

Influência de três ETARs na qualidade ecológica da água superficial e no seu conteúdo em bactérias resistentes a antibióticos

Alexandre Gonçalves, Francisco Vilhena e Vicente Guerreiro

12º ano da Escola Secundária de Odemira - Agrupamento de Escolas de Odemira

Ano letivo 2018-2019

Resumo

Estudou-se a influência de três ETARs do concelho de Odemira na ocorrência de bactérias resistentes a antibióticos (BRA) em meio natural. Para tal, sujeitaram-se a diferentes concentrações do antibiótico cloranfenicol as bactérias presentes em amostras de água colhidas a montante e a jusante das ETARs, nas localidades de Amoreiras-Gare, Almogrove e S. Luís. Na ETAR de Amoreiras-Gare há, no geral, maior crescimento bacteriano a jusante do que a montante da ETAR, sugerindo o papel desta ETAR na ocorrência de BRA. Já nas outras duas ETARs os resultados não são tão claros, pelo que se discute a influência de diferentes fatores atuando seletivamente sobre as bactérias nas bacias dessas linhas de água. Também se avaliou a influência das mesmas ETARs na qualidade ecológica dos cursos de água, por amostragem de macroinvertebrados bentónicos a montante e a jusante e aplicação de índices de qualidade baseados na composição dessas comunidades. Esta parte do estudo ainda está a decorrer.

Introdução

As bactérias são seres unicelulares procariontes, que se destacam por ser estruturalmente simples. Reproduzem-se por reprodução assexuada, através de mitoses que, à partida, geram clones da bactéria que se dividiu. Contudo, estes seres originados na mitose podem ter um DNA diferente do progenitor devido a mutações durante o processo da mitose ou ao integrarem DNA adicional ao seu genoma, processo designado por transferência horizontal de genes (Silva, et al., 2016; U.E., s.d; Vidyasagar, 2015).

Antibióticos são substâncias capazes de impedir a multiplicação das bactérias ou de as eliminar, não atuando em vírus ou fungos. Os antibióticos atacam a parede, membrana celular ou outros constituintes das bactérias necessários para a sua sobrevivência. Existem dois tipos de antibiótico: bactericidas, que matam as bactérias, e bacteriostáticos que inibem a sua multiplicação e crescimento. Os antibióticos atacam estruturas ou processos únicos das bactérias sem afetarem significativamente as células humanas. É preciso ter em atenção que no organismo humano ocorrem bactérias nocivas, mas também benéficas, e que os antibióticos afetam ambas (Guilfoile & Alcamo, 2006; Farmácias Portuguesas, s.d.; GSLC, 2014).

O uso indiscriminado e descontrolado de antibióticos contribui para a seleção de bactérias resistentes a vários antibióticos. Esta tendência tem-se agravado nas últimas décadas, sendo cada vez mais frequente o aparecimento de microrganismos

apenas suscetíveis a poucos antibióticos e, como tal, causadores de infeções de difícil tratamento (Nikaido, 2009; CDCP, 2017; Duin & Paterson, 2016).

A resistência surge por exposição continuada das bactérias a um ou mais antibióticos. Dentro de uma comunidade de bactérias existe uma variabilidade intraespecífica devido às mutações que estas sofrem ou ao fenómeno da transferência horizontal de genes. Quando esta comunidade entra em contacto com um antibiótico, este exerce sobre as bactérias uma pressão seletiva, em que apenas as resistentes ao antibiótico sobrevivem. Estas continuam a multiplicar-se até formarem uma estirpe de bactérias resistentes ao antibiótico (Vidyasagar, 2015; Palos, 2017; CDCP, 2017).

Estima-se que todos os anos 33 mil pessoas morram na Europa devido a infeções causadas por bactérias resistentes a antibióticos (doravante designadas BRA). Existem projeções que indicam que se não houver medidas para melhorar este assunto, em 2050 morrerão 390 mil pessoas na Europa e 10 milhões em todo o mundo devido a consequências diretas das resistências a antibióticos (Cardoso, 2018; Fernandes, et al., 2016).

Uma Estação de Tratamento de Águas Residuais (ETAR) tem como objetivo tratar a água utilizada pelas populações (vulgarmente designados esgotos), criando a hipótese de esta ser reutilizada ou devolvida ao meio ambiente em condições ambientalmente seguras.

Uma ETAR integra quatro fases de tratamento:

1. Tratamento Preliminar - As águas residuais são filtradas e separados os resíduos de maior dimensão.
2. Tratamento Primário - As águas residuais passam pela decantação primária, onde as partículas sólidas em suspensão são eliminadas por ação da gravidade.
3. Tratamento Secundário - As águas residuais sofrem um tratamento biológico, com bactérias que digerem a matéria orgânica existente. Seguem para decantação, o que permite o depósito das lamas resultantes da ação das bactérias.
4. Tratamento Terciário - Nesta etapa do tratamento, as águas residuais são submetidas a uma desinfecção e remoção de nutrientes. Removem-se as bactérias, os sólidos em suspensão, os nutrientes em excesso e os compostos tóxicos específicos.
5. Descarga Final da Água - Finalmente, a água é devolvida à natureza em condições ambientalmente seguras. A água resultante pode ser usada na agricultura, na rega de campos de golfe e outros espaços verdes, na lavagem de pavimentos e ruas, entre outras utilizações possíveis (Águas Públicas do Alentejo, s.d).

As opções de desinfecção aplicadas no Tratamento Terciário, principalmente quando se pretende a reutilização das águas residuais, são: cloragem; desinfecção por ozono; e desinfecção por radiação ultravioleta (U.V.).

A cloragem é o sistema de desinfecção mais vulgar e mais económico. É muito eficaz no controlo das bactérias, mas bastante ineficaz na eliminação de vírus, e os resíduos da cloragem permanecem na corrente filtrada com graves inconvenientes ambientais e de saúde pública.

A desinfecção por ozono é mais dispendiosa que a cloragem e apresenta desvantagens semelhantes. O ozono não se mantém muito tempo na água, no entanto, no processo formam-se subprodutos contaminantes que se mantêm na água tratada.

O sistema de desinfecção por radiação U.V., igualmente mais dispendioso que a cloragem, é uma tecnologia mais recente e que oferece maiores garantias em relação às outras desinfecções, tanto no que toca à destruição de vírus e bactérias como na ausência de subprodutos do processo, apresentando-se a solução mais adequada para um

tratamento terciário (d'Azevedo, 2009; Luizi, 2012). (d'Azevedo, 2009; Luizi, 2012)

As ETARs juntam BRA, resíduos de antibióticos e outros potenciais fatores que podem funcionar como agentes seletivos destas bactérias, para além de oferecerem uma fonte rica de nutrientes e interações entre todas as células, capazes de facilitar a transferência horizontal de genes (Manaia, et al., 2018).

Quando a desinfecção é aplicada, uma fração de células morre, incluindo BRA, enquanto outras entram ilesas num estado de dormência devido ao stresse. Recuperam desse estado quando os fatores de stresse deixam de as afetar, o que acontece na natureza, por exemplo devido à diluição do efluente final no corpo de água receptor (Becerra-Castro, Macedo, Silva, Manaia, & Nunes, 2016; Sousa, et al., 2017).

Assim, os efluentes finais das ETARs carregam grandes quantidades de bactérias com genes potencialmente resistentes a antibióticos (de origem humana e animal), sendo potenciais disseminadoras destes genes no meio ambiente (Manaia, 2017; Rizzo, et al., 2013; Pruden, 2014).

Água descontaminada e de qualidade é uma necessidade humana básica, tal como também é uma importante fonte de recursos naturais (Kenney, Sutton-Grier, Smith, & Gresens, 2009). Contudo, o ser humano beneficia dos ecossistemas fluviais, e tem-os alterado profundamente ao longo do último século, ameaçando a sua integridade ecológica. São várias as atividades humanas que contribuem para a degradação dos ecossistemas fluviais, como: a descarga de efluentes urbanos, agrícolas e industriais; a introdução de espécies exóticas; a contaminação das águas subterrâneas; e a descarga pontual de esgotos domésticos (Silva M. , 2012; Piedras, et al., 2006).

