde pública, tal incapacidade pode revelar

ser limitada no que refere à determinação de risco. Isto porque as bactérias, ainda que num estado latente, têm a capacidade de ser activas quando encontram as condições certas (como por exemplo quando ingeridas por humanos e expostas ao tracto gástrico).

### 3.3 Comparação com os resultados dos modelos

De um ponto de vista geral, os modelos utilizados conseguem reproduzir o impacto dos parâmetros ambientais considerados no decaimento das populações de indicadores microbiológicos de contaminação fecal na água. Nas figuras 3.8 a 3.13 estão representadas as curvas de mortalidade obtidas nos vários ensaios contra os resultados obtidos pelos dois modelos considerados, tendo em conta as condições ambientais de forçamento referentes a cada simulação.

Existe um padrão nos resultados obtidos pela aplicação dos modelos que tem de ser assinalado. Nas simulações em que a radiação solar foi nula ou próxima de zero, a linha de mortalidade é representada por uma recta com um decréscimo constante no tempo. Isto acontece porque apenas a salinidade e temperatura estão a contribuir para a taxa de mortalidade dos organismos estudados. Como estes parâmetros são relativamente constantes ao longo dos ensaios, o decaimento é também constante. Nos testes que estiveram sujeitos ao ciclo diário de luz, o resultado dos modelos é uma linha ondulante, na qual a taxa de mortalidade não é constante no tempo. Esta alternância de períodos com um decréscimo mais acentuado nas populações com períodos em que a mortalidade é mais baixa reflecte o impacto do ciclo da radiação solar. Durante o dia a radiação induz uma mortalidade maior, o que explica o decréscimo acentuado, ao passo que na ausência de luz durante a noite o decréscimo é menos acentuado, sendo induzido apenas pela salinidade e temperatura.

Um dos pressupostos dos modelos numéricos utilizados (e de grande parte dos modelos de uma forma geral) é a incapacidade dos indicadores biológicos de contaminação fecal se reproduzirem no meio receptor. Apesar de em condições especiais tal processo poder ocorrer fora do hospedeiro (por exemplo quando existem elevadas cargas orgânicas, durante períodos de escuridão, etc.), não foram considerados os valores que indicavam um aumento da concentração de algum indicador no decorrer do ensaio. Estes valores

### Ensaio 1: Regime de escuridão

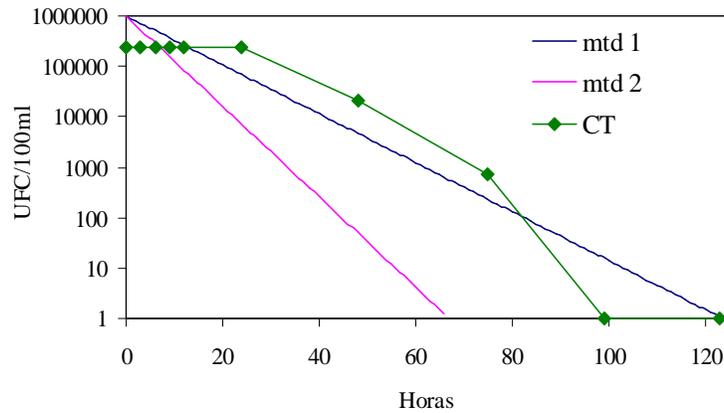
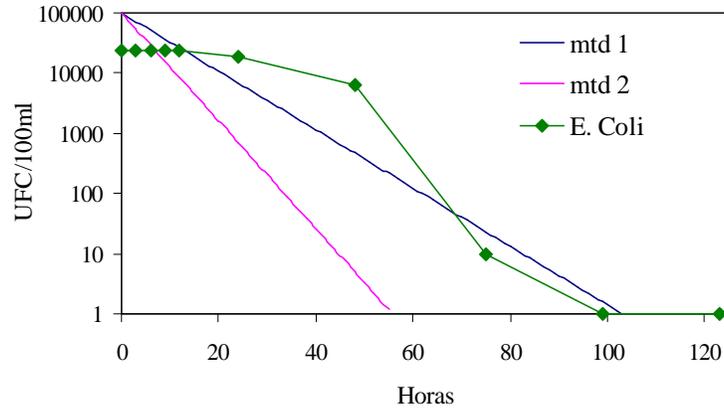


Figura 3.8: Comparação dos resultados experimentais do ensaio 1 (regime de escuridão) com os resultados dos modelos. As designações "mtd 1" e "mtd 2" dizem respeito aos modelos de Chapra [18] e Canteras et al. [9], respectivamente.

