

H²O DROGENOMA

Uma Nova Visão Estratégica
para as Águas Minerais Naturais

H  DROGENOMA

Prefácio



A água é um bem indissociável à existência de vida no nosso planeta. Ela faz parte do seu património e tem uma influência determinante na formação da atmosfera, no clima e em todos os seres vivos. A água que nos permite sobreviver com qualidade é a água potável. Os processos naturais que permitem obter água com essas características são lentos, frágeis e muito limitados e por isso devem ser geridos com racionalidade, precaução e parcimónia. Cada cidadão encerra em si uma responsabilidade primordial de contribuir para a sua proteção e valorização, tendo em consideração que a vulnerabilidade da água e dos seus ciclos naturais é a própria vulnerabilidade do planeta que habitamos e dos

seres humanos enquanto espécie.

Estes princípios, escritos de outra maneira, constituem o essencial da “Declaração Universal dos Direitos da Água”, publicada pela ONU em 22 de março de 1992. São estes princípios que a Direção Geral de Energia e Geologia (DGE) também segue nas suas atribuições e competências, em particular, o seu compromisso em *“promover e participar na elaboração do enquadramento legislativo e regulamentar adequado ao desenvolvimento das políticas de divulgação, prospeção, aproveitamento, proteção e valorização dos recursos geológicos, incluindo recursos (...), hidrogeológicos [...]”*.

No caso português, a defesa e promoção da sustentabilidade, preservação e diferenciação das Águas Minerais Naturais e de Nascente está associada à excecional qualidade das suas águas, a qual deve ser divulgada junto da sociedade e dos cidadãos. De facto, Portugal é dos países mais ricos do mundo em água mineral natural e água de nascente, pela sua quantidade, variedade e qualidade. Provenientes de aquíferos protegidos e localizados no subsolo, as águas minerais naturais e as águas de nascente são produtos únicos, de elevada qualidade e de forte ligação à natureza.

O presente trabalho, realizado pela DGE em colaboração com outros parceiros, intitulado “Hidrogenoma – Uma Nova Visão Estratégica para as Águas Minerais Naturais”, foi financiado pelo Programa Operacional da Sustentabilidade e Eficiência no Uso de Recursos (POSEUR) e visa o aprofundamento do conhecimento de um recurso dominial, a água mineral natural, através da identificação dos microrganismos presentes, da determinação do ADN e ARN, identificando os que estão vivos e as relações existentes entre si e retirando informação sobre o meio onde se inserem.

Mas os seus objetivos não se limitaram a este aspeto. O trabalho também pretendeu ajudar a impor o termalismo em Portugal como um setor de atividade de grande importância a nível local, regional e nacional, acrescentando estudo e evidências científicas que podem ajudar a determinar e a apurar as características das águas minerais naturais, para além de critérios meramente empíricos ou apenas baseados na composição química das águas.

Este maior conhecimento da microbiologia das águas minerais naturais leva a uma melhor gestão, exploração e valorização deste recurso. A investigação que durou cerca de dois anos e meio, estudou cerca de 80 águas minerais naturais do território nacional, usadas em termalismo e em engarrafamento, proporcionando uma análise mais profunda às características de cada uma delas.

Apesar de ser um trabalho de equipa, não posso deixar de realçar a dedicação e profissionalismo da Dra. Carla Lourenço, Diretora de Serviços de Recursos Hidrogeológicos e Geotérmicos da DGEG, determinante para os resultados e sucesso deste trabalho!

Lisboa, dezembro de 2019

João Bernardo

Diretor-Geral da DGEG

Prefácio



A Direção Geral de Energia e Geologia (DGEG) é a entidade pública que exerce as funções de autoridade nacional nos domínios da energia e dos recursos geológicos, nos quais se enquadram as Águas Minerais Naturais.