Assim, para que haja uma proteção das águas de superfície interiores, de transição, costeiras e subterrâneas, foi criada a Diretiva Quadro da Água pelo Parlamento Europeu, sendo que este é o principal instrumento da Política da União Europeia relativa à água (Agência Portuguesa do Ambiente, 2019). Logo, a Diretiva Quadro de Água, tem como objetivo que todos os estados-membros desenvolvam um sistema para avaliar a qualidade destas águas, baseando-se em parâmetros e elementos físicos, químicos, mas sobretudo

biológicos, como é o caso das comunidades de macroinvertebrados bentônicos (Lock, Asenova, & Coethals, 2011)

As comunidades biológicas respondem às alterações que ocorrem nos ecossistemas fluviais e nas suas bacias de drenagem, integrando todos os efeitos de diferentes agentes de stresse a que estão expostas, como reduções do oxigénio, excesso de nutrientes e a presença de químicos tóxicos (Silva M. , 2012).

Os protocolos de avaliação biológica baseiam-se nas respostas das comunidades, dando indicações sobre a integridade biológica (Kenney, Sutton-Grier, Smith, & Gresens, 2009). Assim, há organismos que se designam sensíveis ou intolerantes, pois não conseguem sobreviver nas condições criadas por perturbações antropogénicas, enquanto outros, como não são afetados, se designam tolerantes. As comunidades biológicas refletem de forma mais precisa as perturbações e impactos no habitat do que os elementos físico-químicos que não apresentam uma integração temporal da integridade dos ecossistemas, fornecendo apenas um “retrato instantâneo” de uma realidade que é dinâmica e mutável (Silva M. , 2012). As comunidades biológicas integram os impactos cumulativos que afetam os ecossistemas dando, em consequência um retrato mais fiel.

Uma das comunidades biológicas mais usada para avaliar a integridade ecológica são os macroinvertebrados bentônicos. Estes são pequenos animais aquáticos, maioritariamente encontrados agarrados a rochas, vegetação e ramos caídos na água ou enterrados debaixo da areia e sedimentos do fundo (U.S. EPA, s.d.). Os macroinvertebrados bentônicos incluem representantes de várias ordens de insetos, crustáceos, gastrópodes, bivalves e oligoquetas, e contribuem para diversas funções ecológicas como a decomposição de matéria orgânica, intervenção no ciclo de nutrientes e nas cadeias alimentares aquáticas (Kenney, Sutton-Grier, Smith, & Gresens, 2009).

Como se referiu, as comunidades de macroinvertebrados bentônicos podem refletir diferentes perturbações antropogénicas, através de alterações na sua estrutura e função, possibilitando uma avaliação global do ecossistema aquático. A diversidade destes organismos nas ribeiras e rios é afetada por fatores como a corrente, o oxigénio, a

temperatura da água, o pH, as descargas de efluentes e a vegetação ripícola (Silva M. , 2012; Máximo, 2009; INAG, 2008).

Os macroinvertebrados bentônicos são considerados como bons bioindicadores na avaliação da qualidade da água pois:

- São organismos ubíquos, abundantes e que apresentam ciclos de vida longos o suficiente para refletir a qualidade ambiental;
- Apresentam métodos de amostragem fáceis;
- São relativamente sedentários e não evitam água com menor qualidade, logo são representativos das condições locais;
- São sensíveis a poluentes de vários tipos, e reagem de forma rápida e diferencial aos mesmos.
- As suas comunidades são muito heterogêneas, possuindo representantes de vários filos, o que oferece um amplo espetro de respostas e aumenta a probabilidade de pelo menos alguns destes organismos reagirem a uma mudança nas condições ambientais (Silva M. , 2012; Máximo, 2009).

Geralmente, rios e ribeiras sem influência antropogénica contêm uma grande diversidade de taxas de macroinvertebrados, incluindo muitos intolerantes à poluição. Por outro lado, amostras que contenham apenas espécies tolerantes à poluição ou pequena diversidade ou abundância podem indicar presença de poluição (U.S. EPA, s.d.; Patrick, Jean-Marie, & Nadine, 2015).

Os objetivos deste trabalho experimental são:

- (1) estudar a influência de três ETARs do concelho de Odemira na ocorrência de bactérias resistentes a antibióticos em meio natural. Deste modo, comparou-se a reação ao antibiótico Cloranfenicol, em bactérias presentes em amostras de água colhidas a montante e a jusante das ETARs, nas localidades de Amoreiras-Gare e Almogrove, num primeiro momento. Mais tarde, numa repetição, adicionou-se a localidade de S. Luís;
- (2) avaliar a influência das mesmas ETARs na qualidade ecológica dos cursos de água para onde drenam, por amostragem de macroinvertebrados bentônicos a montante e a jusante de cada ETAR e aplicação de índices de qualidade baseados na composição dessas comunidades.

Material e métodos

Experiência 1 – resistência bacteriana

Colheita das amostras

Colheram-se amostras de água utilizando tubos esterilizados em duas ribeiras, a montante (M) e a jusante (J) das ETARs de Almogrove e Amoreiras-Gare. Fez-se a recolha num dia sem chuva à mesma distância da margem (aproximadamente 60 centímetros), tanto a montante como a jusante. Em cada ponto colheram-se duas amostras (amostra 1 e amostra 2).

Posteriormente, na repetição da experiência voltou-se a seguir este procedimento, mas foram adicionados dois pontos de recolha: montante (M) e jusante (J) da ETAR de S. Luís.

A cartografia e descrição das ETARs apresenta-se no **Anexo I**.

Trabalho laboratorial

1. Preparou-se caldo nutritivo.
2. Dividiu-se o caldo nutritivo por 4 balões Erlenmeyer.
3. A 3 dos balões adicionou-se cloranfenicol (antibiótico) de modo a obter meios de cultura com concentrações de 20, 40 e 50 mg/L, no balão restante não se adicionou nada, de modo a este não ter antibiótico (controlo).

4. Para cada ETAR, prepararam-se 4 tubos (2 amostras de cada ponto x 2 tubos para cada amostra) para cada ensaio referido na Tabela I, exceto para B_c em que apenas se prepararam 2 tubos. Adicionou-se o meio líquido aos tubos correspondentes.
5. Esterilizaram-se os tubos de ensaio (com o meio líquido) e água destilada no autoclave.
6. Juntou-se a todos os tubos de ensaio 1mL de água da amostra correspondente menos aos controlos B_c a que se adicionou 1 mL de água destilada esterilizada, em condições de assepsia, na câmara de fluxo laminar.
7. Colocaram-se todos os tubos na estufa a 30°C.
8. Passadas 24 e 48 horas mediu-se e registou-se, qualitativamente, a turvação das soluções presentes nos tubos.
9. Passadas 48 horas mediu-se e registou-se a turbidez das soluções presentes nos tubos com um fotómetro compacto PF-12 Plus, utilizando como tara/zero o valor mais baixo de B_c da repetição respetiva.

No Anexo II apresentam-se fotografias do procedimento e um esquema geral da experiência.

Tabela I – Conteúdo dos tubos de ensaio para cada ribeira amostrada: B_c – tubo controlo, sem antibiótico e sem amostra. J – antes da ETAR; M – depois da ETAR; c - tubo controlo; 20, 40 e 50 – tubos com, respetivamente, concentrações de 20, 40 e 50 mg/L de antibiótico.

