



Melhor qualidade para as águas balneares e de recreio

Desenvolvimento do rastreamento de fontes de poluição

Acção-piloto 3
Sumário executivo



Supported by the European Union
Project co-financed by the ERDF



Índice

SECÇÃO 1 - INTRODUÇÃO	4
1.1 Concepção do Estudo	5
1.2 Revisão Bibliográfica	6
1.2.1 Conclusões e Recomendações da Revisão Bibliográfica	7
1.3 Workshop Internacional	8
1.4 Selecção de Métodos	9
SECÇÃO 2 - RESULTADOS	10
SECÇÃO 3 - CONCLUSÕES	18
SECÇÃO 4 - RECOMENDAÇÕES	20

Secção 1

Introdução



A Agência Ambiental de Inglaterra e País de Gales candidatou-se ao programa INTERREG IIB, da União Europeia (UE), para financiamento de um projecto denominado 'ICREW' – Melhorar a Qualidade das Águas Balneares e de Recreio. Pretendia-se com o projecto ajudar cinco estados-membros da UE – Reino Unido, República da Irlanda, França, Portugal e Espanha – a melhorar a qualidade das referidas águas e preparar a implementação de nova legislação da UE respeitante às mesmas.

O projecto ICREW foi avaliado em aproximadamente oito milhões de Euros e era composto por sete

sub-projectos, ou “acções piloto”. O projecto ICREW decorreu entre Abril de 2003 e Abril 2006.

Uma dessas acções piloto, a Acção Piloto 3, que envolvia parceiros da República da Irlanda, França, Portugal e Reino Unido, abordou o tema investigação da origem de contaminações fecais, microbiológicas numa perspectiva legislativa. O seu objectivo foi criar uma ferramenta de trabalho que possa ser usada para a diferenciação de fontes de poluição que tenham contribuído para a contaminação de amostras ambientais.

A qualidade das águas balneares e coníquolas, expressa em

termos de concentração de organismos indicadores de contaminação fecal, é normalmente sujeita a uma grande variação num mesmo local. As variações da qualidade são muitas vezes acontecimentos transitórios, pelo que quando controladas pela recolha de amostras de rotina são muitas vezes difíceis de explicar. Esta situação é particularmente frequente em bacias hidrográficas complexas nas quais existe uma grande variedade de fontes de contaminação focais e difusas, umas contínuas, outras intermitentes, com diferentes tempos de percurso até ao ponto de colheita.

As técnicas de modelação da qualidade da água podem ser utilizadas para solucionar alguns desses aspectos, dado que cada entrada individual pode ser modelada independentemente ou em combinação com outras. Da mesma forma, podem utilizar-se estudos de rastreio para monitorizar um número limitado de entradas em qualquer momento. Contudo, esses métodos têm as suas limitações e muitas vezes é difícil atribuir a não conformidade a uma fonte ou tipo de fonte individual.

A tipagem (caracterização) microbiana permite examinar amostras ambientais de forma tanto qualitativa como quantitativa, atribuindo os indicadores fecais encontrados nas amostras às suas diferentes origens.

A bibliografia científica refere vários métodos de caracterização diferentes, contudo nenhum demonstrou ser uma ferramenta geral para a resolução de questões ambientais práticas complexas (neste contexto).

O objectivo deste estudo foi criar uma ferramenta prática que pudesse ser usada na diferenciação de fontes de poluição fecal associadas a amostras ambientais. A intenção foi por em prática o uso do rastreio de fontes de contaminação, como uma ferramenta de gestão de bacias hidrográficas na UE. Um dos potenciais benefícios de tal metodologia seria ajudar a atingir os padrões rigorosos relativamente a *E. coli* e enterococos intestinais, em determinados locais quando for implementada a revisão à actual directiva sobre as águas balneares.

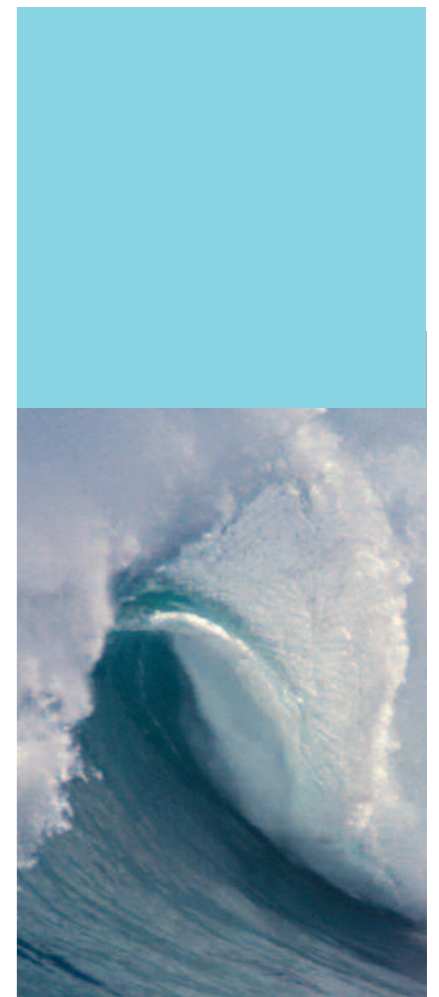
1.1 Concepção do Estudo

O estudo foi concebido em várias etapas, em que, após cada uma delas seria feita uma análise do progresso e acordadas estratégias para o prosseguimento do projecto. Essas etapas seriam:

- Revisão bibliográfica. A revisão avaliou o estado da arte do rastreio de fontes de contaminação fecal, a qual decorreu entre Setembro e Dezembro de 2003.
- *Workshop* Internacional. O *workshop* juntou especialistas de todo o mundo em várias abordagens de rastreio de fontes de poluição, com o objectivo de rever a bibliografia e assim permitir aos parceiros do projecto a escolha dos métodos para o estudo. Este *workshop* decorreu em Janeiro de 2004.
- Implementação de métodos seleccionados. Os métodos seleccionados no *workshop* foram implementados e o seu desempenho testado por cada um dos parceiros, entre Março de 2004 e Março de 2005.
- Ensaio inter-laboratoriais em bacias hidrográficas. O desempenho dos métodos foi avaliado em estudos de bacias hidrográficas em cada um dos quatro parceiros. Esta

avaliação foi efectuada entre Abril e Outubro de 2005.

- Elaboração do relatório final. Os parceiros acordaram as conclusões e recomendações do projecto. O relatório foi concluído em Fevereiro de 2006.



1.2 Revisão bibliográfica

A revisão bibliográfica está incluída em “Development of Methods for Pollution Source Tracking – Stage 3, The Consolidated Literature Review” (Desenvolvimento de Métodos para o Rastreamento de Fontes de Poluição – Etapa 3, Revisão Bibliográfica Consolidada).

Contexto

O objectivo da revisão bibliográfica foi avaliar os trabalhos publicados sobre rastreio de fontes de contaminação fecal e identificar os métodos que mereçam uma avaliação suplementar. Cada parceiro do projecto reviu um grupo específico de métodos e identificou os que desse grupo justificavam uma análise suplementar.

Os parceiros franceses e portugueses reviram métodos de genotipagem dependentes de bancos de dados. Os parceiros irlandeses reviram os métodos de genotipagem independentes de bancos de dados e o Reino Unido reviu os métodos fenotípicos e químicos.

Cada parceiro utilizou critérios previamente acordados para esta avaliação de métodos. Os critérios e sistema de pontuação usados são apresentados no Quadro 1.

Das revisões dos parceiros foram escolhidas doze técnicas, três de cada uma das quatro revisões, que foram consideradas com potencial para um estudo suplementar de acordo com os critérios de avaliação. No Quadro 2 estão descritos esses métodos.