No âmbito da temática dos recursos hidrominerais, sabemos que no nosso país ocorrem águas com particularidades muito interessantes, razão pela qual estas águas foram, ao longo dos anos, alvo de estudo nas mais diversas áreas científicas. O mesmo se passou com a DGEG que, ao longo dos anos, efetuou várias estratégias e iniciativas tendo em vista o aprofundar do conhecimento deste recurso geológico.

O projeto Hidrogenoma, liderado pela DGEG e cofinanciado pelo POSEUR, procura investigar o **microbismo natural de cada Água Mineral Natural, correlacionando as características geológicas, microbiológicas e hidrogeoquímicas.**

Pretendendo-se dar uma nova visão estratégica às Águas Minerais Naturais, os fatores impulsionadores que conduziram à implementação deste projeto são:

- a valorização da inovação,
- a aposta no termalismo associado à saúde,
- o crescimento do turismo e desenvolvimento regional,
- a naturoterapia – cosmética como áreas em ascensão no setor
- e a geotermia como resposta energética renovável ainda pouco explorada.

Trata-se de um estudo pioneiro que, consideramos, trará resultados que servirão de base à:

- identificação,
- caracterização e
- à individualização de cada uma das Águas Minerais Naturais, por forma a que cada uma das águas minerais naturais possa ter uma identidade própria, uma “impressão digital” única.

A iniciativa estratégica da DGEG, para a implementação e desenvolvimento do projeto Hidrogenoma tem como objetivo a melhoria do conhecimento, da exploração e da valorização deste recurso hidromineral, considerando todo o seu potencial.

Lisboa, dezembro de 2019

Cristina Lourenço

Subdiretora-Geral da DGEG

Apresentação



A Direção de Serviços de Recursos Hidrogeológicos e Geotérmicos (DSRHG) tem como estratégia aprofundar o conhecimento dos recursos hidrominerais e geotérmicos, numa ótica de promoção, gestão e valorização destes recursos geológicos, contribuindo, desta forma, para o desenvolvimento dos diversos setores de atividades associados aos mesmos.

Pretendendo ir mais além do conceito de qualidade e monitorização dos recursos hidrominerais, com base no controlo dos parâmetros físico-químicos e indicadores bacteriológicos, considerou-se ser fundamental criar uma estratégia para obter um conhecimento mais profundo das Águas Minerais Naturais, na tentativa de encarar cada Água

Mineral Natural como um ecossistema onde intervêm, não apenas os processos de interação água-rocha, mas também os processos aliados à interação destes com o microbismo natural de cada uma.

Com o projeto Hidrogenoma, deu-se mais um passo para melhor conhecer as Águas Minerais Naturais, ao estudar-se os contributos das comunidades microbianas nas características e particularidades de cada uma destas águas, o que permite controlar a qualidade das mesmas de forma mais crítica, bem como avaliar, sob outra perspetiva, o tipo de utilização que as mesmas atualmente têm e poderão vir a ter. Trata-se de um estudo pioneiro que traz resultados inovadores que vão contribuir, certamente, para a caracterização e individualização de cada uma das Águas Minerais Naturais. Temos, no entanto, plena consciência de que este estudo corresponde apenas ao início de uma nova abordagem para o conhecimento destes recursos geológicos. Sabemos que há necessidade de prosseguir os estudos iniciados com este projeto, com a realização de outras análises e pesquisas. O desafio está lançado, pelo que fazemos votos para que, em conjunto com o concessionário de cada Água Mineral Natural, se possa dar mais um passo em frente no aprofundamento do conhecimento do microbismo natural destas águas, de particularidades tão excecionais e únicas.

Com o presente livro pretende-se divulgar os resultados do projeto Hidrogenoma, sendo de salientar que tal só foi possível em virtude de uma equipa unida e coesa, da qual fazem parte, entre outros, os concessionários e os diretores técnicos, que, sem exceções, e desde o início, se prontificou a colaborar, e a quem deixo o meu agradecimento.