Ensaio	Meio líquido	Antibiótico	Água destilada	Amostra
B_c	9 mL	-----	1 mL	-----
M_c	9 mL	-----	-----	1 mL
M_{20}	9 mL	20mg/L	-----	
M_{40}	9 mL	40mg/L	-----	
M_{50}	9 mL	50mg/L	-----	
J_c	9 mL	-----	-----	1 mL
J_{20}	9 mL	20mg/L	-----	
J_{40}	9 mL	40mg/L	-----	
J_{50}	9 mL	50mg/L	-----	

Tratamento de dados

De modo a facilitar a interpretação dos resultados, adotámos a seguinte escala de associação de turbidez a crescimento bacteriano:

- ✓ 0 até 4 – crescimento bacteriano baixo
- ✓ 4 até 100 – crescimento bacteriano intermédio
- ✓ 100 até 200 – crescimento bacteriano elevado
- ✓ Acima de 200 – crescimento bacteriano muito elevado

Experiência 2 – qualidade ecológica da água

1. Para cada ETAR, selecionaram-se dois troços de amostragem do curso de água para onde ela drena (um para montante e outro para jusante), com 50 metros de comprimento, representativos da diversidade de habitats presentes nesse curso de água.
2. Efetuaram-se 6 arrastos de 1 metro por 0,25 metros de largura (largura da rede),

- em cada troço de amostragem, com rede de mão, de jusante para montante, os quais foram distribuídos de forma proporcional pelos habitats existentes.
3. Guardou-se o material amostrado pelos seis arrastos em conjunto e acondicionado em frascos de boca larga com sistema de fecho estanque.
4. Identificaram-se os frascos (M/J + nome da ETAR – por exemplo, M AG, que significa montante de Amoreiras-Gare).
5. Triaram-se as amostras, selecionando todos os seres vivos nelas contidos.

6. Conservaram-se os seres vivos triados em álcool.
7. Identificaram-se os organismos triados com o auxílio de uma lupa binocular e de uma chave de identificação de macroinvertebrados bentónicos e registaram-se os resultados. Aplicaram-se os índices de qualidade para os rios temporários do sul de Portugal.

Resultados

Experiência 1 – resistência bacteriana

Os resultados de turbidez de B_c foram de 0,6 e 53,0 nas amostras de fevereiro, e de 1,0 e 1,6 em março. A turbidez destes controlos, sem antibiótico e sem amostras de água das ribeiras, representa a quantidade de radiação que passa através do tubo de ensaio e do meio de cultura que se encontra no seu interior. Funcional como “branco” (null) para as medições no fotómetro. Foi obtido um valor de fevereiro com turbidez muito superior às outras, talvez devido a uma contaminação, por isso esse valor foi desprezado.

Na Tabela II encontram-se os resultados de turbidez dos ensaios de Amoreiras-Gare, de fevereiro e março, na Tabela III apresentam-se os resultados de turbidez dos ensaios de Almogrove referentes aos meses de fevereiro e março e na

Tabela IV apresentam-se os valores de turbidez dos ensaios de S. Luís referentes ao mês de março.

Tabela II – Resultados da turbidez dos ensaios da ETAR de **Amoreiras-Gare**, a montante (M), jusante (J), sem antibiótico (c) e com 20, 40 e 50 mg/L de cloranfenicol (respetivamente) em duas amostras A1 e A2, obtidas em fevereiro e março de 2019. A turbidez está na unidade NTU/FNU. Os resultados foram obtidos através da divisão dos resultados originais por 10^3 ; Méd – Média dos valores acima

	fevereiro								março							
	Mc	M20	M40	M50	Jc	J20	J40	J50	Mc	M20	M40	M50	Jc	J20	J40	J50
A1	212,2	3,5	3,9	2,2	404,0	83,0	49,6	5,2	201,4	0,4	1,4	1,6	268,8	12,7	1,4	2,7
	324,6	2,7	3,3	2,8	-	15,1	7,9	2,5	179,6	2,2	4,7	0,1	257,7	210,6	0,9	1,1
A2	212,5	31,5	3,7	3,7	399,8	20,9	3,2	2,1	208,2	0,3	3,0	33,5	379,6	1,5	1,6	1,6
	250,6	65,8	5,0	3,3	256,0	59,3	2,8	2,5	149,0	1,3	3,6	14,5	302,6	2,1	1,5	111,2
Méd	250,0	25,9	4,0	3,0	353,3	44,6	15,9	3,1	184,6	1,0	3,2	12,4	302,2	56,7	1,3	29,1

Tabela III - Resultados da turbidez dos ensaios da ETAR de **Almogrove**, a montante (M), jusante (J), sem antibiótico (c) e com 20, 40 e 50 mg/L de cloranfenicol (respetivamente) em duas amostras A1 e A2, obtidas em fevereiro e março de 2019. A turbidez está na unidade NTU/FNU. Os resultados foram obtidos através da divisão dos resultados originais por 10^3 ; Méd – Média dos valores acima

	fevereiro								março							
	Mc	M20	M40	M50	Jc	J20	J40	J50	Mc	M20	M40	M50	Jc	J20	J40	J50
A1	512,4	98,3	5,6	13,9	332,0	8,2	3,8	7,7	383,1	8,2	0,3	0,3	373,3	25,0	0,8	1,3
	441,2	20,4	14,4	5,0	430,9	27,9	3,7	16,6	302,6	0,3	0,7	0,7	339,9	15,5	3,0	0,6
A2	402,2	48,0	4,7	3,8	333,3	24,7	3,5	3,8	336,5	2,8	2,6	11,1	334,7	40,5	0,9	2,4
	432,0	76,2	6,9	3,7	418,2	4,0	3,4	4,5	352,4	50,6	3,0	0,6	419,5	28,9	16,1	1,1
Méd	446,9	60,7	7,9	6,6	378,6	16,2	3,6	8,1	343,6	15,5	1,7	3,1	366,8	27,5	5,2	1,4

Tabela IV- Resultados da turbidez dos ensaios da ETAR de **São Luís**, a montante (M), jusante (J), sem antibiótico (c) e com 20, 40 e 50 mg/L de cloranfenicol (respetivamente) em duas amostras A1 e A2, obtidas em março de 2019. A turbidez está na unidade NTU/FNU. Os resultados foram obtidos através da divisão dos resultados originais por 10^3 ; Méd – Média dos valores acima

	Mc	M20	M40	M50	Jc	J20	J40	J50
A1	315,6	1,1	0,0	0,0	365,7	5,6	0,9	1,0
	285,2	1,3	0,0	1,3	390,9	3,6	2,9	0,6
A2	392,3	0,0	1,6	0,6	291,9	15,5	2,2	1,2
	261,6	1,0	3,4	0,0	405,2	3,1	2,1	0,3
Média	313,7	0,8	1,3	0,5	363,4	6,9	2,0	0,8

A Tabela V apresenta a totalidade dos dados da turbidez, arredondados às unidades e com escala de cores de acordo com a escala de valores definida para relacionar esse fator com o crescimento bacteriano.

Tabela V – valores de turbidez associados e uma escala de cores que a relaciona o crescimento bacteriano nas classes **baixo** (0 a 4, sem cor), **intermédio** (4 a 100, a verde), **elevado**(100 a 200, amarelo) e **muito elevado** (acima de 200, vermelho)

	Mc	M20	M40	M50	Jc	J20	J40	J50
Amoreiras	212	4	4	2	404	83	50	5
	325	3	3	3		15	8	3
	213	32	4	4	400	21	3	2
	251	66	5	3	256	59	3	3
	201	0	1	2	269	13	1	3
	180	2	5	0	258	211	1	1
	208	0	3	34	380	2	2	2
	149	1	4	15	303	2	2	111
Almograve	512	98	6	14	332	8	4	8
	441	20	14	5	431	28	4	17
	402	48	5	4	333	25	4	4
	432	76	7	4	418	4	3	5
	383	8	0	0	373	25	1	1
	303	0	1	1	340	16	3	1
	337	3	3	11	335	41	1	2
	352	51	3	1	420	29	16	1
S. Luís	316	1	0	0	366	6	1	1
	285	1	0	1	391	4	3	1
	392	0	2	1	292	16	2	1
	262	1	3	0	405	3	2	0

Registaram-se valores de turbidez bastante elevados em todos os tubos controlo, de todas as ETARs, o que sugere crescimento bacteriano intenso, tal como esperado.