### Ensaio 1: Exposição ao ciclo diário de luz

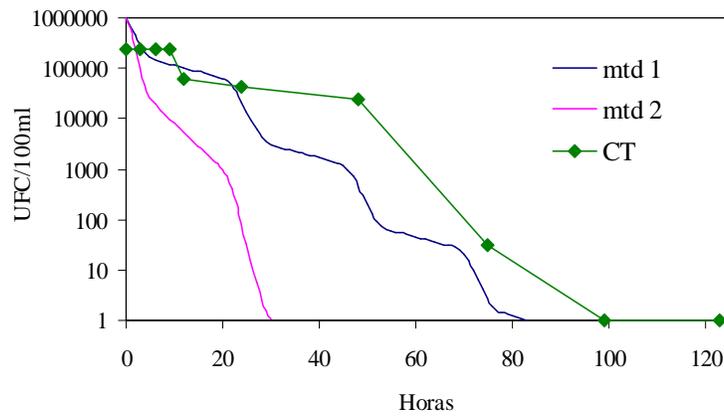
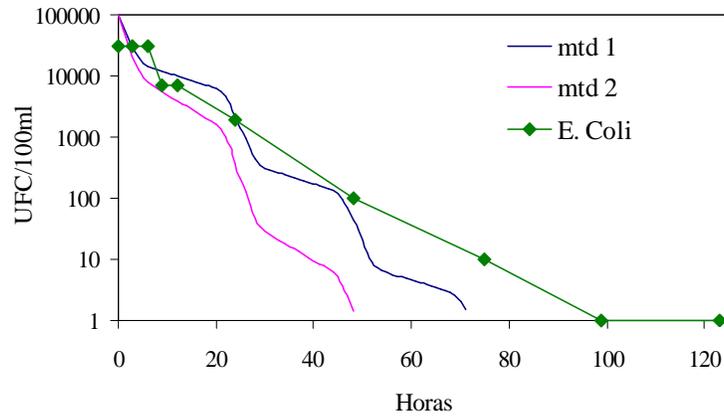


Figura 3.9: Comparação dos resultados experimentais do ensaio 1 (ciclo diário de luz) com os resultados dos modelos. As designações "mtd 1" e "mtd 2" dizem respeito aos modelos de Chapra [18] e Canteras et al. [9], respectivamente.

### Ensaio 2: Regime de salinidade 18 UPS

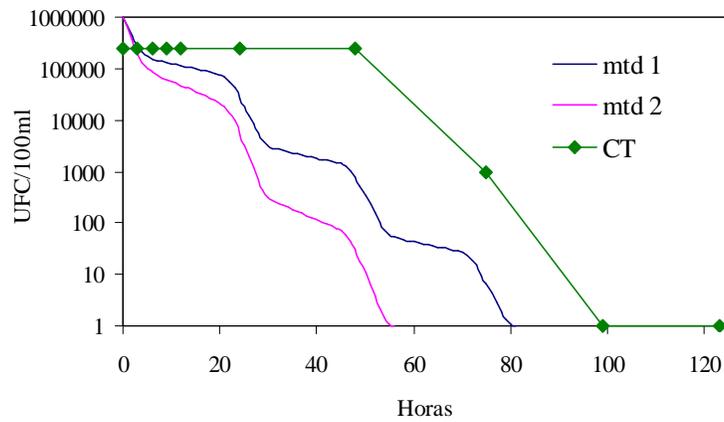
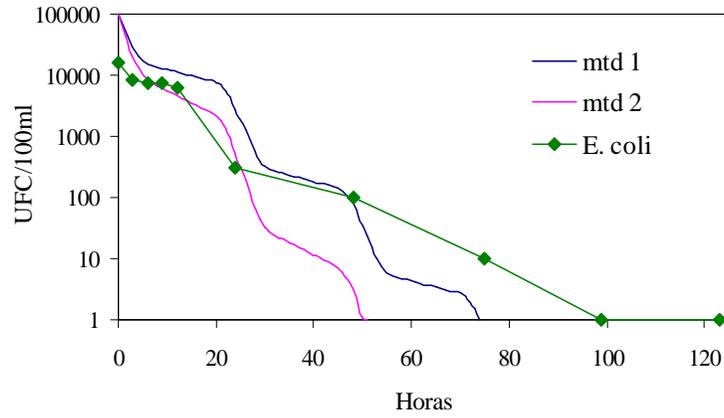


Figura 3.10: Comparação dos resultados experimentais do ensaio 2 (18 UPS) com os resultados dos modelos. As designações "mtd 1" e "mtd 2" dizem respeito aos modelos de Chapra[18] e Canteras et al.[9], respectivamente.