Quadro 1: Critérios usados na avaliação dos métodos, apresentando a pontuação para os métodos seleccionados

CRITÉRIOS	IMPORTÂNCIA	MÉTODO	
		F+ RNA	PCR de <i>Bacteroidetes</i>
Grau de utilização anterior	Baixa (até 5 pontos)	3	3
Flexibilidade para implementação em qualquer tipo de meio ambiente	Baixa (até 5 pontos)	3	5
Custos para o utilizador final	Média (até 10 pontos)	3	5
Facilidade de utilização	Média (até 10 pontos)	3	4
Rapidez e produtividade de execução	Média (até 10 pontos)	4	8
Requisitos de amostragem	Média (até 10 pontos)	10	10
Quantificação e considerações estatísticas	Elevada (até 15 pontos)	13	13
Uso de um organismo indicador segundo a regulamentação	Elevada (até 15 pontos)	5	5
Garantia de qualidade e reprodutibilidade	Elevada (até 15 pontos)	6	12
Custos para a realização neste projecto	Muito Elevada (até 20 pontos)	10	12
Capacidade discriminatória e exactidão	Muito Elevada (até 20 pontos)	10	17
Necessidade de desenvolvimento	Muito Elevada (até 20 pontos)	9	10
Pontuação total	(até 155 pontos)	79	104

1.2.1 Conclusões e Recomendações da Revisão Bibliográfica

Contexto

Bactérias coliformes totais, coliformes fecais e estreptococos fecais foram historicamente adoptados como organismos indicadores para a avaliação da qualidade microbiológica de águas balneares. A quantificação destes organismos, não considerados só por si agentes patogénicos para o ser humano, é utilizada para prever o risco da exposição a vírus patogénicos entéricos, bactérias e protozoários presentes nas águas recreativas. Na União Europeia, os parâmetros microbiológicos das águas balneares para a protecção da saúde são estabelecidos *inter alia* na Directiva Europeia 76/160/EEC. Esta directiva utiliza os indicadores bacterianos fecais tradicionais para avaliar a situação da poluição e monitorizar a deterioração das águas balneares. Contudo, os organismos indicadores encontram-se quer nas fezes humanas quer nas animais e os métodos de análise existentes não fazem a distinção entre bactérias de origem humana e não humana. Por conseguinte, as implicações da informação de indicadores microbiológicos podem ser difíceis de interpretar. A capacidade destes indicadores de definir fontes de contaminação constitui um aspecto importante na gestão da qualidade da água, permitindo acções de descontaminação para melhorar a qualidade desta, protegendo a saúde da população.

Resultados da revisão

Das revisões de cada um dos parceiros foram escolhidas doze técnicas, três de cada um dos laboratórios participantes, que foram consideradas com potencial para um estudo suplementar de acordo com os critérios de avaliação. No Quadro 2 estão descritos esses métodos

seleccionados que se considerou possuírem as características desejáveis dentro da estrutura de avaliação.

Quadro: 2 Métodos identificados pela revisão bibliográfica para avaliação suplementar.

MÉTODO	TIPO
Polymerase chain reaction (PCR) de elementos repetitivos (rep-PCR)	Dependente do banco de dados genotípico
Tipagem por sequenciação de Multilocus (MLST)	Dependente do banco de dados genotípico
Electroforese de campo pulsado (PFGE)	Dependente do banco de dados genotípico
Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP)	Dependente do banco de dados genotípico
Polimorfismo de DNA amplificado aleatoriamente (RAPD)	Dependente do banco de dados genotípico
Detecção de adenovírus	Independente do banco de dados genotípico
<i>Bifidobacteria</i> fermentadora de sorbitol	Independente do banco de dados fenotípico/genotípico
Detecção de agentes branqueadores fluorescentes (FWA)	Independente do banco de dados químico
Biomarcadores de enterotoxinas	Independente do banco de dados genotípico
Genotipagem de <i>Bacteroidetes</i>	Independente do banco de dados genotípico
Genotipagem de colifagos F+	Independente do banco de dados genotípico
Espectroscopia Vibracional	Dependente do banco de dados misto

Estes métodos foram posteriormente avaliados como parte integrante do Workshop Internacional.

1.3 Workshop Internacional

O relatório referente ao Workshop Internacional está incluído no “*Report of International Workshop on Methods of Tracing Sources of Faecal Contamination in Bathing and Shellfish Waters. 12th and 13th January 2004 (Relatório do Workshop Internacional Relativo aos Métodos de Rastreamento de Fontes de Contaminação Fecal nas Águas Balneares e Conquícolas. 12 e 13 de Janeiro de 2004)*”

O objectivo do *workshop* foi juntar peritos técnicos de todo o mundo numa série de abordagens ao rastreio de fontes de poluição, de modo a apoiar os membros da Acção Piloto 3 na selecção dos métodos de rastreio mais apropriados às necessidades do projecto. A intenção era implementar os métodos seleccionados no laboratório de cada país participante e realizar ensaios de campo para demonstrar a sua efectividade.

O *workshop* incluiu apresentações por parte da equipa de projecto ICREW, que descreveu os resultados das revisões bibliográficas efectuadas, bem como contributos de outros investigadores, familiarizados com estes métodos de maior aplicabilidade no projecto. Pretendia utilizar-se o *workshop* para rever as conclusões retiradas das revisões bibliográficas e ajudar na selecção final dos métodos a utilizar para os aspectos práticos do estudo. Os participantes do evento foram divididos em três grupos, aos quais foi pedida uma

Recomendações suplementares
Embora seja evidente que as avaliações de cada um dos métodos estão sujeitas a variações de interpretação dos critérios de selecção e à perícia dos parceiros nas áreas específicas, as análises estão na sua maioria em conformidade com o objectivo estabelecido. Contudo, é também evidente que poucos dos métodos seleccionados estão bem caracterizados e ainda não foram suficientemente aplicados no campo da detecção da origem de contaminação fecal. Alguns métodos necessitam de ser validados quanto à origem da contaminação fecal e poderá ser necessário um desenvolvimento adicional. Os protocolos normalizados, sob a forma de

métodos ISO/CEN ou similares, não estão disponíveis e visto que existe a capacidade de análise de amostras usando esses métodos nos laboratórios especializados, a sua implementação em laboratórios não especializados exigiria um aumento considerável de recursos e transferência de formação/tecnologia avançadas.

Recomenda-se que enquanto existir alguma liberdade para I&D no âmbito do projecto ICREW seja imperativo a utilização de uma abordagem genérica, normalizada e realista, por todos os parceiros de forma a sustentar futuros estudos de desenvolvimento. Tal irá evitar o desenvolvimento isolados de métodos que não comprovem a repetibilidade e reprodutibilidade necessária entre países parceiros. Terá ainda a vantagem de fornecer dados para a avaliação dos métodos. Recomenda-se, por conseguinte, que paralelamente à I&D em cada instituto, seja utilizado um método comum para estabelecer bases de dados comparáveis em todos os países cooperantes. Sugere-se também que seja criado um programa de amostragem bem definido e abrangente em cada país ao longo de uma escala temporal adequada de modo a abranger a variação sazonal e temporal. Em adição às análises de rotina para *E. coli* e enterococos fecais, de modo a fornecer dados comparativos de base para o plano de amostragem definido das bacias hidrográficas, só devem ser ensaiados muito poucos ou um único método de tipagem.



1.4 Seleccção de Métodos

recomendação de dois métodos que pudessem ser utilizados no projecto. Os Grupos recomendaram os seguintes métodos.

Grupo um:-
Detecção de *Adenovirus* 40 / 41, Isolamento e enumeração de *Bifidobacterium* sp fermentadoras de sorbitol, genotipagem de *Bacteroidetes* pela técnica de PCR, genotipagem de bacteriófagos F+RNA por hibridação.