Lisboa, dezembro de 2019

Carla Lourenço

Diretora de Serviços de Recursos Hidrogeológicos e Geotérmicos da DGEG

ÍNDICE

- 04 • PREFÁCIO
- 07 • APRESENTAÇÃO
- 10 • PORQUÊ INVESTIGAR O MICROBISMO NATURAL DAS ÁGUAS MINERAIS NATURAIS
- 14 • BREVE INTRODUÇÃO E CONCEITOS
- 18 • O PROJETO-PILOTO COMO PONTO DE PARTIDA
- 20 • O PROJETO HIDROGENOMA
- 21 • OS OBJETIVOS DO PROJETO
- 22 • A METODOLOGIA E OS RESULTADOS
- 37 • FICHAS DE CARACTERIZAÇÃO
- 39 • CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS
- 192 • REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Índice de tabelas

- 28 • Tabela 1 – Listagem das AMN contempladas no projeto, as captações selecionadas e a indicação das fases e colheitas de amostras realizadas.
- 30 • Tabela 2 – Classificação das AMN de acordo com os parâmetros físico-químicos.
- 31 • Tabela 3 – Diversidade de géneros e espécies de bactérias mais significativas (> 1000 hits) identificadas nas AMN.

Índice de figuras

- 12 • Figura 1 – Fatores chave para a implementação do projeto Hidrogenoma.
- 18 • Figura 2 – AMN usadas em termalismo e as selecionadas para o projeto-piloto.
- 19 • Figura 3 – A metagenómica como abordagem de estudo das AMN.
- 19 • Figura 4 – Recolha de amostras de AMN durante o projeto-piloto.
- 20 • Figura 5 – Resumo do número de águas incluídas no projeto Hidrogenoma.
- 22 • Figura 6 – As diferentes fases do Projeto Hidrogenoma e organização parcelar, ao longo dos anos 2017 e 2018.
- 23 • Figura 7 – Esquema representativo do procedimento de NGS e respetivas etapas a partir da recolha de amostras.
- 24 • Figura 8 – Resultados da afiliação ao nível de espécie: % de reads validadas (valor máximo e mínimo) por fase de análise genómica (F2, F4, F6 e F8).
- 26 • Figura 9 – Resultados obtidos no estudo dos transcriptomas das AMN.
- 27 • Figura 10 – AMN por tipo de água: bicarbonatadas, sulfúreas, hipossalinas, cloretadas/sulfatadas e gasocarbónicas.
- 32 • Figura 11 – Caracterização das comunidades bacterianas, ao nível de classe, das AMN hipossalinas.
- 33 • Figura 12 – Caracterização das comunidades bacterianas, ao nível de classe, das AMN bicarbonatadas.
- 33 • Figura 13 – Caracterização das comunidades bacterianas, ao nível de classe, das AMN sulfúreas.
- 34 • Figura 14 – Caracterização das comunidades bacterianas, ao nível de classe, das AMN gasocarbónicas.
- 35 • Figura 15 – Caracterização das comunidades bacterianas, ao nível de classe, das AMN cloretadas.
- 36 • Figura 16 – Percentagem de hidrogenomas consolidados por tipo de AMN.
- 37 • Figura 17 – Exemplo de uma ficha de caracterização de uma AMN com uma página para a geologia e outra para o microbismo natural.
- 39 • Figura 18 – Resumo dos resultados obtidos no Projeto Hidrogenoma em números.

Índice de fichas de caracterização das Águas Minerais Naturais

- 41 • Mapas de localização
- 44 • Fichas de caracterização

PORQUÊ INVESTIGAR O MICROBISMO NATURAL DAS ÁGUAS MINERAIS NATURAIS

Em Portugal existe uma vasta diversidade de águas reconhecidas como Águas Minerais Naturais (AMN), para as quais, desde a antiguidade, foram atribuídas capacidades únicas no tratamento e prevenção de certas doenças, bem como na promoção da saúde e bem-estar. Por esta razão, ao longo dos anos, a composição destas águas tem sido alvo de interesse no âmbito de diversas áreas de estudo e setores de atividade, no entanto, focado essencialmente na caracterização físico-química das mesmas.