### Ensaio 2: Regime de salinidade 32 UPS

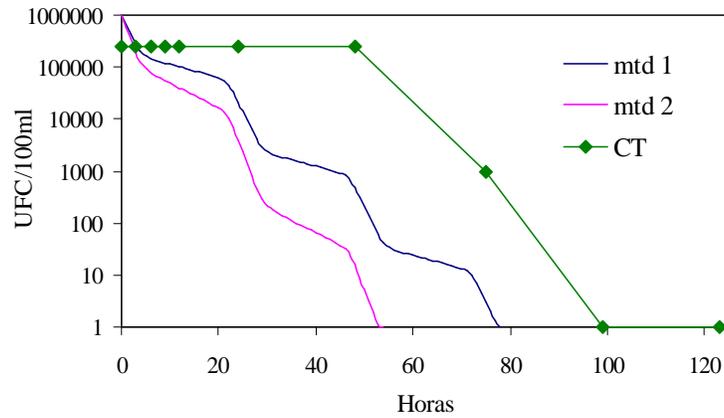
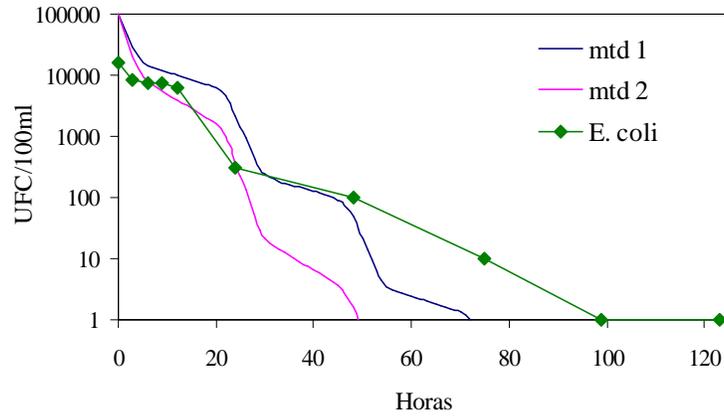


Figura 3.11: Comparação dos resultados experimentais do ensaio 2 (32 UPS) com os resultados dos modelos. As designações "mtd 1" e "mtd 2" dizem respeito aos modelos de Chapra[18] e Canteras et al.[9], respectivamente.

**Ensaio 3:** Regime de temperatura  $9^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$

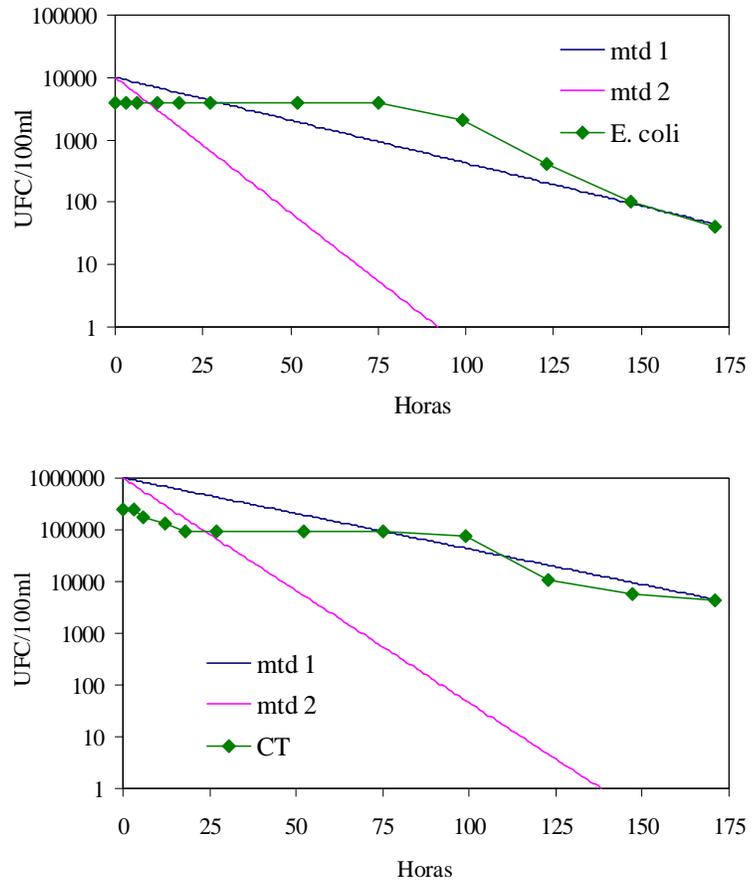


Figura 3.12: Comparação dos resultados experimentais do ensaio 3 com os resultados dos modelos. As designações "mtd 1" e "mtd 2" dizem respeito aos modelos de Chapra[18] e Canteras et al.[9], respectivamente.