Grupo dois:-
Genotipagem de *Bacteroidetes* pela técnica de PCR, genotipagem de bacteriófagos F+RNA por hibridação.

Grupo três:-
Genotipagem de bacteriófagos F+RNA por hibridação, rep-PCR de *Escherichia coli*.

Os membros da equipa de Projecto reuniram-se a 14 de Janeiro de 2004 para discutir os resultados do *workshop* e acordar os métodos a utilizar no projecto.

Os 3 grupos presentes no *workshop* recomendaram genotipagem de bacteriófagos F+RNA por hibridação e dois dos grupos recomendaram a genotipagem de *Bacteroidetes* pela técnica de PCR.

O grupo do Projecto concordou em avaliar ambos os métodos na fase de estudo das bacias hidrográficas.

Abaixo encontram-se exemplos de resultados obtidos por cada um dos dois métodos.

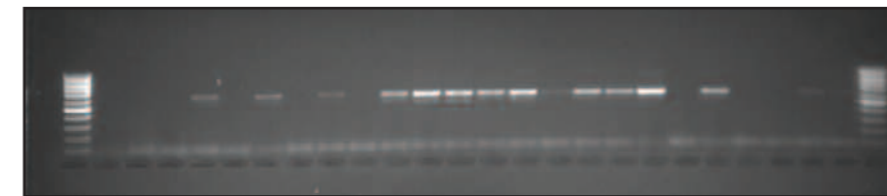


Figura 1: Exemplo de um gel de agarose de produtos de PCR positivos para o marcador CF128f de *Bacteroidetes*

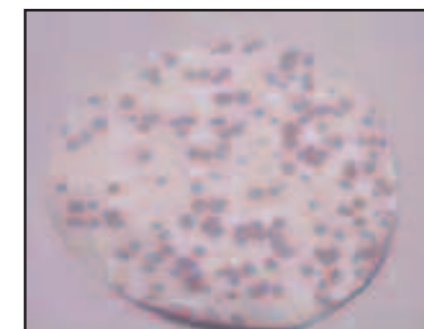
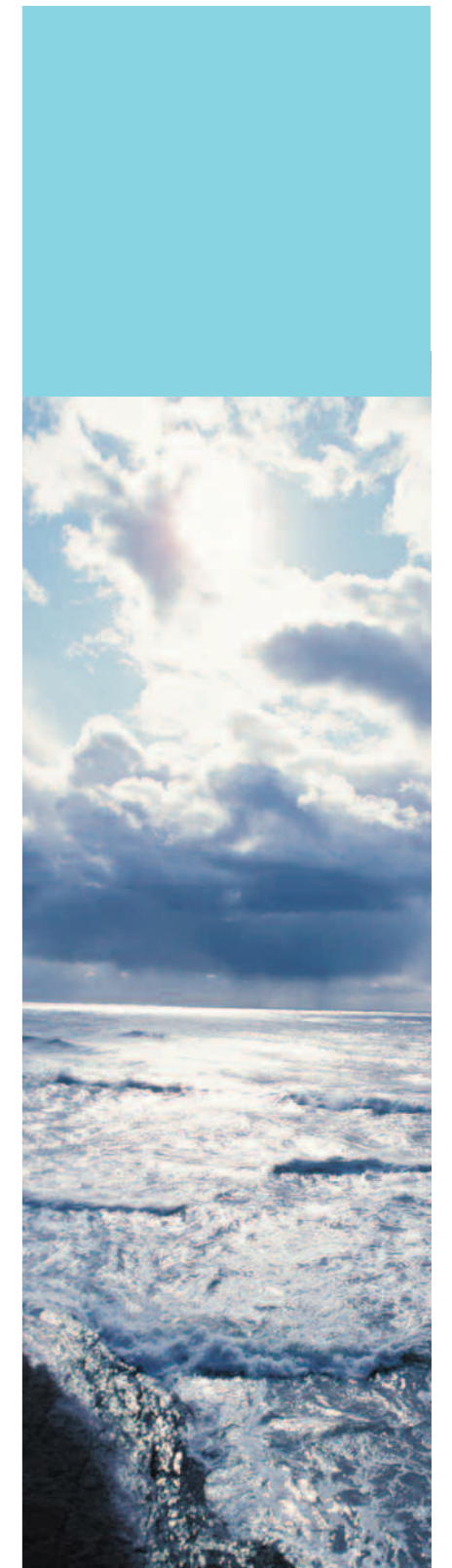


Figura 2: Exemplo de uma membrana de hibridação relativamente ao bacteriófago F+RNA



Secção 2

Resultados



Os resultados obtidos pelos diversos países encontram-se resumidos na tabela 3, página 12. A totalidade dos dados analíticos pode ser encontrados no anexo IV, da Pilot Action 3, com o título: Desenvolvimento de Ferramentas Analíticas para o Rastreamento de Fontes de Contaminação Fecal.

Durante a primeira fase do estudo Francês, a colheita de amostras de águas superficiais urbanas provenientes de pequenos canais de drenagem de Plouguin, Saint Pabu e Tréglonou, foi efectuada duas vezes por dia, em duas datas diferentes: 30/11/04 e 06/12/04.

Nestes locais os genótipos encontrados em maior número foram os genótipos II e III, sendo o genótipo II o mais frequente. Estes resultados indicam uma contaminação de origem humana o que coincide com a caracterização prévia do local. No entanto, em Plouguin e Tréglonou foi também identificado o genótipo I em quantidades mais reduzidas (Genótipo I 1.4% e

genótipo II/III 65%; Genótipo I 0.9% e genótipo II/III 75.5%, respectivamente), o que indica um baixo nível de contaminação de origem animal. Esta situação pode ser explicada pela presença de pastos com bovinos nas proximidades das águas analisadas. Nestas, a inclinação das terras encontra-se na direcção do rio. Para a realização da técnica dos *Bacteroidetes* foram seleccionados dois conjuntos de *primers* específicos para identificar a origem da contaminação: bovina ou humana (CF128f e Bac708r; HF183f e Bac708r, respectivamente). Estes *primers* foram utilizados em conjunto com um *primer* geral (Bac32f e Bac708r). Os resultados obtidos com o conjunto de *primers* específico para a contaminação de origem humana, confirmam os resultados obtidos pela técnica dos Bacteriófagos F+RNA. De facto, todas as águas deram um resultado positivo para o *primer* geral, o que indica a presença de contaminação fecal.

Deram também resultados positivos com o *primer* característico dos humanos, o que indica a presença de contaminação de origem humana.

Relativamente às colheitas efectuadas na zona agrícola (Carpont, Kerilien e Keredern), colhidas em Janeiro de 2005, foi detectado um baixo número de bacteriófagos (<100 bacteriófagos F+RNA/100ml), motivo pelo qual não se efectuou a genotipagem dos mesmos. Estas amostras foram também analisadas pela técnica dos *Bacteroidetes* para o conjunto de *primers* geral e para os dois conjuntos de *primers* específicos. Exceptuando uma das duas amostras analisadas de Keredern, todas as amostras analisadas, deram resultados positivos com o conjunto de *primers* geral, o que indica a presença de genes que codificam para o RNA 16S de *Bacteroidetes*. As amostras colhidas em Keredern, deram um resultado negativo quando testadas com os *primers* específicos. Este resultado pode ser devido ao baixo nível de contaminação fecal, ou a uma fonte de contaminação fecal que não seja humana ou bovina. As amostras colhidas em Kerilien, deram um resultado positivo quando testadas com o *primer* específico dos bovinos e um resultado negativo com o *primer* específico dos humanos, o que indica a existência de contaminação de origem bovina.