Como sugerem os valores na Tabela II, a montante da ETAR de Amoreiras-Gare, de forma consistente nas diferentes concentrações de antibiótico, registou-se pouco crescimento bacteriano, com algumas exceções em que esse crescimento foi

intermédio. Pelo contrário, também de forma consistente, a jusante desta ETAR os valores de turbidez foram superiores, facto que sugere um maior crescimento bacteriano em meio com antibiótico.

Os valores de turbidez dos ensaios, com antibiótico, de fevereiro na ETAR do Almograve (Tabela III) apresentam, no geral, maior turbidez a montante que a jusante. Pelo contrário, em março

houve mais casos de crescimento de microrganismos a jusante que a montante, também nos ensaios com antibiótico.

Os resultados de turbidez dos ensaios de S. Luís presentes na

Tabela IV, revelam que o crescimento bacteriano em meios com antibiótico foi muito mais baixo, tanto a montante como a jusante, no entanto, a jusante os valores são, no geral, ligeiramente mais elevados.

Experiência 2 – qualidade ecológica da água

Esta experiência ainda está em curso, não há ainda resultados tratados.

Discussão

Em fevereiro e março, os controlos, tanto a montante como a jusante, apresentaram crescimento de bactérias elevado e muito elevado, em ambas as ETARs estudadas. Isto deve-se ao facto de nos controlos não existirem antibiótico que exerça uma pressão seletiva sobre estes microrganismos, e assim eles acabaram por multiplicarem-se livremente.

Amoreiras-Gare

A **montante** da ETAR de Amoreiras-Gare, em fevereiro, notaram-se três casos de crescimento bacteriano intermédio, dois em concentração de antibiótico de 20mg/L e um em 40 mg/L. Em março, registaram-se três casos de crescimento bacteriano intermédio, no entanto neste caso ocorreram dois na concentração mais elevada de antibiótico e um na concentração de 40 mg/L. Nos restantes ensaios de montante, o crescimento bacteriano foi baixo. Refira-se que não se registou crescimento bacteriano elevado nem muito elevado, em nenhuma das amostragens de montante na concentração mais alta de antibiótico.

Estes resultados sugerem que as pressões seletivas que promovem o surgimento de resistência nas bactérias a montante de M-AG estão muito dispersas ou mesmo ausentes. De acordo com a análise do território a montante da ETAR (cartografia e descrição no Anexo I), a ocupação de solo da bacia hidrográfica da ribeira é principalmente floresta, montado de sobreiro e pastoreio. Nesta zona existem algumas habitações, mas são poucas e dispersas, sendo provável que o saneamento se processe através de fossas. Assim as fontes possíveis de bactérias com resistência serão reduzidas, sendo

eventualmente dejetos e urina de gado tratado com antibióticos.

A **jusante** da ETAR de Amoreiras-Gare, em fevereiro, registaram-se sete casos de crescimento bacteriano intermédio, estando estes presentes em todos os ensaios com 20 mg/L de cloranfenicol, dois em ensaios com 40 mg/L e um com 50 mg/L. Em março, registou-se um caso de crescimento de microrganismos intermédio na concentração de 20 mg/L de antibiótico e outro de crescimento muito elevado para a mesma concentração, para além de um com crescimento elevado para 50 mg/L. Os restantes ensaios de jusante tiveram valores baixos de crescimento de bactérias.

Notou-se um aumento no crescimento bacteriano em meios com antibiótico, quando se compara montante com jusante. Isto pode ser explicado pelo facto de entre os pontos de recolha, a montante da ETAR e a jusante da ETAR, o curso de água passar ao lado da aldeia de Amoreiras-Gare e pela ETAR, onde ocorrem descargas para a ribeira. Eventualmente, algumas casas da aldeia podem ter fossa e ocorrer o mesmo fenómeno explicado para as fossas a montante. Para além disso, segundo vários autores (Manaia, 2017; Rizzo, et al., 2013), as ETARs contribuem para o desenvolvimento de bactérias resistentes a antibióticos e para a sua libertação no ambiente, o que pode explicar o facto de a jusante termos obtido resultados que apontam a um maior crescimento bacteriano em meios com antibiótico, o que também é sustentado pelo facto desta ETAR não ter tratamento terciário, pelo que não existe uma etapa de desinfeção em que ocorre a remoção das bactérias.

Almogrove

Em fevereiro, os ensaios de **montante** da ETAR do Almogrove apresentam dez casos de crescimento bacteriano intermédio em meios com antibiótico: em todos os ensaios com 20 mg/L de antibiótico, em dois ensaios com 40 mg/L e num com 50 mg/L. Em março, registaram-se três casos de crescimento intermédio, sendo dois em concentrações de 20 mg/L de antibiótico e um numa concentração de 50 mg/L. Nos restantes ensaios houve crescimento bacteriano baixo.

Segundo o estudo do território que fizemos da área da bacia hidrográfica da ETAR do Almogrove, presente no Anexo I, a montante do ponto de recolha M-AL a ocupação do solo é maioritariamente pecuária, agricultura e também existem dois lugares (pequenas aldeias) onde não

existe sistema de esgotos, ou seja acabam por ter que recorrer a fossas, muitas delas abertas. Assim, as possíveis fontes de bactérias com resistência serão essas fossas e a pecuária. Tendo em consideração o número de casas da aldeia, o número de fossas deverá ser elevado. Por outro lado, a existência de duas pecuárias intensivas na bacia de drenagem pode contribuir para a origem das bactérias com resistência.

A zona a montante do local de amostragem M-AL, recebe ainda afluentes provenientes de zonas com atividade agrícola intensiva, que eventualmente acabam por trazer resíduos de produtos químicos utilizados nessa atividade, como fertilizantes (favoráveis ao crescimento bacteriano) ou fitofármacos (prejudiciais aos microrganismos). Os fertilizantes que eventualmente existam na água, segundo Nicolau (2016) podem potencializar a multiplicação das bactérias, incluindo as resistentes. Assim, os resultados refletem todos estes fatores, impossíveis de controlar nesta investigação, pelo que a falta de consistência nos resultados de umas amostragens para outras depende da aleatoriedade da influência desses fatores.

A jusante da ETAR do Almogrove, em fevereiro, registaram-se sete casos de crescimento bacteriano intermédio, sendo estes nos quatro ensaios com 20 mg/L de antibiótico e em três com 50 mg/L. Em março, registaram-se cinco casos de crescimento bacteriano intermédio: quatro em concentração de 20 mg/L e um em concentração de 40 mg/L.

Em fevereiro, notou-se um ligeiro decréscimo no crescimento bacteriano de montante para jusante, no entanto em março ocorreu o contrário. Assim, pode-se concluir que a ETAR não deverá ser a única fonte de resistência a antibióticos, tendo-se registado vários casos de crescimento bacteriano em meios com antibiótico a montante, e inclusive, em fevereiro, esse crescimento a montante foi superior ao verificado a jusante. Contudo, em março houve uma diminuição geral do crescimento bacteriano em comparação com fevereiro, o que pode ser explicado pela influência dos fatores aleatórios já referidos, como os momentos de aplicação de fitofármacos e fertilizantes pela agricultura e ainda a precipitação (que provoca maior diluição dos diversos produtos químicos e das próprias bactérias). Em fevereiro existiram mais casos de resistência a jusante que a montante, podendo indicar que a ETAR apesar de ter tratamento terciário (desinfecção com recurso a cloro), continua a libertar no seu efluente final bactérias resistentes.