As AMN são recursos geológicos formados sob condições geológicas específicas, definidos segundo a Lei n.º 54/2015, de 22 de junho, como “águas bacteriologicamente próprias, de circulação subterrânea, com particularidades físico-químicas estáveis na origem dentro da gama de flutuações naturais, de que podem resultar eventuais propriedades terapêuticas ou efeitos favoráveis à saúde”. De acordo com a legislação nacional em vigor, distinguem-se das águas subterrâneas da região onde se localizam pela estabilidade dos seus parâmetros físico químicos, ainda que “dentro de uma gama de flutuações naturais”. Esta estabilidade advém do facto destes recursos hidrominerais possuírem uma circulação profunda, por vezes durante dezenas a milhares de anos, em que os fenómenos de interação água-rocha dão origem a águas com uma composição química própria, bem definida.

A distribuição das AMN em Portugal Continental é desigual, havendo maior

ocorrência deste tipo de águas na zona norte e centro do país, o que é devido sobretudo às características geológicas e estruturais que caracterizam o território. Estas águas fazem parte do património nacional e representam uma mais valia económico-social considerável para a região onde se inserem, dado que o tipo de aproveitamento que proporcionam (o termalismo, o engarrafamento e a geotermia) tem impacto nas áreas da saúde e bem estar, do ambiente, do turismo e da energia, consoante as respetivas particularidades.

Tendo em conta a utilização destes recursos nos setores do termalismo e do engarrafamento, as AMN são controladas e monitorizadas microbiologicamente, ao nível da captação, nos parâmetros regulamentados na Portaria n.º 1220/2000, de 29 de dezembro, sendo efetuada a pesquisa contínua de parasitas e microrganismos patogénicos, como indicadores microbiológicos de qualidade. No entanto, acredita-se que existem naturalmente outros microrganismos característicos destas águas, com benefícios ainda por descobrir. No caso do termalismo, principalmente nas AMN em que a temperatura de emergência é superior a 60°C, admite-se que possam existir microrganismos interessantes, não detetados com os métodos de pesquisa atualmente utilizados. Por outro lado, no caso do engarrafamento, a data de validade do produto é meramente indicativa, pois não há nenhum estudo que revele o “envelhecimento” da água engarrafada ou

da variação da composição físico-química e bacteriológica, ao longo do tempo.

Contrariando alguns pressupostos do passado, os sistemas hídricos subterrâneos são, cada vez mais, vistos como ecossistemas dinâmicos. Os recentes avanços no domínio da microbiologia, em particular no que se refere à microbiologia molecular, têm revelado a presença de populações microbianas em condições extremas de temperatura e pH. Estas técnicas e ferramentas moleculares tornam possível a ampliação do potencial de estudo da biodiversidade microbiana e inferir sobre a geoquímica de compostos. Uma vez otimizadas, permitem a geração de informações importantes sobre a estrutura e função das comunidades microbianas e das suas relações com a água-rocha.

Por estas razões, conscientes da variedade microbiana que possa existir nas AMN, bem como da importância que esta possa ter no funcionamento do próprio ecossistema, surgiu a necessidade de aprofundar os estudos deste tipo de águas, na área da microbiologia, e associá-los ao conhecimento já adquirido e mais consolidado da geologia e da componente físico-química, promovendo um projeto multidisciplinar que proporcionará um avanço no saber e entendimento destes recursos hidrominerais, visando não só a melhoria do seu aproveitamento, mas contribuindo também para o progresso desta área.