As amostras colhidas em Carpont, previamente caracterizada como zona rural, deram um resultado positivo com o *primer* específico dos humanos, o que indica uma fonte de contaminação humana. A bacia hidrográfica de Carpont apresenta uma elevada dimensão e drenagem de habitats muito diversos, o que significa que contribuições dadas por fontes de contaminação humana, não podem ser excluídas. Por outro lado, o caudal deste rio, em comparação com os outros dois efluentes rurais analisados, era bastante grande.

Foram efectuadas mais seis campanhas de recolha de água, depois de Março de 2005. Mais uma vez, os resultados obtidos pela técnica dos bacteriófagos, foram insuficientes para levar a cabo a genotipagem das placas fágicas obtidas. Em vez disso, um mínimo de 20 placas fágicas, foram repicadas e genotipadas. Estes resultados podem apenas dar uma ideia da tendência para a classificação destas águas, o que torna necessária uma maior investigação neste tipo de águas.

Durante a última campanha de colheita de águas em Outubro de 2005, foram colhidas e analisadas amostras adicionais de água. Estas amostras eram mais representativas do estuário Aber Benoît do que os efluentes urbanos ou agrícolas. Algumas destas águas eram provenientes

de águas balneares e outras provenientes de águas localizadas perto de viveiros de mariscos.

As amostras de água analisadas eram águas salinas e, no caso das águas balneares, revelaram um baixo nível de contaminação ou mesmo nenhum para as duas técnicas analisadas (Bacteriófagos F+RNA e *Bacteroidetes*).

Em relação às amostras colhidas no local de descarga da fonte de contaminação urbana para o estuário de Saint Pabu, verificou-se que à medida que o nível de salinidade aumentava, a contaminação fecal diminuía com a diluição. Tornou-se muito difícil enumerar os bacteriófagos e proceder à sua hibridação: obtenção de pequenas placas fágicas com menor sucesso ao nível da hibridação.

Em relação às amostras colhidas nos locais das descargas rurais, caso de Carpont, a água estava bem misturada com as águas do estuário, e não foi possível demonstrar um nível suficiente de contaminação que permitisse a sua caracterização.

O canal de descarga localizado em Keredern, revelou um valor de salinidade de 24%, e apresentou um nível muito baixo de contaminação.

Na República da Irlanda, foram colhidas amostras de água em locais específicos (estações) da bacia hidrográfica de Dargle em

condições de baixo caudal (tempo seco) e caudal elevado (tempo húmido). Estas amostras foram analisadas pela técnica dos *Bacteroidetes* para a presença de contaminação de origem humana ou ruminante.

Um estudo prévio efectuado na bacia hidrográfica de Gargle (Bruen e tal. 2001), demonstrou que a ordem de grandeza da concentração dos microrganismos indicadores aumentava após a ocorrência de chuvas em certas subestações, mas não em todas.

Tal como previsto por estudos prévios de ocupação da terra e microbiológicos da bacia hidrográfica, verificou-se que, independentemente das condições atmosféricas, as amostras de água provenientes de Kilmacanogue, Swann e Kilruddery's, pré-caracterizadas como "humanas", apresentavam resultados positivos para o marcador humano, enquanto que a sub-bacia de Glensoulan não demonstrava a presença deste marcador. Esta sub-bacia apresentava muito poucas populações e pouca agricultura.

O marcador humano demonstrou ser menos predictível em amostras colhidas nas sub-bacias "rurais" de Killough e Country Brook. Nestas sub-bacias as povoações existentes são pequenas mas evidentemente significativas tendo em conta a poluição microbiológica humana.



Quadro 3: Resumo dos resultados obtidos para cada uma das quatro bacias hidrográficas

País	Local	Pré-Classificação	F+ Phage Grp I	F+ Phage Grp II/III	F+ Phage Grp IV	<i>Bacteroidetes</i> HF183f	<i>Bacteroidetes</i> CF128f	Pós-Classificação
França	Plouguin	Urbana	+(4/11)	+(9/11)	-(0/11)	+(5/12)	-(0/12)	Mista / Urbana
	St Pabu	Urbana	-(0/10)	+(10/10)	-(0/10)	+(6/12)	-(0/12)	Urbana
	Tréglonou	Urbana	-(0/11)	+(9/11)	-(0/11)	+(6/12)	-(0/12)	Urbana
	Carpont	Rural	+(4/8)	+(3/8)	+(3/8)	-(0/12)	+(2/12)	Mista / Rural
	Keredern	Rural	+(4/8)	+(1/8)	+(1/8)	-(0/12)	+(2/12)	Mista / Rural
	Kerilien	Rural	+(4/6)	+(1/6)	+(1/6)	-(0/12)	+(3/12)	Mista / Rural
República da Irlanda	Kilmacanogue	Urbana	ND	ND	ND	+(4/4)	-(1/4)	Urbana
	Swan	Urbana	ND	ND	ND	+(4/4)	-(0/4)	Urbana
	Kilruddery	Urbana	ND	ND	ND	+(3/4)	-(0/4)	Urbana
	Killough	Rural	ND	ND	ND	+(2/4)	-(1/4)	Urbana
	Glensoulan	Rural	ND	ND	ND	-(0/4)	+(3/4)	Rural
	County Brook	Rural	ND	ND	ND	+(2/4)	+(3/4)	Mista
Portugal	Enniskerry CSO	Urbana	ND	ND	ND	+(1/1)	-(0/1)	Urbana
	Pintados	Mista	-(0/10)	-(0/10)	-(0/10)	-(0/10)	-(0/10)	Desconhecido
	R2	Mista	ND	+(4/10)	-(0/10)	+(4/10)	+(4/10)	Mista
	Moinho Novo	Mista	ND	+(10/10)	-(0/10)	+(8/10)	+(9/10)	Mista
	perto D. Leonor	Mista	ND	ND	ND	+(2/10)	+(1/10)	Mista
	courela D. Leonor	Rural	ND	ND	ND	+(3/4)	+(1/4)	Mista
	Pontinha	Rural	+(2/2)	+(10/10)	-(0/8)	+(10/10)	+(10/10)	Mista
	ETAR Ponte Sôr	Urbana	ND	+(1/1)	+(1/1)	+(3/4)	+(2/4)	Mista
ETAR Pinhal do Domingão	Urbana	+(2/4)	+(4/4)	ND	+(10/10)	+(8/10)	Mista	
ETAR de Tramaga	Urbana	ND	ND	ND	+(5/6)	+(6/6)	Mista	
RU	Afluente de Penpoll	Rural	+(2/12)	+(2/12)	+(1/12)	-(0/12)	+(7/12)	Mista / Rural
	Ponte Trenarth	Rural	+(2/8)	+(2/8)	-(0/8)	+(4/8)	+(1/8)	Mista
	Porto de Navas	Mista	+(2/11)	+(3/11)	+(1/11)	+(4/11)	+(3/11)	Mista
	Porto de Navas - Entrada de águas residuais	Mista	-(0/5)	+(2/5)	-(1/5)	-(1/5)	-(1/5)	Urbana / Desconhecido
	U/S Constantine STW	Mista	+(2/9)	+(3/9)	-(0/9)	+(1/9)	+(1/9)	Mista
	D/S Const STW	Mista	+(0/9)	+(2/9)	-(0/9)	+(1/9)	+(2/9)	Mista
	Nancenoy	Rural	+(4/8)	+(5/8)	-(0/8)	-(4/8)	-(3/8)	Desconhecido
	Bonallack Creek	Rural	-(0/8)	-(0/8)	-(0/8)	-(0/8)	+(1/8)	Rural
	Cidade de Gweek Stream U/S	Mista	-(0/1)	-(0/1)	-(0/1)	-(0/1)	+(1/1)	Rural
	Gweek Stream South	Mista	-(0/12)	+(3/12)	-(0/12)	+(1/12)	+(2/12)	Mista / Rural
	Afluente de Mellangoose North	Mista	-(0/6)	+(2/6)	+(1/6)	+(1/6)	+(2/6)	Mista
	Afluente de Pemboa South	Mista	-(0/6)	+(1/6)	+(2/6)	-(0/6)	+(2/6)	Mista / Rural
	Afluente de Rosevaer	Rural	+(1/10)	+(3/10)	-(0/10)	-(0/10)	+(3/10)	Mista / Rural
	Mawgan Creek @ Ponte de Trelowarren Mill	Rural	-(0/10)	+(9/10)	-(0/10)	-(0/10)	+(1/10)	Urbana / Rural
	Afluente de Caervallack	Rural	-(0/10)	-(0/10)	-(0/10)	-(0/10)	+(1/10)	Rural
	Landrivick	Rural	-(0/8)	+(2/8)	-(0/8)	-(0/8)	+(5/8)	Urbana / Rural
	Helford slipway	Rural	-(0/4)	-(0/4)	-(0/4)	+(4/6)	+(2/6)	Desconhecido / Mista
	Lanarth	Rural	+(2/10)	+(4/10)	+(1/10)	+(1/10)	+(3/10)	Desconhecido / Mista
	Came	Rural	+(3/6)	+(3/6)	+(2/6)	+(2/6)	+(1/6)	Mista