S. Luís

Em S. Luís todos os ensaios de montante com as diferentes concentrações de antibiótico apresentaram crescimento bacteriano baixo, o que já não ocorreu a jusante, onde se registaram dois ensaios com crescimento intermédio e os restantes com crescimento baixo. O estudo do território, presente no Anexo I, na área da bacia hidrográfica da ribeira a montante do ponto de recolha M-SL revela que a ocupação do solo é, maioritariamente, composta por plantação de árvores (como o eucalipto e o pinheiro), existindo também uma mina e uma pedreira com escombros a céu aberto (potencial fonte de metais pesados para o curso de água).

Assim, os resultados obtidos, com baixo crescimento de bactérias nos meios com antibiótico, podem ser devidos a concentrações elevadas de metais pesados na ribeira. Os metais pesados exercem uma pressão seletiva nas bactérias, e segundo Pereira (2010) os metais pesados influenciam negativamente os microrganismos, resultando num decréscimo da sua biomassa e diversidade. Logo, a presença destes metais na água da ribeira pode ter reduzido a biomassa e a diversidade das bactérias, podendo levar a uma redução das bactérias com genes que conferem resistência a antibióticos.

Entre os pontos de recolha M-SL e J-SL, o curso de água atravessa a aldeia de S. Luís e passa pela ETAR. Deste modo, o ligeiro aumento de crescimento bacteriano de montante para jusante, pode ser explicado pela influência das habitações que não tenham ligação à rede de saneamento, e pela influência das descargas da ETAR, que podem libertar bactérias resistentes a antibióticos, o que conduz a um aumento da diversidade genética da população de bactérias no curso de água, tornando essa população mais apta a sobreviver quando exposta ao cloranfenicol.

É preciso ter em conta que a amostragem que realizámos não consegue ser completamente representativa da realidade da natureza visto que as ribeiras de onde recolhemos as amostras de água são um ambiente em constante alteração e a carga microbiana do curso de água não é uniforme. Para além disso, a uniformidade da carga microbiana nas amostras que recolhemos é difícil de garantir. Cada toma de amostra (1 ml) podia conter mais ou menos bactérias resistentes por estas não estarem uniformemente distribuídas na amostra recolhida.

Outro fator a ter em conta é a eventual contaminação dos meios de cultura esterilizados aquando da inoculação, visto que em fevereiro se registou contaminação de um dos brancos (B_c).

Outro fator que ainda pode ter afetado a leitura dos resultados relaciona-se com a distribuição não uniforme dos microrganismos na solução, o que poderá afetar os resultados de turbidez. Por outro lado, a turbidez por vezes não representa apenas a carga microbiana. Podem existir outras interferências, como a formação de substâncias com cor ou partículas em suspensão que interfiram com a passagem da radiação no fotómetro.

É necessário considerar também que nesta atividade experimental apenas utilizamos um antibiótico (cloranfenicol), enquanto na prática, nas ETARs, as bactérias se encontram em contacto com diversos antibióticos, pelo que as bactérias que são libertadas para o meio ambiente apresentam resistência a mais antibióticos para além do cloranfenicol.

Conclusão

Conclui-se que as ETARs do Almogrove, de Amoreiras-Gare e de S. Luís contribuem para a disseminação de bactérias resistentes a antibióticos nos cursos de água para onde drenam. Contudo, apesar destas ETARs terem aparentemente um papel importante na ocorrência de BRA nos ambientes estudados, parecem existir na bacia hidrográfica, outras fontes dessas bactérias e ainda diversas pressões seletivas que podem, previsivelmente, atuar sobre as comunidades destes microrganismos.

Referências

- Agência Portuguesa do Ambiente. (2019). *Diretiva-Quadro da Água*. Acesso em 31 de março de 2019, disponível em ambiente Portugal: <https://www.apambiente.pt/index.php?ref=16&subref=7&sub2ref=818&sub3ref=1246&fbclid=IwAR2qJ-tuRVRfpDxmEJDOe0LKOAI454m5f2orYzix3ZhVPmirY9-ULXmIeW8>
- Águas Públicas do Alentejo. (s.d). *Tratamento de Águas Residuais*. Acesso em 25 de janeiro de 2019, disponível em Águas Públicas do Alentejo: <https://www.agda.pt/geral/tratamento-de-aguas-residuais>
- Becerra-Castro, C., Macedo, G., Silva, A., Manaia, C., & Nunes, O. (15 de dezembro de 2016). Proteobacteria become predominant during regrowth after water disinfection. *Science of The Total Environment*, 573, pp. 313-323.
- Cardoso, M. D. (5 de novembro de 2018). *Portugal é dos países europeus com mais danos devido a infeções por bactérias resistentes*. Acesso em 23 de novembro de 2018, disponível em Público: <https://www.publico.pt/2018/11/05/sociedade/noticia/portugal-paises-europeus-danos-devido-infeccoes-bacterias-resistentes-1850010>
- CDCP. (25 de setembro de 2017). *Antibiotic Resistance Questions and Answers*. Acesso em 21 de novembro de 2018, disponível em Centers for Disease Control and Prevention: <https://www.cdc.gov/antibiotic-use/community/about/antibiotic-resistance-faqs.html>
- d'Azevedo, R. T. (2009). *Tecnologias de Tratamento de Águas Residuais Urbanas*. Acesso em 25 de janeiro de 2019, disponível em Naturlink: http://naturlink.pt/article.aspx?menuid=6&cid=94055&bl=1&viewall=true#Go_1
- Duin, D. v., & Paterson, D. (junho de 2016). Multidrug Resistant Bacteria in the Community: Trends and Lessons Learned. *Infectious Disease Clinics of North America*, 30(2), pp. 377-390.
- Farmácias Portuguesas. (s.d.). *Como funcionam os antibióticos?* Acesso em 16 de novembro de 2018, disponível em Farmácias portuguesas: <https://www.farmaciasportugasas.pt>
- Fernandes, P. A., Silva, M. G., Cruz, A. P., Paiva, J. A., Nogueira, P. J., Farinha, C. S., . . . Luís, S. (2016). *Prevenção e Controlo de Infeções e de Resistência aos Antimicrobianos em Números – 2015*. Lisboa: DGS.
- GSLC. (2014). *What is an Antibiotic?* Acesso em 19 de novembro de 2018, disponível em Learn.Genetics: <https://learn.genetics.utah.edu/content/microbiome/antibiotics/>
- Guilfoile, P. G., & Alcamo, I. E. (2006). *Antibiotic*. New York: Chelsea House Publishers.
- INAG, I. (2008). *Manual para a avaliação biológica da qualidade da água em sistemas fluviais segundo a directiva quadro da água: Protocolo de amostragem e análise para os macroinvertebrados bentónicos*. s.l.: Instituto da Água, I.P.
- Kenney, M. A., Sutton-Grier, A. E., Smith, R. F., & Gresens, S. E. (2009). Benthic macroinvertebrates as indicators of water quality: *Terrestrial Arthropod Reviews*, 2(2), pp. 99-128.
- Lock, K., Asenova, M., & Coethals, P. (2011). Benthic macroinvertebrates as indicators of the water quality in Bulgaria: *Limnologia*, 41(4), pp. 334-338.
- Luizi, R. P. (março de 2012). *Operação de Sistemas de Tratamento de Águas*. Acesso em 25 de janeiro de 2019, disponível em Técnico Lisboa:

- https://fenix.tecnico.ulisboa.pt/downloadFile/395144087536/TesePO_ETAR_AP.pdf
- Manaia, C. (1 de março de 2017). Assessing the Risk of Antibiotic Resistance Transmission from the Environment to Humans. *Trends in Microbiology*, 25(3), pp. 173-181.
- Manaia, C. (1 de março de 2017). Assessing the Risk of Antibiotic Resistance Transmission from the Environment to Humans: Non-Direct Proportionality between Abundance and Risk. *Trends in Microbiology*, 25(3), pp. 173-181.
- Manaia, C., Rocha, J., Scaccia, N., Marano, R., Radu, E., Biancullu, F., . . . Nunes, O. (junho de 2018). Antibiotic resistance in wastewater treatment plants: Tackling the black box. *Environment International*, 115, pp. 312-324.
- Máximo, I. B. (2009). *Avaliação da qualidade da água das ribeiras Odelouca, Odeleite e Foupana (Algarve, Portugal): uso de macroinvertebrados bentônicos como bioindicadores*. Faro: Universidade do Algarve.
- Nicolau, P. B. (2016). *Microrganismos e ambiente: ar e água, solo e extremos*. s.l.: Universidade aberta.
- Nikaido, H. (7 de julho de 2009). Multidrug Resistance in Bacteria. *Annual Review of Biochemistry*, 78, pp. 119-146.
- Palos, C. (13 de novembro de 2017). *Antibióticos: Por que algumas bactérias resistem ao tratamento*. Acesso em 21 de novembro de 2018, disponível em Hospital Beatriz Ângelo: <http://m.hbeatrizangelo.pt/pt/noticias/antibioticos-por-que-algumas-bacterias-resistem-ao-tratamento/?fbclid=IwAR24qlgIMbJ5QatgVU74iFsKRRZgdb661hV217cKwkb47wvsqyJkzQC7Uby>
- Patrick, M. S., Jean-Marie, T. M., & Nadine, M. L. (março de 2015). Benthic Macroinvertebrates as Indicators of. *Open Journal of Water Pollution and Treatment*, 2(1), pp. 8-24.
- Pereira, S. I. (2010). *Efeitos da toxicidade por metais pesados em Rhizobium leguminosarum bv. trifolii: diversidade e resposta de população isoladas de uma mina de chumbo*. Universidade de Aveiro, Departamento de Biologia. Aveiro: Universidade de Aveiro. Acesso em 22 de março de 2019, disponível em Repositório Institucional da Universidade de Aveiro: <http://hdl.handle.net/10773/3514>
- Piedras, S. R., Bager, A., Moraes, P. R., Isoldi, L. A., Ferreira, O. G., & Heemann, C. (2006). Macroinvertebrados bentônicos como indicadores de qualidade de água na Barragem Santa Bárbara, Pelotas, RS, Brasil. *Ciência Rural*, 36(2), pp. 494-500.
- Pruden, A. (2014). Balancing Water Sustainability and Public Health Goals in the Face of Growing Concerns about Antibiotic Resistance. *Environmental Science & Technology*, 48(1), pp. 5-14.
- Rizzo, L., Manaia, C., Merlin, C., Schwartz, T., Dagot, C., Ploy, M. C., . . . Fatta-Kassinos, D. (1 de março de 2013). Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: A review. *Science of The Total Environment*, 447, pp. 345-360.
- Silva, A. D., Santos, M. E., Gramaxo, F., Mesquita, A. F., Baldaia, L., & Félix, J. M. (2016). *Terra, Universo de Vida (Biologia e Geologia - 10º ano)*. Porto: Porto Editora.
- Silva, M. (2012). *Macroinvertebrados como bioindicadores da qualidade da água em rios do Sul de Portugal: caso de estudo na Bacia Hidrográfica da Ribeira de Odelouca*. Lisboa: Universidade de Lisboa.
- Sousa, J. M., Macedo, G., Pedrosa, M., Becerra-Castro, C., Castro-Silva, S., Pereira, M., . . . Manaia, C. (5 de fevereiro de 2017). Ozonation and UV254 nm radiation for the removal of microorganisms and antibiotic resistance genes from urban wastewater. *Journal of Hazardous Materials*, 323, Parte A, pp. 434-441.
- U.E. (s.d). *Células Procarióticas*. Acesso em 17 de novembro de 2018, disponível em materiais.dbio.uevora.pt: <http://materiais.dbio.uevora.pt/jaraujo/biocel/celulas.procarioticas.htm>
- U.S. EPA. (s.d.). *Indicators: Benthic Macroinvertebrates*. Acesso em 27 de março de 2019, disponível em EPA: <https://www.epa.gov/national-aquatic-resource-surveys/indicators-benthic-macroinvertebrates>
- Vidyasagar, A. (23 de julho de 2015). *What Are Bacteria?* Acesso em 25 de janeiro de 2019, disponível em Live Science: <https://www.livescience.com/51641-bacteria.html>

Anexo I - Cartografia dos locais de amostragem

A ETAR do Almogrove fica situada junto de uma linha de água que resulta da confluência do Brejo dos Carapetos, do Barranquinho, do Barranco de Portos Ruivos e ainda do Regato dos Medos. Cerca de 500 metros após a ETAR esta linha de água desagua no mar, na Praia da Foz, também conhecida por Foz dos Ouriços - Figura 1.



Figura 1 – Rede hidrográfica da linha de água que passa no Almogrove e desagua na Foz dos Ouriços ou Praia da Foz. Fonte: CIGeoE (Centro de Informação Geoespacial do Exército), 2009.

A ocupação do solo na bacia hidrográfica dessa linha de água consiste essencialmente em:

- Localidades do Almogrove e Longueira e alguns montes dispersos, com pomares, hortas e bosquetes;
- Propriedades de agricultura intensiva de carácter industrial, com produção de pequenos frutos (framboesa, mirtilo e morango) e hortícolas;
- Agropecuária, tanto para produção de carne como para produção de leite.

A Figura 2 dá uma ideia da distribuição destes usos do solo, embora se trate de imagens de 2015; daí para cá muitas propriedades de agricultura extensiva foram convertidas em agricultura de carácter mais industrial, muitas delas culturas cobertas (estufas).



Figura 2 – Imagem do Google Earth de parte da bacia hidrográfica da linha de água onde se situa a ETAR do Almograve - Fonte: "Almograve." 37°38'39.09"N e 8°46'51.85"O. **Google Earth.** 16 de maio de 2015. 7 de abril de 2019

A localização da ETAR e das estações de amostragem encontra-se na Figura 3.



Figura 3 - Localização dos pontos de amostragem a montante (M) e a jusante (J) da ETAR sobre imagem do Google Earth - Fonte: "Almograve." 38°39'21.61"N e 8°47'50.57"O. **Google Earth.** 16 de maio de 2015. 7 de abril de 2019.

De acordo com informações recolhidas junto do Município de Odemira, o tipo de tratamento efetuado nesta ETAR é terciário (secundário + desinfecção).

A ETAR de Amoreiras-Gare fica situada junto de uma linha de água que resulta da confluência da Ribeira das Pimentas e do Corgo da Nora - Figura 4



Figura 4 - Rede hidrográfica da linha de água que passa em Amoreiras-Gare. Fonte: *CIGeoE (Centro de Informação Geoespacial do Exército), 2010.*

A ocupação do solo na bacia hidrográfica dessa linha de água consiste essencialmente em:

- Localidade de Amoreiras-Gare e algumas habitações em baixo número, e dispersas entre elas;
- Montado de sobreiro e pastoreio.

A Figura 5 dá uma ideia da distribuição destes usos do solo, embora se trate de imagens de 2015.



Figura 5 - Imagem do Google Earth de parte da bacia hidrográfica da linha de água onde se situa a ETAR de Amoreiras-Gare - Fonte: "Amoreiras-Gare." 37°40'56.93"N e 8°24'29.83"O. **Google Earth.** 16 de maio de 2015. 7 de abril de 2019.

A localização da ETAR e das estações de amostragem encontra-se na Figura 6



Figura 6 - Localização dos pontos de amostragem a montante (M) e a jusante (J) da ETAR sobre imagem do Google Earth - Fonte: "Amoreiras-Gare." 37°41'18.82"N e 8°24'34.99"O. **Google Earth.** 16 de maio de 2015. 7 de abril de 2019.