A biodiversidade do planeta Terra inclui a diversidade de ecossistemas e ambientes, a diversidade de comunidades, populações e espécies, bem como a variabilidade genética contida nos genes das diferentes espécies que refletem a respetiva riqueza e multiplicidade ecológica. A água e os

solos são recursos naturais vivos, uma fonte biológica inesgotável essencial à Vida e parte da biodiversidade que nos rodeia. Embora a interação água-rocha seja fundamental para a compreensão deste recurso geológico e para a definição das valências terapêuticas das AMN, não menos importante é a investigação do seu microbismo natural, que terá naturalmente o seu papel neste contexto.

Consequentemente, o estudo destes recursos hidrominerais, conciliando as vertentes da geologia e da microbiologia, poderá dar origem a oportunidades de negócio e de investimento únicos no país, tendo em vista o desenvolvimento do setor turístico associado à atividade termal, a exploração mais sustentável destes recursos e o crescimento socioeconómico e demográfico das regiões do território nacional onde estas águas ocorrem.

O projeto Hidrogenoma é sustentado pelos seguintes pilares (Figura 1): a inovação, a promoção dos setores de atividade associados às AMN (termalismo, engarrafamento e geotermia), a saúde, o turismo e desenvolvimento regional, a valorização e integração das áreas da cosmética e farmacêutica.

O fator inovação baseia-se no alcance de novos contributos, fundamentais para o esclarecimento de algumas das potencialidades dos recursos hidrominerais utilizados há milhares de anos. Considera-se este projeto um estudo inovador, tanto pelos setores de atividade envolvidos, como pela abrangência da amostragem, dado que foi direcionado para todas as AMN de Portugal Continental, utilizadas maioritariamente no termalismo e no engarrafamento, mas também na



Figura 1 - Fatores chave para a implementação do projeto Hidrogenoma.

geotermia. Destaca-se também pela prática de estudos e ensaios laboratoriais assentes em metodologias de biologia molecular e bioinformática recentes – a metagenómica e a transcriptómica – amplamente aplicados no âmbito da microbiologia ambiental. Portugal será pioneiro no desenvolvimento de um estudo que contempla a investigação e o reconhecimento do microbioma natural das AMN, procurando o aumento do conhecimento dos sistemas de circulação subterrâneos destas águas e a valorização da respetiva exploração sustentada.

Pretende-se também contribuir para o fortalecimento do setor do termalismo, pela definição de novas indicações terapêuticas

para as AMN, baseadas no conhecimento do seu microbioma natural.

O termalismo é conhecido desde há séculos e utilizado como meio de cura de determinadas enfermidades, promovendo a saúde e o bem-estar dos seus utentes. No entanto, as indicações terapêuticas de cada AMN têm sido definidas de forma empírica ou baseadas apenas no respetivo quimismo. O conhecimento do microbioma natural de cada AMN será um passo em frente no sentido em que as indicações terapêuticas e os benefícios para a saúde passam a ter, também, uma base científica. Cada água terá uma identidade própria, o seu “código de barras”, e uma vocação única para o tratamento de

certa(s) doença(s). Cada utente poderá passar a deslocar-se à estância termal mais adequada ao seu caso próprio. Este fator aliado ao potencial hidrogeológico de Portugal, quer pela diversidade de tipos de água, quer pelo número de estâncias termais existentes no país, virá, certamente, reforçar o interesse e o desenvolvimento do setor do termalismo português.

Acredita-se que o setor turístico associado ao termalismo, poderá crescer com base no novo significado deste tipo de águas, cujas novas valências darão origem ao desenvolvimento de novas atividades e experiências mais apelativas nas áreas de saúde e bem estar, de beleza e estética, de lazer e relaxamento, que proporcionam o desenvolvimento regional onde estes espaços e a exploração dos recursos se instalam, gerando riqueza para o país.