+ = Detecção de marcador - = marcador não detectado NE = Não realizado/ bacteriófago não detectado / abaixo do limiar de hibridação de 20 placas fágicas. Os valores entre parêntesis correspondem ao número de amostras positivas em relação ao número total de amostras analisadas.

O marcador humano foi sempre detectado em amostras provenientes de Enniskerry e CSO.

O marcador dos ruminantes não foi detectado em amostras provenientes das sub-bacias Swan e Kilruddery's. Estas apresentavam uma baixa proporção de terra utilizada para agricultura. No entanto, foi detectado depois da ocorrência de chuva intensa no dia 24 de Julho de 2005, em amostras provenientes da sub-bacia hidrográfica de Kilmacanogue, mas não foi detectado após a ocorrência de chuva a 29 de Julho de 2005. Nesta sub-bacia hidrográfica, a proporção de terra utilizada para agricultura é apreciável e evidentemente suficiente para por vezes, dar origem à detecção de poluição microbiológica de origem agrícola.

O marcador característico dos ruminantes foi mais frequentemente encontrado em amostras provenientes das sub-bacias de Glensoulan e Country Brook. Glensoulan é caracterizada pela existência de florestas e pastagens para ovelhas. Country Brook por agricultura e produção de lacticínios: no entanto, para a sub-bacia de Killough, que apresentava a maior proporção de pastos para gado e ovelhas, o marcador foi apenas encontrado após a ocorrência de chuva intensa.

Em todas as amostras o número de placas fágicas detectadas, para o método dos bacteriófagos, foi inferior a 20 não tendo sido, por isso, levado a cabo a hibridação destas amostras.

Para a Bacia hidrográfica Portuguesa, foram inicialmente escolhidos 4 pontos de colheita caracterizados como "mistos", 2 "rurais" e 3 "urbanos". Oito dos

nove locais revelaram-se positivos para ambos os marcadores analisados, bovinos e humanos, relativos à técnica dos *Bacteroidetes*. Os marcadores não foram detectados em todas as amostragens efectuadas, e em alguns locais apenas se obteve uma reacção positiva de fraca intensidade. O único ponto de colheita que se revelou negativo para ambos os marcadores foi a Praia dos Pintados, situada na barragem de Montargil. No processo de validação dos marcadores utilizados para a realização do método dos *Bacteroidetes*, verificou-se que em Portugal, o conjunto de primers CF128f e Bac708r, apresentavam uma baixa especificidade dando resultados positivos quando testado com amostras biológicas humanas. Tal pode explicar os resultados positivos obtidos com este marcador para todos os pontos de colheita analisados, incluindo aqueles que inicialmente foram caracterizados como "urbanos". Relativamente ao método dos bacteriófagos F+RNA, estes foram detectados em baixo número, sendo o genotipo II o mais frequentemente detectado.

No Reino Unido, durante as campanhas efectuadas nem todos os locais de colheita foram analisados, tendo sido adicionados novos locais durante o período de campanha. A bacia hidrográfica de Helford apesar de ser habitualmente caracterizada como "rural", apresenta várias habitações isoladas que contêm fossas sépticas por não existirem redes de esgotos. Deste modo, mesmo uma pequena habitação pode ter um grande impacto na qualidade da água.

A partir dos resultados obtidos, muitas das áreas caracterizadas

como "rurais", na verdade sofrem de alguma forma com a intervenção humana, possivelmente relacionadas com as fossas sépticas existentes. Um facto que sobressai nos resultados obtidos são os baixos níveis de bacteriófagos F+RNA, detectados nesta bacia. Mesmo após a concentração das amostras, estas revelaram valores baixos ou mesmo abaixo do limite de detecção do método. Para os marcadores genéticos utilizados no método dos *Bacteroidetes*, Cf128f e HF183f, apenas 14.7% das amostras (42/285) revelaram um resultado positivo, para qualquer um dos marcadores. Como não foi efectuado a análise do primer geral em conjunto com a análise das amostras, não se pode concluir se a ausência de resultados positivos se encontram relacionados com a fonte de contaminação ser diferente da analisada (nem humana nem bovina) ou se não haveria DNA de *Bacteroidetes* presente nas amostras.

Quando os bacteriófagos F+RNA eram isolados, eram frequentemente em baixo número, inferior a 30 placas fágicas. Quando tal acontecia, as placas fágicas eram individualmente repicadas e congeladas até existir um número suficiente para se proceder à hibridação. Embora tenham sido obtidos resultados destas placas fágicas, devido à reduzida quantidade presente na amostra original, não foi possível tirar qualquer ilação em relação ao tipo de fonte de poluição naquela altura, ainda que os resultados de hibridação possam dar uma indicação.

Os níveis de Bacteriófagos F+RNA isolados, e o número de marcadores de *Bacteroidetes* detectados, parecem indicar um

baixo nível de poluição na bacia hidrográfica. Este facto pode também explicar algumas das diferenças encontradas nos duplicados da mesma amostra. A baixa pluviosidade durante este período teve também um impacto nos resultados obtidos.

Foram efectuadas mais duas campanhas nos meses de Setembro e Outubro, durante e/ou após a ocorrência de fortes chuvas. A ocorrência de fortes chuvas, provocou um aumento no número de *E. coli* e Enterococos intestinais isolados, mas os valores de bacteriófagos F+RNA, mantiveram-se estáveis. Uma segunda bacia hidrográfica de maior dimensão, localizada no noroeste de Inglaterra, foi também analisada em condições de ausência e presença de chuva. Esta revelou níveis elevados de bacteriófagos F+RNA durante e após a queda de chuva. Este aumento do número de bacteriófagos F+ RNA corresponde ao aumento da presença de indicadores de fontes de contaminação animal.

Estes resultados indicam que a bacia hidrográfica de Helford, apresenta baixos níveis de bacteriófagos F+RNA, devido ao seu tamanho.

Resumo

O estudo efectuado nas bacias hidrográficas de Aber Benoît (França), Dargle (República da Irlanda), Montargil (Portugal) e Helford (Reino Unido) foi levado a cabo durante o período de Abril a Outubro de 2005. Foram analisadas, no total, 321 amostras. A distribuição destas encontra-se expressa na tabela 4, por países e tipos de área analisada.

Embora tenham ocorrido alguns períodos de chuva nas bacias hidrográficas de Dargle e Helford durante o mês de Outubro, a maior parte do trabalho foi efectuado durante um período de pouca ou nenhuma precipitação. Nesse sentido, houve pouca oportunidade de testar os métodos durante os períodos de maiores escorrências agrícolas.