De acordo com informações recolhidas junto do Município de Odemira, o tipo de tratamento efetuado nesta ETAR é secundário.

A ETAR de São Luís fica situada junto de uma linha de água (Barranco da Descabelada) e que desagua no Barranco dos Pesos, que mais tarde vai dar à Ribeira do Torgal - Figura 7

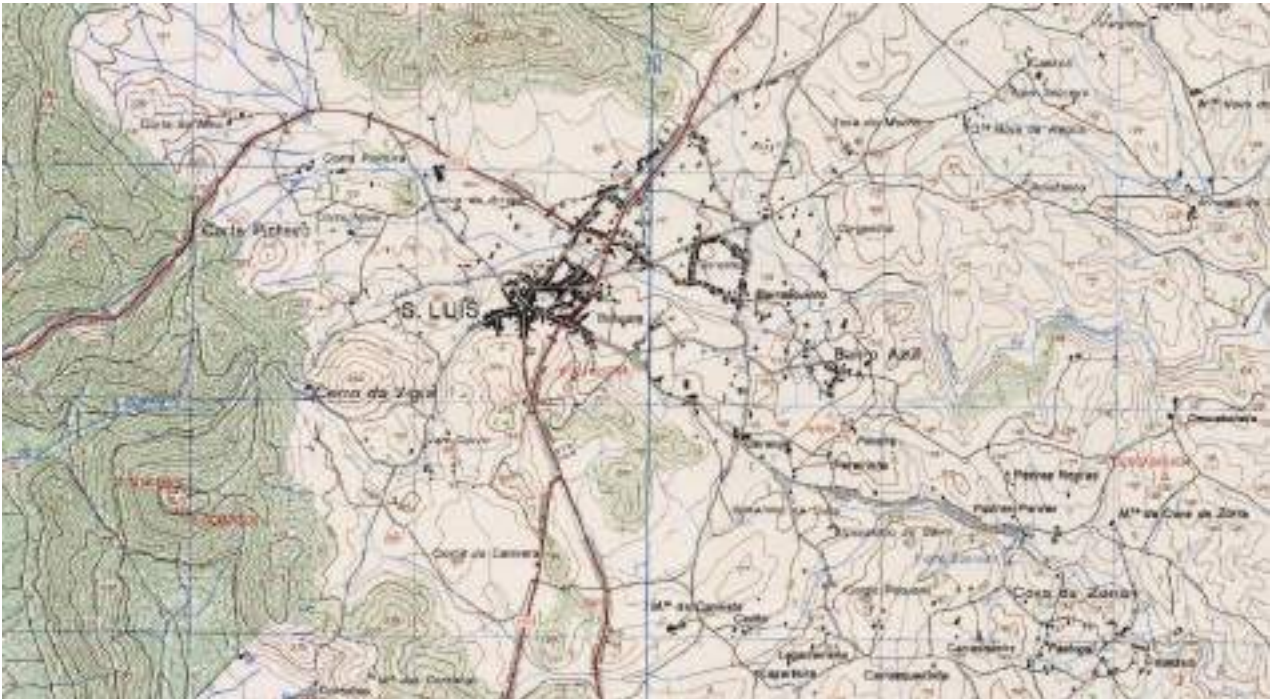


Figura 7- Rede hidrográfica da linha de água que passa em São Luís e desagua na Ribeira do Torgal. Fonte: CIGeoE (Centro de Informação Geoespacial do Exército), 2009.

A ocupação do solo na bacia hidrográfica dessa linha de água consiste essencialmente em:

- Localidades de São Luís;
- Plantação de árvores (como o eucalipto e o pinheiro);
- Mina (potencial fonte de metais pesados para o curso de água).

A Figura 8 dá uma ideia da distribuição destes usos do solo, embora se trate de imagens de 2015; A localização da ETAR e das estações de amostragem encontra-se na Figura 9. De acordo com informações recolhidas junto do Município de Odemira, o tipo de tratamento efetuado nesta ETAR é secundário.

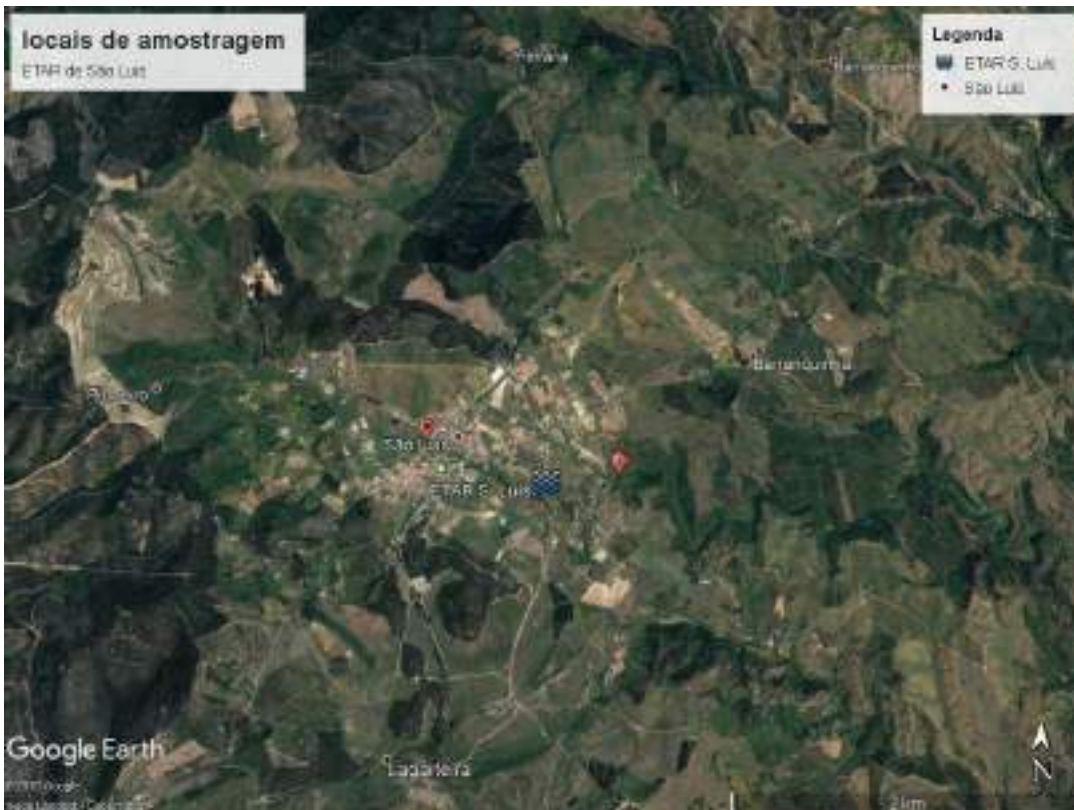


Figura 8 - Imagem do Google Earth de parte da bacia hidrográfica da linha de água onde se situa a ETAR de São Luís - Fonte: "São Luís." 37°42'56.14"N e 8°39'33.75"O. **Google Earth.** 16 de maio de 2015. 7 de abril de 2019.



Figura 9 - Localização dos pontos de amostragem a montante (M) e a jusante (J) da ETAR sobre imagem do Google Earth - Fonte: "São Luís." 37°42'55.40"N e 8°39'26.69"O. **Google Earth.** 16 de maio de 2015. 7 de abril de 2019.