Por outro lado, o estudo metagenómico das AMN poderá ser um início para a obtenção de mais conhecimento sobre o sistema de circulação destas águas, em especial sobre as pressões e temperaturas existentes nos reservatórios, o que será útil à exploração do recurso na vertente

da geotermia. Por exemplo, poderá ser possível, a partir da existência de certos microrganismos, inferir a ocorrência, a determinada profundidade, de recursos de alta entalpia que perspetivem a produção de energia elétrica, ou de baixa entalpia para aplicações em balneoterapia, ou em sistemas de aquecimento com recurso a bombas de calor.

O projeto atribuirá igualmente valor ao produto engarrafado destas águas e potenciará novas aplicações nas áreas da cosmética, farmacêutica, entre outras. O uso das AMN e de geoprodutos para fins medicinais e dermocosméticos a partir de águas termais, está em crescente expansão e pode dar origem a novos produtos naturais com propriedades específicas, com impacto no mercado nacional e internacional, valorizando a naturoterapia que também potencia o turismo termal. O conhecimento do microbismo natural das AMN portuguesas poderá permitir a deteção e isolamento de determinados microrganismos capazes de produzir compostos de interesse com propriedades benéficas e relevantes para este tipo de produtos dermatológicos, cosméticos ou mesmo farmacêuticos.

BREVE INTRODUÇÃO E CONCEITOS

Os microrganismos são fonte natural de inúmeras enzimas com possíveis aplicações industriais viáveis, bem como de diversos outros produtos de interesse biotecnológico (Marco Filho, 2010). O conhecimento acerca da diversidade microbiana das AMN, bem como do potencial biológico associado, é escasso e inexplorado, sendo subestimado apenas com a prática de métodos de microbiologia tradicionais. Partindo do princípio de que estas águas são também constituídas por diversos microrganismos, surge a principal questão “Que microrganismos vivem naturalmente nestas águas e qual o seu papel nestes ambientes?”. Para responder a esta e outras perguntas, é necessário estudar a genómica estrutural e funcional destas águas, recorrendo a plataformas de sequenciamento de nova geração (Next Generation Sequencing, NGS) (Mayra de Carvalho, *et al.*, 2010).

Neste contexto, investigar a composição das comunidades bacterianas naturais das AMN, através de uma abordagem que permita a identificação dos organismos presentes, a caracterização dos hidrogenomas respetivos e a análise da diversidade taxonómica é um desafio atrativo. O primeiro passo será gerar dados sobre a estrutura destas comunidades (genómica) e procurar possíveis genes funcionais (transcriptómica), relacionados com o tipo de aproveitamento atual destas águas e benefícios associados (p. ex. valências terapêuticas no caso do termalismo) ou até para o desenvolvimento de produtos de valor acrescentado

(fármacos e cosméticos) ou outras aplicações na área alimentar ou prática agrícola (p. ex. fertilizantes biológicos, processos de biorremediação). Para alcançar este propósito, não só será necessário recorrer a técnicas tradicionais de isolamento e caracterização de microrganismos viáveis provenientes destas águas, como também a prática mais avançada de análise genómica, independente do cultivo, designada por metagenómica. Esta abordagem, por sequenciação de nova geração de bibliotecas metagenómicas, pode permitir a caracterização das comunidades microbianas, produzindo uma grande quantidade de informação, desde as relações filogenéticas, à descoberta de novos genes e à dedução de vias metabólicas em bactérias não cultiváveis (Jo Handelsman, 2004).

A microbiota das AMN exibe uma resposta fisiológica adaptada às condições ambientais do local, constituindo comunidades com características biológicas distintas, dado o contacto direto destas populações com propriedades químicas e físicas únicas das águas (composição iónica, temperatura, pH, condutividade, etc.). Considera-se que as AMN, devido às características particulares que caracterizam a zona onde se inserem, tais como o clima, a geologia, a geomorfologia, proporcionam a existência de um património genético único, ajustado às condições destas águas, nas quais apenas sobrevivem determinadas espécies. A determinação e a compreensão da

diversidade microbiana destas águas e do respetivo potencial metabólico é ainda desconhecido, pelo que se pretende, pela primeira vez no país, desenvolver estudos científicos sobre o microbioma das AMN portuguesas.