**Ensaio 3:** Regime de temperatura  $25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$

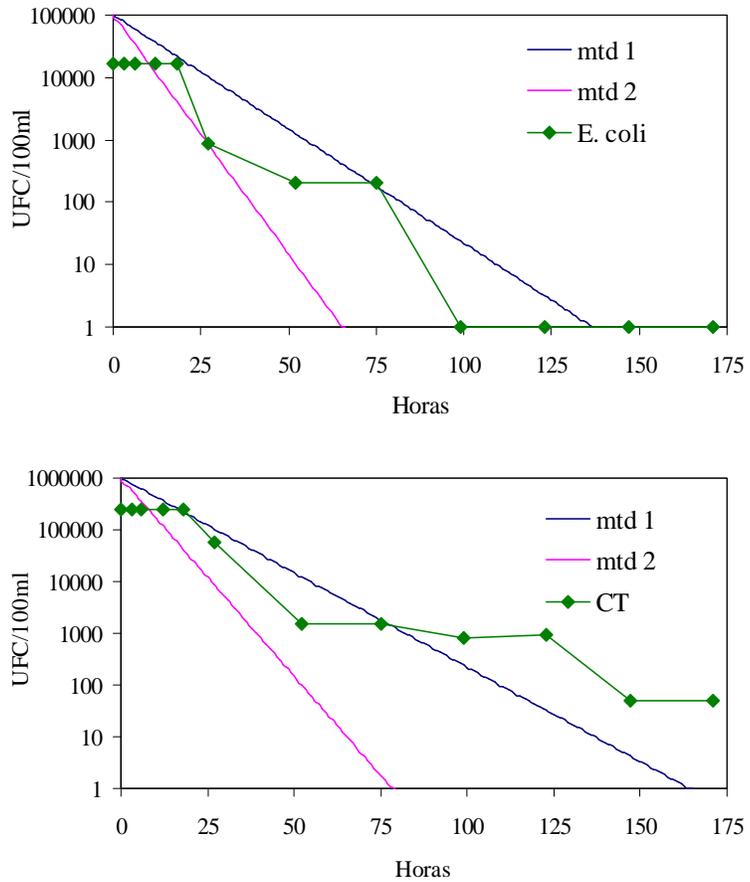


Figura 3.13: Comparação dos resultados experimentais do ensaio 3 com os resultados dos modelos. As designações "mtd 1" e "mtd 2" dizem respeito aos modelos de Chapra[18] e Canteras et al.[9], respectivamente.

reflectem provavelmente um erro experimental ou algum problema associado com o método utilizado na enumeração da concentração de indicadores, e não necessariamente um crescimento efectivo das populações. Há ainda a considerar o facto do método de quantificação dos indicadores biológicos ter a capacidade de determinar os organismos que estão em estado latente, comportamento que o modelo não considera.

No entanto, um dos motivos que poderá ter contribuído para uma taxa de mortalidade relativamente baixa em alguns testes é a possibilidade de reprodução dos indicadores. Em alguns casos esta poderá ter ajudado a manter um equilíbrio da população balanceando a taxa de mortalidade, explicando assim parte da discrepância verificada entre as observações e os resultados estimados pelos modelos em alguns casos. Convém ainda ter em conta a capacidade de comprimentos de onda mais elevados que a radiação UV poderem induzir a reparação de maior parte do ADN danificado após períodos de exposição das células à radiação UV prejudicial. Este processo, conhecido como foto-reactivação, ocorre principalmente em comprimentos de onda entre os 300 e os 500nm, dependendo de cada organismo o comprimento de onda mais efectivo. Este processo de reparação das bactérias inactivas como consequência da exposição a radiação UV pode também acontecer em períodos de escuridão. Todos estes factores poderão explicar os longos períodos de viabilidade observados em alguns ensaios.

Devido a estes condicionamentos do modelo (i.e., não considerar o crescimento da população ou fazer distinção entre estado cultivável e não cultivável), optou-se por considerar a concentração inicial nos modelos superior à concentração medida nos ensaios. A resposta inicial dos indicadores ao meio mascara de certo modo o efeito letal dos parâmetros ambientais. Dessa forma, só faz sentido comparar os resultados do modelo com os resultados dos ensaios após este período inicial. Extrapolar os valores iniciais dos indicadores tornou possível, em maior parte dos casos, aproximar a curvas de decaimento do modelo com as curvas de decaimento dos ensaios após o período de adaptação inicial. Este procedimento permitiu uma comparação mais correcta entre os resultados do modelo e dos ensaios. Em aplicações a casos reais com modelos de transporte, a incapacidade do modelo de decaimento reproduzir este comportamento é minimizada, uma vez que na fase inicial da descarga de águas contaminadas no meio receptor a maior contribuição na diminuição da concentração de indicadores é dada por processos físicos (diluição e dispersão).

Outro motivo que poderá justificar a magnitude dos valores observados nos testes é o método de quantificação da concentração dos indicadores nas amostras. O método utilizado neste estudo não apresenta a mesma exactidão de outros métodos como o método das membranas filtrantes ou da fermentação em múltiplos tubos. No entanto, o elevado volume de amostras a realizar nestes ensaios levou à eleição do método utilizado neste estudo por ser o mais prático e indicado para este tipo de ensaios. Mas como foi já referido, este método apresenta a vantagem de determinar a presença de indicadores, mesmo quando estes estão em estado latente.