Anexo II – Esquema geral da experiência e fotografias

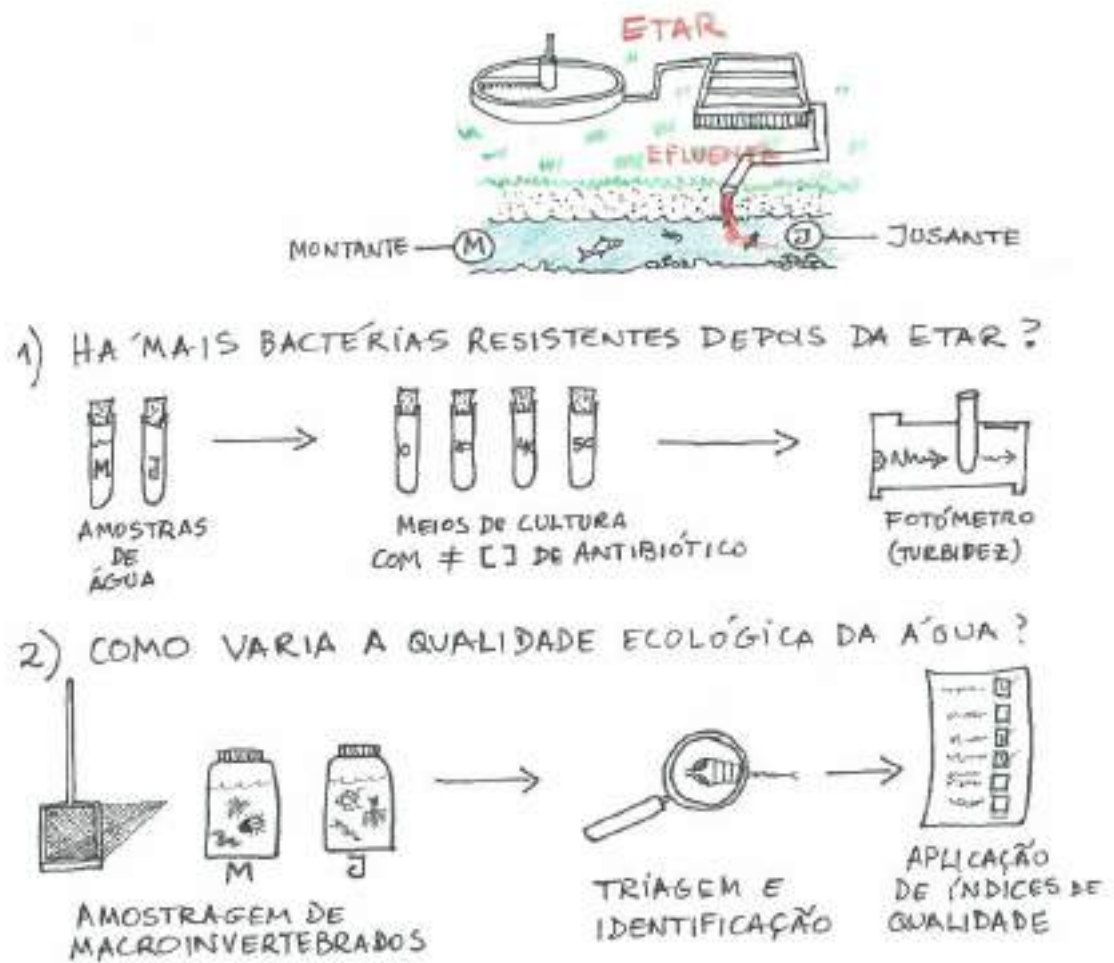


Figura 10 – Esquema geral da experiência.



Figura 11 – ETAR de Amoreiras-Gare.



Figura 12 – Ponto de recolha a montante da ETAR de Amoreiras-Gare.



Figura 13 – Ponto de recolha a jusante da ETAR de Amoreiras-Gare.



Figura 14 – ETAR do Almogrove.



Figura 15 – Zona do curso de água perto do ponto de recolha a montante da ETAR do Almogrove.



Figura 16 – Ponto de recolha a jusante da ETAR do Almogrove.

Por lapso não recolhemos imagens da ETAR de S. Luís e dos pontos de recolha do curso de água para onde ela drena, o que faremos na segunda visita a essa ETAR.



Figura 17 – Processo de inoculação dos meios de cultura com diferentes concentrações de antibiótico.



Figura 18 – Organização dos tubos inoculados e rolhados num suporte, antes de estes irem para a estufa.

Anexo III – Resultados qualitativos da experiência

Tabela I - Resultados qualitativos de turvação, referentes ao mês de fevereiro e à ETAR de Amoreiras-Gare. O grau de turvação foi avaliado numa escala qualitativa em turvação nula (0), pouco turvo (1), turvação intermédia (2) e turvação intensa (3).

	24h								48h							
	Mc	M20	M40	M50	Jc	J20	J40	J50	Mc	M20	M40	M50	Jc	J20	J40	J50
A1	2	0	0	0	2	0	0	0	3	0	0	0	3	2	2	0
	2	0	0	0	-	0	0	0	3	0	0	0	-	1	0	0
A2	2	0	0	0	2	0	0	0	3	1	0	0	3	2	0	0
	2	0	0	0	2	0	0	0	3	1	0	0	3	1	0	0

Tabela II - Resultados qualitativos de turvação, referentes ao mês de fevereiro e à ETAR de Almogrove. O grau de turvação foi avaliado numa escala qualitativa em turvação nula (0), pouco turvo (1), turvação intermédia (2) e turvação intensa (3).

	24h								48h							
	Mc	M20	M40	M50	Jc	J20	J40	J50	Mc	M20	M40	M50	Jc	J20	J40	J50
A1	2	0	0	0	2	0	0	0	3	1	0	0	3	1	0	0
	2	0	0	0	2	0	0	0	3	2	1	1	3	0	0	0
A2	2	0	0	0	2	0	0	0	3	1	0	0	3	1	0	0
	2	0	0	0	2	0	0	0	3	1	0	0	3	0	0	0

Tabela III - Resultados qualitativos de turvação, referentes ao mês de março e à ETAR de Amoreiras-Gare. O grau de turvação foi avaliado numa escala qualitativa em turvação nula (0), pouco turvo (1), turvação intermédia (2) e turvação intensa (3).

	24h								48h							
	Mc	M20	M40	M50	Jc	J20	J40	J50	Mc	M20	M40	M50	Jc	J20	J40	J50
A1	2	0	0	0	2	0	0	0	3	0	0	0	3	2	0	0
	2	0	0	0	2	1	0	0	3	0	0	0	3	0	0	0
A2	2	0	0	0	2	0	0	0	3	0	0	1	3	0	0	2
	2	0	0	0	2	0	0	0	3	0	0	1	3	0	0	0

Tabela IV - Resultados qualitativos de turvação, referentes ao mês de março e à ETAR do Almogrove. O grau de turvação foi avaliado numa escala qualitativa em turvação nula (0), pouco turvo (1), turvação intermédia (2) e turvação intensa (3).

	24h								48h							
	Mc	M20	M40	M50	Jc	J20	J40	J50	Mc	M20	M40	M50	Jc	J20	J40	J50
A1	2	0	0	0	2	0	0	0	3	0	0	0	3	1	0	0
	2	0	0	0	2	0	0	0	3	0	0	0	3	1	0	0
A2	2	0	0	0	2	0	0	0	3	0	0	0	3	1	1	0
	2	0	0	0	2	0	0	0	3	1	0	0	3	1	0	0

Tabela V - Resultados qualitativos de turvação, referentes ao mês de março e à ETAR do São Luís. O grau de turvação foi avaliado numa escala qualitativa em turvação nula (0), pouco turvo (1), turvação intermédia (2) e turvação intensa (3).

	24h								48h							
	Mc	M20	M40	M50	Jc	J20	J40	J50	Mc	M20	M40	M50	Jc	J20	J40	J50
A1	2	0	0	0	2	0	0	0	3	0	0	0	3	0	0	0
	2	0	0	0	2	0	0	0	3	0	0	0	3	0	0	0
A2	2	0	0	0	2	0	0	0	3	0	0	0	3	0	0	0
	2	0	0	0	2	0	0	0	3	0	0	0	3	1	0	0