Para a concretização destes estudos é fundamental estudar as comunidades bacterianas representativas destas águas, conhecer a diversidade taxonómica existente, avaliar o seu papel no meio em que se inserem e pesquisar as possíveis funcionalidades do material genético em microrganismos isolados provenientes das AMN. Neste sentido é projetado o desenvolvimento de uma primeira descrição sobre as comunidades microbianas das AMN, incluindo a análise da diversidade bacteriana, através da sequenciação do ADN (ácido desoxirribonucleico) extraído do ambiente em estudo e, numa primeira fase, determinar a representatividade em termos de riqueza microbiana contida nas amostras colhidas ao longo de um determinado período, previamente definido.

É essencial ter em consideração que a interpretação dos dados gerados por metagenómica é limitada pela validade e representatividade da informação presente nas bases de dados disponíveis, criadas por pesquisa e estudos anteriores noutros contextos. Novos resultados obtidos, não contidos nestas bases de dados, necessitam de validação experimental adicional e, por essa razão, é de extrema importância o cultivo de microrganismos isolados representantes do ambiente que se pretende estudar. Portanto, a metagenómica é uma ferramenta complementar às técnicas

mais tradicionais para a análise da composição, diversidade e funcionalidade das comunidades bacterianas, sendo também relevante a recolha de dados sobre o local, nomeadamente as características da envolvente (p. ex. o solo, a vegetação e o clima).

A biodiversidade destes recursos poderá oscilar naturalmente, de acordo com a localização, a envolvente e as possíveis alterações e influência climática (temperatura, precipitação, entre outros). Na tentativa de perceber esse efeito, foram selecionadas duas épocas do ano distintas (primavera e outono), de modo a poder comparar a composição das comunidades, ao longo dos anos hidrológicos em que decorreu o estudo, por época do ano, e averiguar se existem diferenças significativas.

Como referido anteriormente, o isolamento e cultivo de microrganismos por si só, limita a análise da diversidade microbiana nas AMN, pois apenas uma ínfima parte destes microrganismos poderia ser cultivado em laboratório. Assim, o estudo da diversidade a partir de amostras ambientais de AMN, será complementado com o sequenciamento em massa de ADN com elevado rendimento, numa plataforma capaz de gerar milhares de dados num curto espaço de tempo, devido à rápida amplificação de fragmentos de ADN e à capacidade informática de manipulação e reconhecimento das sequências biológicas (Renan Pastore, 2016).

A sequenciação de nova geração na plataforma Illumina consiste numa tecnologia de sequenciamento de ADN por síntese, dividida em fases distintas:

a preparação das amostras de ADN, a formação de clusters por reação em cadeia da polimerase, a sequenciação e análise de dados. O ADN extraído das amostras ambientais recolhidas é fragmentado aleatoriamente, esses fragmentos são ligados posteriormente a adaptadores (oligonucleotídeos) marcados e imobilizados. Depois da preparação dos fragmentos para iniciar a reação de sequenciação são adicionados nucleotídeos não marcados e a ADN polimerase inicia a amplificação dos fragmentos em ponte, repetindo o processo em vários ciclos para a formação de clusters de moléculas idênticas, cujos fragmentos são amplificados milhões de vezes, marcados com fluoróforos que emitem fluorescência em cada cluster, capturada por um dispositivo de leitura próprio. Este procedimento de incorporação de nucleotídeos marcados e leitura é repetido continuamente, terminando na montagem da sequência completa de cada cluster (Illumina, Inc., 2015).