Ao contrário de ensaios realizados *in situ* com sacos de diálise ou frascos de polietileno suspensos a uma determinada profundidade na coluna de água, nos ensaios realizados em condições controladas o ambiente de luz no volume de água não é considerado. Implica isto que, uma vez que os microcosmos apresentam um volume de água relativamente pequeno, torna-se impossível quantificar a radiação no corpo de água, sendo antes medida a radiação ambiente no local onde os ensaios são montados (procedimento executado neste estudo). Assim, a radiação solar a que os organismos são expostos é sobrestimada. Deste modo acabam por ser utilizados valores de radiação nos modelos numéricos superiores aos quais os ensaios estiveram efectivamente expostos. A comparação dos resultados dos modelos e dos ensaios sugere este tipo de cenário uma vez que nos casos em que a radiação solar é baixa (ensaio 3, figuras 3.12 e 3.13) ou nula (ensaio 1 no escuro, figura 3.8) os valores obtidos pelo modelo aproximam-se dos resultados dos testes.

Como foi mencionado, o modelo rotulado de método 2 (Canteras et al.[9]) foi derivado de testes *in situ* e laboratoriais realizados para determinar o efeito de parâmetros ambientais em populações de *E. coli*. Será portanto de esperar uma discrepância com os resultados do teste actual uma vez que este foi realizado unicamente sob condições artificiais controladas. O outro modelo utilizado corresponde por sua vez a um modelo genérico de decaimento derivado a partir de medições em ensaios controlados. Os modelos obtidos a partir de ensaios (*in situ* ou em laboratório) dizem respeito a respostas de indicadores biológicos a stress ambiental. Estes ensaios são realizados para a *E. coli* grande parte das vezes. Isto justifica o facto dos modelos se aproximarem mais das curvas de decaimento da *E. coli* do que da curva dos CT.

Apesar das diferenças verificadas entre o resultado dos modelos, ambos

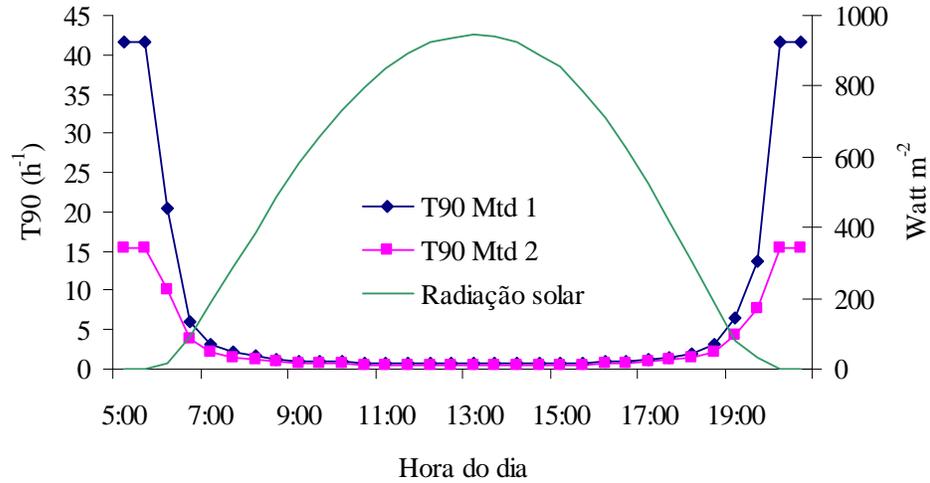


Figura 3.14: Comparação dos resultados dos dois modelos sujeitos às mesmas condições ambientais. A variação da radiação solar é mostrada para ilustrar a sua contribuição determinante nos valores de T90 calculados. As designações "mtd 1" e "mtd 2" dizem respeito aos modelos de Chapra[18] e Canteras et al.[9], respectivamente.

conseguem estimar o impacto dos factores ambientais, com especial relevância para a radiação solar. Na figura 3.14 é possível verificar o comportamento de cada modelo para o mesmo forçamento ambiental e concentração inicial de indicador. De uma forma geral, a diferença entre as estimativas dos modelos diferem durante o período sem luz, onde a mortalidade induzida pela salinidade e temperatura é mais elevada num dos modelos. É notório na imagem a discrepância nos valores de T90 verificados entre o período de luz e escuro do dia.

---

## 4. Relevância dos modelos utilizados

---

Pela análise da comparação dos resultados dos modelos com os resultados dos testes pode-se concluir que os modelos simulam com sucesso o efeito da salinidade e temperatura em ambientes com baixa radiação. No que respeita à radiação solar, o modelo reflecte o impacto na mortalidade deste parâmetro mas aparentemente sobrestima a sua influência. Esta ocorrência implica uma necessidade de uma resolução temporal maior nos dados de radiação utilizados para forçar os modelos.

Dependendo das condições em que se realizam os estudos de mortalidade, qualquer modelo utilizado pode apresentar discrepâncias entre os resultados que produz e as medições obtidas pelos métodos experimentais. Esta discrepância, no entanto, deve ser compreendida no âmbito de estudo e no enquadramento do mesmo. Quer isto dizer que dificilmente se poderão tirar conclusões quantitativas baseadas no resultado da aplicação de modelos em cenários tão simplificados como aqui apresentado. A extrapolação destes resultados para cenário reais deve ser feita lembrando todos os outros factores envolvidos na mortalidade dos indicadores e na sua dispersão no meio receptor.