Na maioria das amostras obtiveram-se contagens de *E. coli* inferiores a 2000 cfu/100ml, como se pode verificar pela análise da Quadro 5.

53.9% das amostras apresentaram uma concentração de *E. coli* inferior a 2000 cfu/100ml. Estes resultados encontram-se relacionados com a falta de chuva e consequente falta de escorrências agrícolas, nas quatro bacias hidrográficas analisadas.

Quadro 4: Distribuição de amostras por países e tipo de área.

	Tipo de área			Total
	Rural	Urbana	Mista	
França	38	38	3	79
República da Irlanda	12	14	8	34
Portugal	14	22	40	76
Reino Unido	84	0	48	132
Total	148	74	99	321

Quadro 5: Distribuição por países e concentração de *E. coli*.

	Concentração de <i>E. coli</i> por 100 ml				Total
	<500	500 - 2000	2000 - 15000	>15000	
França	10	20	27	22	79
República da Irlanda	4	2	10	18	34
Portugal	23	9	20	15	67
RU	46	59	24	3	132
Total	83	90	81	58	321

O método de PCR dos *Bacteroidetes*, foi avaliado de acordo com as seguintes regras:

- Uma fonte de poluição humana foi considerada positiva, quando o marcador HF183f revelasse um resultado positivo e o marcador CF128f, negativo.
- Uma fonte de poluição bovina foi considerada positiva, quando o marcador CF128f revelasse um resultado positivo e o marcador HF183f, negativo.
- Uma fonte de poluição era considerada mista quando ambos os marcadores revelavam um resultado positivo.

Os resultados obtidos neste método encontram-se expresso na quadro 6.

Quadro 6a: A classificação de amostras que utilizam o método de *Bacteroidetes* comparado com a classificação da amostra. (Todos os países)

		Classificação de amostra <i>Bacteroidetes</i> PCR			
		Humana	Não humana	Mista	Total
Rural	Nº de amostras	12	22	14	48
	% classificada	25%	45.8%	29.2%	100%
Urbana	Nº de amostras	33	3	16	52
	% classificada	63.5%	5.7%	30.8%	100%
Mista	Nº de amostras	11	4	15	30
	% classificada	36.7%	13.3%	50.0%	100%
Total	Nº de amostras	56	29	45	130
	% classificada	43.1%	22.3%	34.6%	100%

Quadro 6b: A classificação de amostras que utilizam o método de *Bacteroidetes* comparado com a classificação de amostra. (somente França, República da Irlanda e Reino Unido)

		Classificação de Amostra <i>Bacteroidetes</i> PCR			
		Humana	Não humana	Mista	Total
Rural	Nº de amostras	10	22	3	35
	% classificada	28.6%	62.9%	8.6%	100%
Urbana	Nº de amostras	30	2	1	33
	% classificada	90.9%	6.1%	3.0%	100%
Mista	Nº de amostras	8	1	4	13
	% classificada	61.5%	7.7%	30.8%	100%
Total	Nº de amostras	48	25	8	81
	% classificada	59.3%	30.9%	34.6%	100%

O número de amostras (estirpes) caracterizadas aumentou com a concentração de *E. coli*.

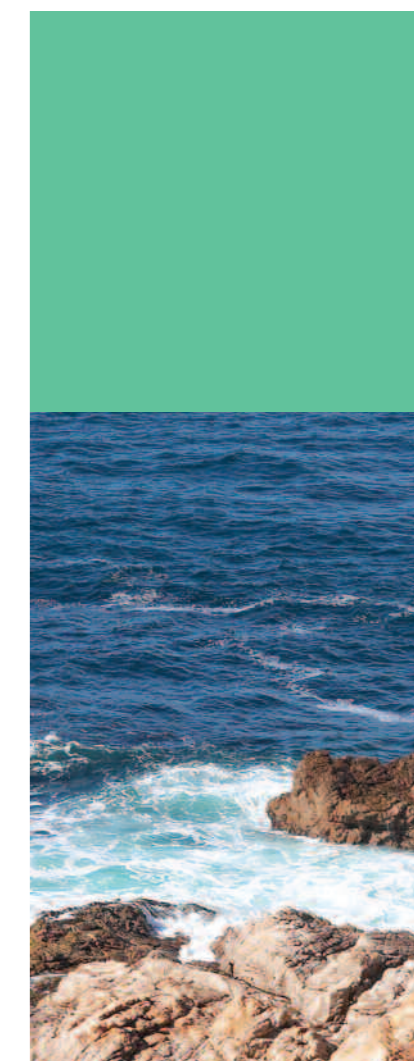
Das amostras que apresentavam contagens de *E. coli* inferiores a 500 cfu/100ml, apenas 15.7% foram classificadas. Em contraste, 81% das amostras com contagens de *E. coli* superiores a 15000 cfu/100ml foram classificadas.

Foi tido em consideração que o *primer* geral para o DNA ribossomal tinha de ser executado

em conjunto com os outros dois pares de *primers* específicos. Este *primer* funcionaria como controlo analítico interno e daria a confirmação um resultado negativo. Este marcador permitiria também associar a contaminação fecal detectada, a outras fontes que não a humana ou ruminante.

Da análise conjunta dos dados obtidos para as quatro bacias hidrográficas verificou-se que 45.8% das amostras rurais foram

classificadas como estando contaminadas a partir de uma fonte de origem animal. Este valor aumenta para 62.9% quando os valores de Portugal são excluídos, devido ao baixo nível de sensibilidade apresentado pelo marcador CF128f neste país. Das amostras “urbanas” analisadas verificou-se que 63.5% apresentaram contaminação proveniente de fontes de origem humana, enquanto que nas amostras mistas, 50% apresentaram contaminação proveniente de ambas as fontes. Mais uma vez, estes valores sobem para as amostras urbanas (90.9%) e para amostras mistas (30.8%), quando os valores de Portugal são excluídos.



As amostras rurais da bacia hidrográfica de Aber Benoît na Bretanha foram todas classificadas como contaminadas a partir de uma fonte de origem animal, enquanto que das amostras urbanas, 89.5% revelaram presença de contaminação proveniente de origem humana.

A bacia hidrográfica de Dargle na República da Irlanda, revelou que 55.6% das amostras rurais apresentavam contaminação de origem animal, 92.9% das amostras urbanas apresentavam contaminação de origem humana e 66.7% das amostras mistas apresentavam os dois tipos de marcadores, humano e animal.

A bacia hidrográfica de Montargil em Portugal, revelou que a maior parte das amostras analisadas, independentemente da sua prévia caracterização como urbana, rural ou mista, apresentavam os marcadores humano e animal.

A bacia hidrográfica de Helford localizada no Sudoeste de Inglaterra, é uma bacia rural sem áreas urbanas. 52.6% das amostras rurais apresentaram apenas contaminação proveniente de origem animal e das amostras mistas, 85.7% apresentaram apenas o marcador humano.

Na literatura e nos laboratórios de França, Portugal e do Reino Unido, foi demonstrado que os genótipos I e II eram os mais frequentemente detectados (Brion et al. 2002).

Em amostras de águas residuais e lamas analisadas (dados Franceses), verificou-se que o genótipo II e III eram os predominantes (cerca de 75%) e nos esgotos de suiniculturas os genótipos I e IV foram encontrados na mesma proporção.

As características de sobrevivência dos bacteriófagos F+RNA parece variar de acordo com o genótipo.: o grupo I demonstrou um maior período de sobrevivência, seguido do genótipo II. Os genótipos III e IV demonstraram tempos de sobrevivência similares e os mais curtos de todos em relação aos bacteriófagos F+RNA (Long and Sobsey, 2004; Brion et al.).

Os dados do método Bacteriófagos F+ foram submetidos à mesma análise dos resultados do método dos *Bacteroidetes*. Em relação à análise estatística, as amostras que revelaram valores ≥ 1 fago genotipado como humano (grupos II ou III) a origem de contaminação da amostra foi considerada como sendo humana. Para as amostras que apresentaram valores ≥ 1 fago genotipado como animal (grupo I ou IV) a origem da contaminação da amostra foi considerada como sendo animal. As amostras foram classificadas como mistas se tanto o genótipo I e IV como o II e III fossem positivos.

Como pode ser verificado no quadro 8, quando 20 ou mais placas fágicas foram isoladas e submetidas a hibridação, mais de 83.6% das amostras foram classificadas, enquanto que abaixo das 20 placas fágicas apenas foram classificadas 27.1% das amostras.

Os resultados dos quatro estudos sobre bacias hidrográficas revelaram que ambos os métodos são capazes de detectar poluição de origem animal e humana. Tendo em conta a falta de chuva durante o período de estudo, os resultados apresentados por ambos os métodos revelaram baixos níveis de contaminação fecal, uma ausência de efeito de escorrência agrícola e um baixo

nível de contaminação de origem humana.

Nenhum dos métodos funciona quando os níveis de poluição fecal são baixos, como por exemplo em amostras que contêm níveis de *E. coli* <500cfu/100ml. À medida que o nível de poluição fecal aumenta, como indicado pela contagem de *E. coli*, os métodos tornam-se mais efectivos.

Uma das limitações do método de genotipagem de Bacteriófagos F+RNA é conseguir isolar um número suficiente de placas fágicas para caracterização. Para que se tenha a certeza de um resultado é necessário que sejam hibridadas no mínimo 20 placas fágicas.

O marcador humano HF183f, do método dos *Bacteroidetes*, funcionou em todos os estudos das quatro bacias hidrográficas correspondendo a um forte indicador de poluição fecal de origem humana.

O marcador bovino CF128f, do método dos *Bacteroidetes*, era específico para gado bovino da bacia hidrográfica Irlandesa, originando reacções cruzadas com alguns leitões na França e no Reino Unido. A sua especificidade era muito menor em Portugal. Contudo, era um bom marcador de contaminação de origem animal em França, República da Irlanda e Reino Unido, mas apresentava uma especificidade insuficiente para ser utilizado em Portugal.

Os resultados do estudo da bacia hidrográfica em Portugal, revelou na maior parte das amostras a presença dos dois marcadores, o que pode indicar uma diferença nas práticas agrícolas e na drenagem das águas residuais quando comparados com os outros países participantes.

Quadro 7: Classificação de amostras que utilizam o método dos bacteriófagos F+RNA comparado com a classificação da amostra.

		Classificação da amostra de bacteriófago F+RNA			
		Humana	Não humana	Mista	Total
Rural	Nº de amostras	10	1	8	19
	% classificada	52.6%	5.3%	42.1%	10.0%
Urbana	Nº de amostras	26	2	5	33
	% classificada	78.8%	6.1%	15.2%	100.0%
Mista	Nº de amostras	1	0	8	9
	% classificada	11.1%	0%	88.9%	100.0%
Total	Nº de amostras	37	3	21	61
	% classificada	60.7%	4.9%	34.4%	100.0%

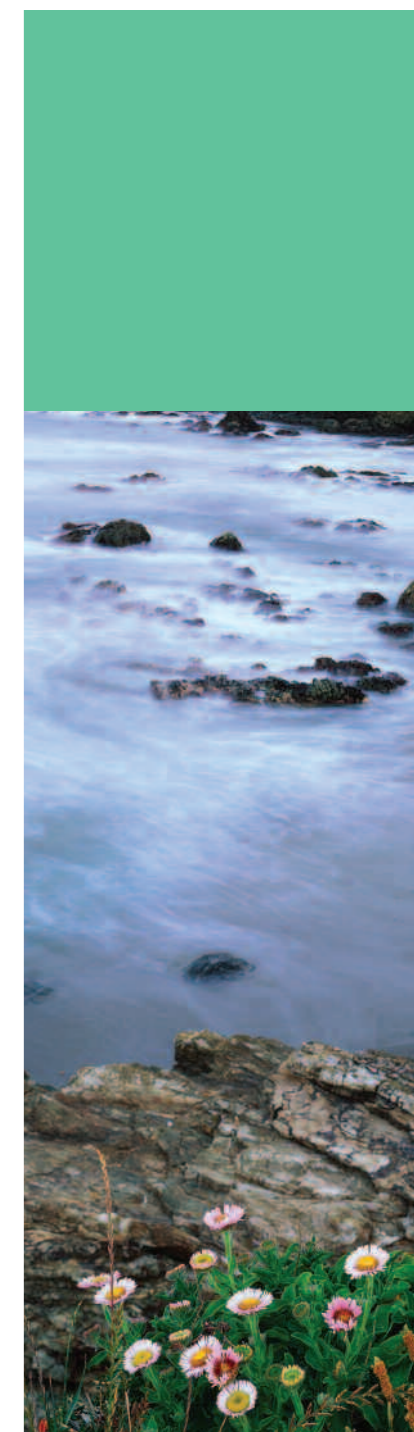
Quadro 8: Classificação de amostras segundo a contagem de placas fágicas

		Classificado F+RNA			Total
		Não Classificado	Classificado		
F+RNA placas fágicas 20	<20	Contagem	148	55	203
		% em F+ 20 halos	72.9%	27.1%	100%
	≥ 20	Contagem	12	61	73
		% em F+ 20 halos	16.4%	83.6%	100%
Total		Contagem	160	116	276
		% em F+ 20 halos	58.0%	42.0%	100%

Quadro 9: Classificação de amostras por *Bacteroidetes* e bacteriófagos F+RNA

		Class_F+			Total
		Humano	Não Humano	Misto	
Humano	Contagem	11	2	2	15
	% de Total	47.8%	8.7%	8.7%	65.25
Class Bact	Não Humano	Contagem	1	0	1
		% de Total	4.3%	0%	8.7%
Misto	Contagem	0	0	6	6
	% de Total	0%	0%	26.1%	26.1%
Total	Contagem	12	2	9	23
	% de Total	52.2%	8.7%	39.1%	100%

O quadro 9 ilustra uma concordância entre os dois métodos utilizados na classificação das amostras, sendo que os resultados são coincidentes em relação à origem da poluição para 73.9 % das amostras (mesma origem), 47.8% apresentaram poluição de origem humana e 26.1% de origem mista.



Conclusões

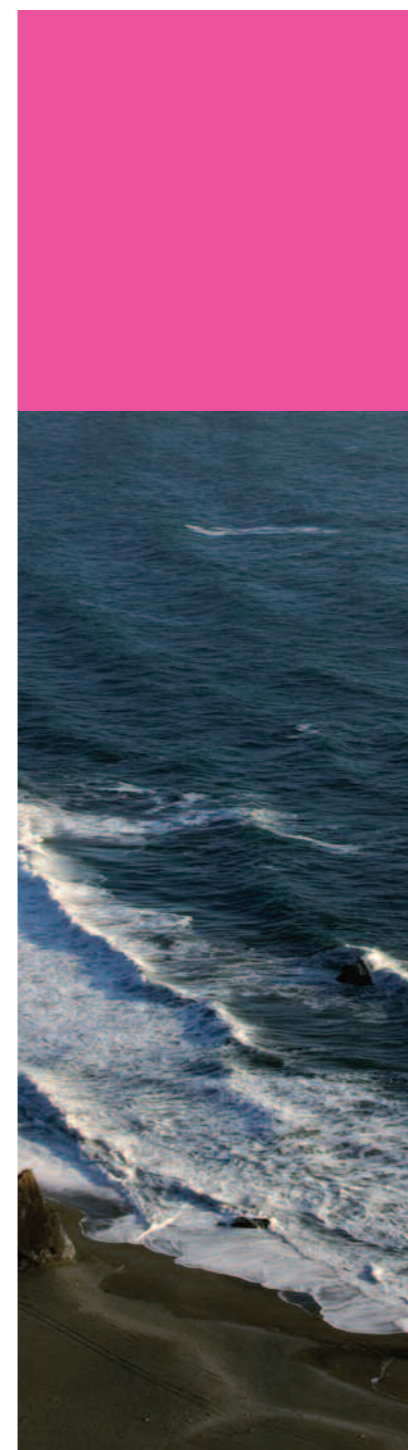


O principal objectivo da Acção Piloto 3 do ICREW foi avaliar o estado da arte relativamente ao rastreio de fontes de contaminação fecal em águas, e testar métodos já conhecidos.