Apesar de já se ter conhecimento há várias décadas da influência dos parâmetros ambientais na mortalidade dos indicadores fecais fora do seu meio natural (expressa nos valores de T90), o desenvolvimento de modelos numéricos para simular este efeito é relativamente recente. Mas ainda assim é já assumida a capacidade destes modelos produzirem melhores resultados quando comparados com as usuais estimativas de valores de T90 fixos nos estudos de modelação. Muitos estudos têm sido realizados assumido um valor fixo de T90 para os indicadores fecais, utilizando frequentemente valores retirados da bibliografia. Mas os próprios valores encontrados variam por vezes consideravelmente, consoante as condições climatéricas, de turbulência da água, da quantidade de matéria em suspensão, etc.

Contrariamente ao recurso de uma taxa fixa de mortalidade expressa num T90 estático, a utilização de uma formulação que permite ter um T90

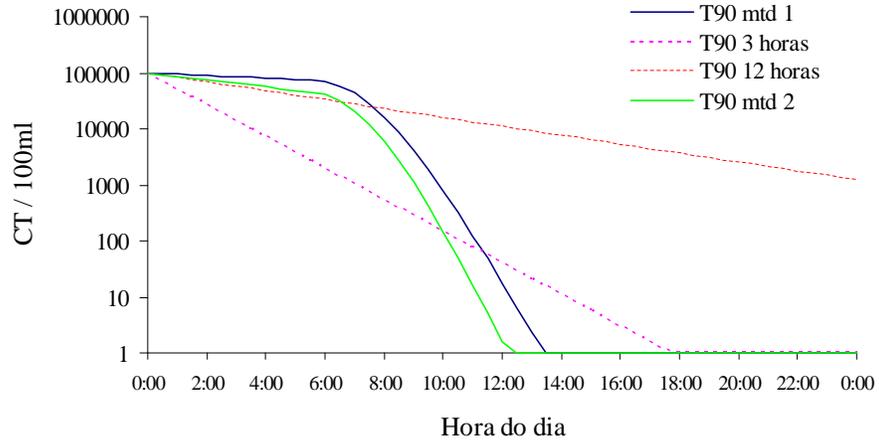


Figura 4.1: Simulação esquemática do decaimento de um indicador fecal utilizando valores fixos de T90 e valores calculados pelos modelos. Condições simplificadas para uma emissão pontual, e para valores constantes de temperatura e salinidade. A radiação solar utilizada reflecte um ciclo diário de luz com valores típicos de verão. As designações "mtd 1" e "mtd 2" dizem respeito aos modelos de Chapra[18] e Canteras et al.[9], respectivamente.

dinâmico como função de parâmetros ambientais permite determinar de uma forma mais precisa o impacto destes factores na remoção da contaminação fecal na água, e em especial do efeito da luz. Apesar de valores estáticos de T90 poderem fornecer alguma informação no impacto potencial da contaminação na qualidade da água circundante ao ponto de despejo, quando se simulam cenários com períodos superiores a 24 horas, estas estimativas apenas tornam-se grosseiras devido à grande variabilidade das taxas de mortalidade num ciclo diário [7]. Em períodos de escuridão tem sido observados valores de T90 entre 70 a 80 vezes superiores a valores observados em períodos de luz [8]. Esta diferença encontra-se ilustrada na figura 4.1, onde se observa a evolução da concentração de um indicador fecal no tempo com uma taxa de mortalidade fixa (T90 de 3 e 12 horas) e com uma taxa de mortalidade em função de parâmetros ambientais estimada pelos dois modelos apresentados neste estudo.

O desenvolvimento recente nas ferramentas de modelação tem conseguido de uma forma eficiente juntar modelos hidrodinâmicos com estes modelos de

decaimento das bactérias para uma melhor estimativa do impacto que o despejo (inadvertido ou intencional) de efluentes contaminados podem ter no meio receptor [13]. No caso do sistema *MOHID*, esta ferramenta foi já utilizada com sucesso em várias ocasiões na Costa do Estoril para determinar o impacto de descargas em alguns locais na qualidade da água das praias vizinhas.

Para além da capacidade de simular a influência dos processos físicos como a dispersão e diluição na concentração de indicadores de contaminação fecal no meio receptor, o sistema *MOHID* fica assim apto a estimar a taxa de remoção destes indicadores da água em função das condições ambientais do meio receptor. Em grande parte dos casos, os processos físicos de dispersão e mistura, que serão tanto mais relevantes quanto maior for o hidrodinamismo do meio receptor, determinam os valores de concentrações que irão ser medidos nos locais de recolha para análise da qualidade da água nas praias. Ao longo de toda a costa do Estoril estes processos físicos têm uma importância fundamental devido às condições hidrodinâmicas típicas desta zona. No entanto, devido às particularidades geométricas desta linha de costa, em algumas fases da maré verificam-se processos de recirculação que aumentam o tempo de residência da água junto às praias, diminuindo por conseguinte a dispersão e mistura dos efluentes no meio receptor. Este processo é particularmente relevante na praia da Torre, onde o regime de circulação próximo da costa consiste basicamente numa recirculação contínua, que tende a evitar que a água ao largo atinja a costa aumentando consideravelmente o tempo de residência dentro da baía. Nestes casos, a remoção de indicadores fecais da água depende consideravelmente da resposta destes organismos às condições ambientais. Assim sendo, o recurso a modelos como aqueles aqui estudados prova ser uma ferramenta útil e fundamental.