Foram assim identificados dois métodos para a realização deste projecto: PCR de *Bacteroidetes* e genotipagem de bacteriófagos F+RNA, para marcadores de fonte de contaminação fecal humana e bovina. Estes métodos foram testados em bacias hidrográficas em França, República da Irlanda, Portugal e Reino Unido, durante o período de Abril a Outubro 2005.

Durante o período de estudo ocorreu muito pouca precipitação em todas as áreas geográficas estudadas, não se tendo verificado assim escoamento agrícola para as bacias hidrográficas analisadas. Os resultados obtidos foram consistentes com os esperados, dado o conhecimento sobre as bacias hidrográficas e as condições climatéricas predominantes. Assim revelaram-se baixos níveis de poluição de origem humana, e de origem animal na ausência de chuva significativa e de escoamento agrícola mesmo em bacias hidrográficas rurais.

O marcador *Bacteroidetes* HF183f provou ser um indicador fiável de poluição de origem humana, em todas as quatro áreas de estudo.



O marcador bovino CF128f apresentou também resultados positivos com porcos no Reino Unido, e França, e com amostras humanas em Portugal. No entanto provou ser um indicador fiável de poluição de origem animal em França, República da Irlanda e no Reino Unido. A especificidade do marcador CF128f na bacia hidrográfica portuguesa poderá reflectir diferenças na criação animal ou drenagem de águas residuais.

O método de genotipagem de bacteriófago F+RNA funcionou bem em França e no Reino Unido, mas menos consistente na República da Irlanda e Portugal. Isto pode dever-se aos baixos níveis de poluição verificados, que poderá ter conduzido a um baixo número de bacteriófagos presentes nas amostras analisadas.

Uma das questões em torno do método de bacteriófago F+RNA foi o número de bacteriófagos isolados e, por isso, disponíveis para classificação. Verificou-se que para garantir um nível de confiança na genotipagem é necessário um mínimo de 20 placas fágicas.

Os níveis de poluição verificados durante os estudos das bacias hidrográficas foram baixos e nenhum dos métodos funcionou bem com baixos níveis de poluição, ou seja, para contagens

de *E. coli* inferiores a 500 cfu por 100 ml. O aumento da poluição reflecte-se no aumento da contagem *E. coli* e nestas condições obtiveram-se melhores resultados para ambos os métodos.

Também se verificou que a sensibilidade de ambos os métodos pode ser melhorada, aumentando o volume da amostra analisada para um litro ou mais.

O método de PCR de *Bacteroidetes* mostrou-se de mais fácil execução que o método de genotipagem de bacteriófago F+RNA.

O trabalho da Acção Piloto 3 revelou que ambos os métodos usados podem ser utilizados para determinar a fonte de poluição fecal de águas ambientais. Os métodos beneficiariam com outros desenvolvimentos, tanto em termos de sensibilidade como de capacidade de quantificar a proporção de diferentes fontes de poluição numa amostra.

Uma das mais-valias do Projecto ICREW foi a ter permitido aos cientistas de vários países partilharem o seu conhecimento e perícia na abordagem de questões comuns. A participar na Acção Piloto 3 levou a que os cientistas envolvidos estabelecessem relações profissionais que serão importantes depois da vida útil do projecto.

Recomendações



Trabalho nas bacias hidrográficas desenvolvido após ocorrência de períodos de chuva significativa acrescentará mais informação sobre a performance dos métodos utilizados.

O marcador humano para PCR de *Bacteroidetes* HF183f pode ser eficazmente usado em bacias hidrográficas em França, República da Irlanda, Portugal e no Reino Unido.

O marcador bovino para PCR de *Bacteroidetes* CF128f pode ser eficazmente usado como um marcador animal genérico em bacias hidrográficas em França, República da Irlanda e no Reino Unido.

O método de genotipagem do bacteriófago F+ RNA pode ser usado para diferenciar fontes animais e humanas de poluição fecal. No entanto, para que seja eficaz é necessário utilizar um mínimo de 20 placas fágicas.



A optimização dos métodos melhoraria a sua performance. É necessário mais trabalho para identificar e desenvolver marcadores adicionais para grupos específicos de animais, ou seja, aves e suínos.

A aplicação da técnica de PCR em tempo real usando os *primers* HF183f e CF128f poderá ser desenvolvida de forma a fornecer resultados quantitativos.

CONTRIBUTORS**ORGANISATION****France**

Jean-Yves Piriou
 Marie-Paule Caprais
 Michèle Gourmelon
 Cécile Le Mennec
 Richard Casseron
 Raphaël Ségura

IFREMER Centre de Brest
 Laboratoire de Microbiologie-EMP/MIC
 BP 70
 29280 PLOUZANE



Alain Rince

Laboratoire de Microbiologie de
 l'Environnement,
 USC INRA 2017, EA 956
 Université de Caen Basse Normandie, France

**Ireland**

Bart Masterson
 Martin Thorp
 Wim Meijer
 Nora Carroll
 Brian Graham
 Sarah Fraser

UCD Conway Institute of Biomolecular and
 Biomedical Research
 University College Dublin
 Belfield
 Dublin 4
 Ireland

**Portugal**

Maria Leonor Falcao
 Joao Brandao
 Jorge Machado
 Baltazar Nunes
 Raquel Rodrigues
 Rita Mendonca

Instituto Nacional De Saude Dr. Ricardo Jorge
 Avenida Padre Cruz
 1649-016 Lisboa
 Portugal



INSTITUTO NACIONAL DE SAÚDE
 DR. RICARDO JORGE

United Kingdom

Andy Gawler
 Martin Walters
 Jonathan Porter
 Robert Bonsor

National Laboratory Service
 Starcross Laboratory
 Starcross
 Exeter
 Devon EX6 8PE



Jean Beecher

The University of Exeter,
 The Queen's Drive,
 Exeter,
 Devon,
 UK
 EX4 4QJ



contactos

UK

Environment Agency
Richard Fairclough House
Knutsford Road
Warrington
WA4 1HG
T +44 8708 506 506
F +44 1925 234 762
W www.environment-agency.gov.uk

France

Conseil regional de Bretagne
283 Avenue du General PATTON
RENNES
35830
T +33 299271219
F +33299271400
W www.icrew.info

Spain

Instituto tecnologico de Canarias SA (ITC)
Playa de Pozo Izquierdo s/n
POZO IZQUIERDO
E-35119 - Santa Lucía
Gran Canaria
T +34 928 727522
F +34 928 727517
W www.icrew.info

Portugal

Instituto Superior Técnico
Secção de Ambiente e Energia
Av. Rovisco Pais 1049-001
Lisboa
T +351 21 841 9433
F +351 21 841 9423
W www.icrew.info

Ireland

University College Dublin
Dept of Biochemistry
University College Dublin
Belfield
Dublin 4
T +353 1 716 1539
F +353 1283 7211
W www.icrew.info

Para mais informações sobre o projecto
ICREW, por favor visite a nossa
página web em:
www.icrew.info



Supported by the European Union
Project co-financed by the ERDF