Para além de todos os factores físicos de mistura e dispersão que contribuem para uma diminuição da concentração de indicadores fecais no meio receptor, existem ainda outros factores que contribuem para este decréscimo. A predação e a adsorção a partículas seguida da sua sedimentação contribuem igualmente para remover estes organismos da coluna de água. Actualmente o esforço de modelação destes processos está ainda numa fase inicial e, por conseguinte, ainda não foi adoptado no sistema *MOHID*.

---

## 5. Conclusões

---

Os ensaios efectuados para estimar a contribuição da salinidade, temperatura e radiação solar na mortalidade de indicadores de contaminação fecal nas águas revelou um padrão de resposta a estes factores ambientais semelhante ao que é frequentemente descrito em trabalhos científicos publicados. A comparação dos resultados dos testes de mortalidade com os resultados de modelos de mortalidade destes indicadores utilizados no sistema *MOHID* mostrou que os modelos têm a capacidade de simular de uma forma coerente o impacto dos parâmetros estudados na mortalidade bacteriana. Esta capacidade é, no entanto, mais evidente no caso do efeito da temperatura e salinidade, e não tão clara para o caso da radiação solar. Ainda que os modelos simulem de uma forma correcta a contribuição fundamental deste parâmetro na mortalidade, poderão sobrestimar as taxas de remoção bacteriana induzidas pela radiação.

A redução da carga de contaminantes fecais na água deve-se à combinação de três factores principais: diluição inicial, dispersão e mortalidade bacteriana. No âmbito deste estudo, uma das principais conclusões a tirar consiste no facto dos modelos aqui abordados conseguirem de uma forma satisfatória simular o último destes factores. Ao equipar o sistema de modelação *MOHID* com esta capacidade, obtém-se uma ferramenta numérica capaz de ter em consideração os três factores.

O recurso a modelos para estimar a mortalidade dos indicadores de contaminação fecal no meio receptor em função de parâmetros ambientais é já uma prática disseminada. Este método tem vindo a substituir a utilização de valores fixos de T90 para estes organismos por reflectir de um modo mais adequado a mortalidade destas bactérias. As ferramentas de modelação numérica para estimar a dispersão e influência da pluma de descargas pontuais ou difusas na qualidade da água conseguem, actualmente, acoplar modelos hidrodinâmicos de transporte com modelos de decaimento dos indicadores de contaminação. Poucas destas ferramentas, no entanto, tem a capacidade do sistema de modelação *MOHID* de utilizar modelos hidrodinâmicos de dispersão de partículas lagrangianas para simular os indicadores fecais na água,

variando a concentração destas partículas em função de parâmetros ambientais de acordo com os modelos aqui apresentados. Ao contrário da maioria dos modelos com as mesmas características, o *MOHID* utiliza traçadores lagrangianos para determinar a evolução da pluma de contaminantes no espaço e no tempo, determinada pelo regime da maré e circulação local, assim como a concentração de indicadores fecais influenciada pelos vários factores ambientais. Neste sentido, o sistema *MOHID* reflecte o estado-da-arte das ferramentas numéricas de estudo do impacto na qualidade da água de fontes de contaminação fecal.

Associados com a modelação das características hidrodinâmicas do meio receptor, os modelos numéricos abordados neste estudo fornecem uma ferramenta poderosa na determinação do impacto de fontes pontuais e difusas na qualidade da água. Assim, o acoplamento de modelos numéricos (de transporte e qualidade da água) parece ser uma metodologia fundamental no estudo de cenários de contaminação, na tomada de decisões e até mesmo na detecção de potenciais fontes de contaminação.

---

## 6. Referências bibliográficas

---

1. Noutsopoulos C, Gavalaki E, Andreadakis A (1999). Evaluation of the impact from the discharge of treated sewage on the south-east Saronicos Gulf through mathematical water quality modelling. *Water Science and Technology* 39(8):63-70.
2. Dumontet S, Scopa A, Kerje S, Krovacek K (2001). The importance of pathogenic organisms in sewage and sewage sludge. *Journal of the Air & Waste Management Association* 51(6):848-860.
3. Fujioka RS, Yoneyama BS (2002). Sunlight inactivation of human enteric viruses and fecal bacteria. *Water Science and Technology* 46(11-12):291-295.
4. Johnson DC, Enriquez CE, Pepper IL, Davis TL, Gerba CP, Rose JB (1997). Survival of Giardia, Cryptosporidium, poliovirus and Salmonella in marine waters. *Water Science and Technology* 35(11-12):261-268.
5. Newman PJ, Nixon SC, Rees YJ (1994). Surface-Water Quality Monitoring, Classification, Biological Assessment and Standards. *Water Science and Technology* 30(10):1-10.
6. Serrano E, Moreno B, Solaun M, Aurrekoetxea JJ, Ibarluzea J (1998). The influence of environmental factors on microbiological indicators of coastal water pollution. *Water Science and Technology* 38(12):195-199.
7. Pereira MG, Alcantara F (1993). Culturability of Escherichia-Coli and Streptococcus-Faecalis in Batch Culture and in-Situ in Estuarine Water (Portugal). *Water Research* 27(8):1351-1360.
8. Sarikaya HZ, Saatci AM (1995). Bacterial Die-Away Rates in Red-Sea Waters. *Water Science and Technology* 32(2):45-52.
9. Canteras JC, Juanes JA, Perez L, Koev KN (1995). Modeling the Coliforms Inactivation Rates in the Cantabrian-Sea (Bay-of-Biscay) from in-Situ and Laboratory Determinations of T-90. *Water Science and Technology* 32(2):37-44.
10. James ID (2002). Modelling pollution dispersion, the ecosystem and water quality in coastal waters: a review. *Environmental Modelling & Software*

17(4):363-385.

11. Brissaud F, Lazarova V, Ducoup C, Joseph C, Levine B, Tournoud MG (2000). Hydrodynamic behaviour and faecal coliform removal in a maturation pond. *Water Science and Technology* 42(10-11):119-126.
12. Bach HK, Orhon D, Jensen OK, Hansen IS (1995). Environmental-Model Studies for the Istanbul Master-Plan .2. Water-Quality and Eutrophication. *Water Science and Technology* 32(2):149-158.
13. Christodoulou GC, Ioakeim I, Ioannou K (1995). Modeling of pollution from the wastewater discharge of the city of Limassol. *Water Science and Technology* 32(9-10):197-204.
14. Garvey E, Tobiason JE, Hayes M, Wolfram E, Reckhow DA, Male JW (1998). Coliform transport in a pristine reservoir: Modeling and field studies. *Water Science and Technology* 37(2):137-144.
15. Salih FM (2003). Formulation of a mathematical model to predict solar water disinfection. *Water Research* 37(16):3921-3927.
16. Kocasoy G (1995). Waterborne disease incidences in the Mediterranean region as a function of microbial pollution and T-90. *Water Science and Technology* 32(9-10):257-266.
17. APHA (1995). Standard methods for the examination of water and wastewater. 19th edn. American Public Health Association, Washington D.C.
18. Chapra S (1997). Surface water-quality modeling. McGraw-Hill, New York.
19. Guillaud JF, Derrien A, Gourmelon M, Pommepuy M (1997). T90 as a tool for engineers: Interest and limits. *Water Science and Technology* 35(11-12):277-281.
20. Fallowfield HJ, Cromar NJ, Evison LM (1996). Coliform die-off rate constants in a high rate algal pond and the effect of operational and environmental variables. *Water Science and Technology* 34(11):141-147.
21. Evison LM, Tosti E (1981). An Appraisal of Bacterial Indicators of Pollution in Sea-Water. *Water Science and Technology* 13(1):591-599.
22. Pommepuy M, Guillaud JF, Dupray E, Derrien A, Leguyader F, Cormier M (1992). Enteric Bacteria Survival Factors. *Water Science and Technology*

25(12):93-103.

23. Sinton LW, Hall CH, Lynch PA, Davies-Colley RJ (2002). Sunlight inactivation of fecal indicator bacteria and bacteriophages from waste stabilization pond effluent in fresh and saline waters. *Applied and Environmental Microbiology* 68(3):1122-1131.

24. Sinton LW, Finlay RK, Lynch PA (1999). Sunlight inactivation of fecal bacteriophages and bacteria in sewage-polluted seawater. *Applied and Environmental Microbiology* 65(8):3605-3613.

25. Noble RT, Weisberg SB, Leecaster MK, McGee CD, Ritter K, Walker KO, Vainik PM (2003). Comparison of beach bacterial water quality indicator measurement methods. *Environmental Monitoring and Assessment* 81(1-3):301-312.

26. Solic M, Krstulovic N (1992). Separate and Combined Effects of Solar-Radiation, Temperature, Salinity, and Ph on the Survival of Fecal-Coliforms in Seawater. *Marine Pollution Bulletin* 24(8):411-416.

27. Moeller JR, Calkins J (1980). Bactericidal Agents in Waste-Water Lagoons and Lagoon Design. *Journal Water Pollution Control Federation* 52(10):2442-2451.

28. Winfield MD, Groisman EA (2003). Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 69(7):3687-3694.