Trata-se de uma técnica vantajosa, na medida em que tem como alvo a totalidade da informação genética contida numa amostra ambiental, de forma relativamente rápida e padronizada, permitindo a execução massiva de reações de sequenciamento em paralelo, sem necessidade de inserir os fragmentos num hospedeiro. Esta metodologia utiliza o ADN genómico total extraído diretamente do meio ambiente a estudar.

A avaliação da riqueza e abundância taxonómica de comunidades bacterianas num ambiente natural, como as AMN, pode basear-se nos conceitos de riqueza, isto

é, no número de Unidades Taxonómicas Operacionais (OTUs) por grupos taxonómicos identificados numa dada amostra. A riqueza específica é inferida pela atribuição à sequência do gene 16S rRNA, o conceito de OTU. A comparação da riqueza em diferentes amostras, através do número de OTUs, permite verificar se o número de sequências obtidas foi suficiente para revelar o número total de espécies numa dada amostra. Outra forma de avaliar é por comparação da estrutura da comunidade, através da composição dos grupos microbianos nas várias amostras ambientais. Os índices de diversidade são também usados para comparar as comunidades bacterianas, sob a influência de um fator biótico, de forma qualitativa (pela presença ou ausência de um grupo taxonómico) e quantitativa (pela abundância de um grupo taxonómico) (Renan Pastore, 2016).

O índice de Shannon-Wiener (H') é utilizado para medir a diversidade de uma comunidade, tendo por base a abundância proporcional de espécies (OTUs). Este cálculo parte da premissa de que a população é indefinidamente grande ou infinita e que todas as espécies são representadas e assenta na seguinte equação:

$$H' = - \sum_{i=1}^S \frac{S_i}{N} \ln \frac{S_i}{N}$$

Onde S é o número de espécies observadas, S_i é o número de sequências da espécie i (OTU) e N é o número de sequências amostradas (Shannon, C.E. e Weaver, W., 1949) (Spellerberg, I.F. e Fedor, P. J., 2003). A

riqueza e a diversidade de microrganismos numa comunidade são dependentes do número de sequências obtidas, tendo em conta que o número de OTUs tende a aumentar à medida que as sequências marcadas são analisadas. Logo, o número de espécies identificadas (OTUs) permite avaliar o quanto os dados amostrais representam a riqueza existente no ambiente em análise, para além de permitir o estudo comparativo entre as amostras.

A variação das comunidades bacterianas, ao longo da colheita das amostras, é avaliada por análise taxonómica em diferentes níveis de organização (Reino, Filo, Classe, Ordem, Família, Género e Espécie), através dos dados obtidos por sequenciação NGS (Illumina), entre as quais a análise da composição do microbioma de

cada AMN selecionada, será apresentada e explorada ao nível da Classe e Género representativos, resultando o resumo comparativo da composição taxonómica por água, com a variação dos grupos taxonómicos, ao longo das colheitas, com a repressão de alguns grupos em detrimento de outros em diferentes proporções.

O ideal será que o hidrogenoma das AMN analisadas seja consolidado, isto é, estável na sua composição entre as diferentes amostras, sem variabilidade genética significativa entre estas. Neste caso, é possível validar estatisticamente a afetação das espécies exclusivas com atribuição conhecida e, desta forma, determinar uma assinatura hidrobiómica. No caso contrário, será necessário validar os dados com outras amostras suplementares.

O PROJETO-PILOTO COMO PONTO DE PARTIDA

Por forma a aferir sensibilidades sobre esta temática, a DGEG foi, em 2010, promotora de um projeto piloto para avaliar a riqueza das AMN em termos de microrganismos, bem como para estabelecer metodologias para este tipo de estudos. Este projeto multidisciplinar, foi iniciado partindo da

caracterização das AMN em termos de geologia, do tipo hidrogeoquímico e da temperatura de ocorrência, tendo sido criados “grupos tipo”, de entre os quais foram selecionadas 10 (dez) águas, todas com utilização em termalismo (Figura 2). Para cada uma destas águas foi realizada

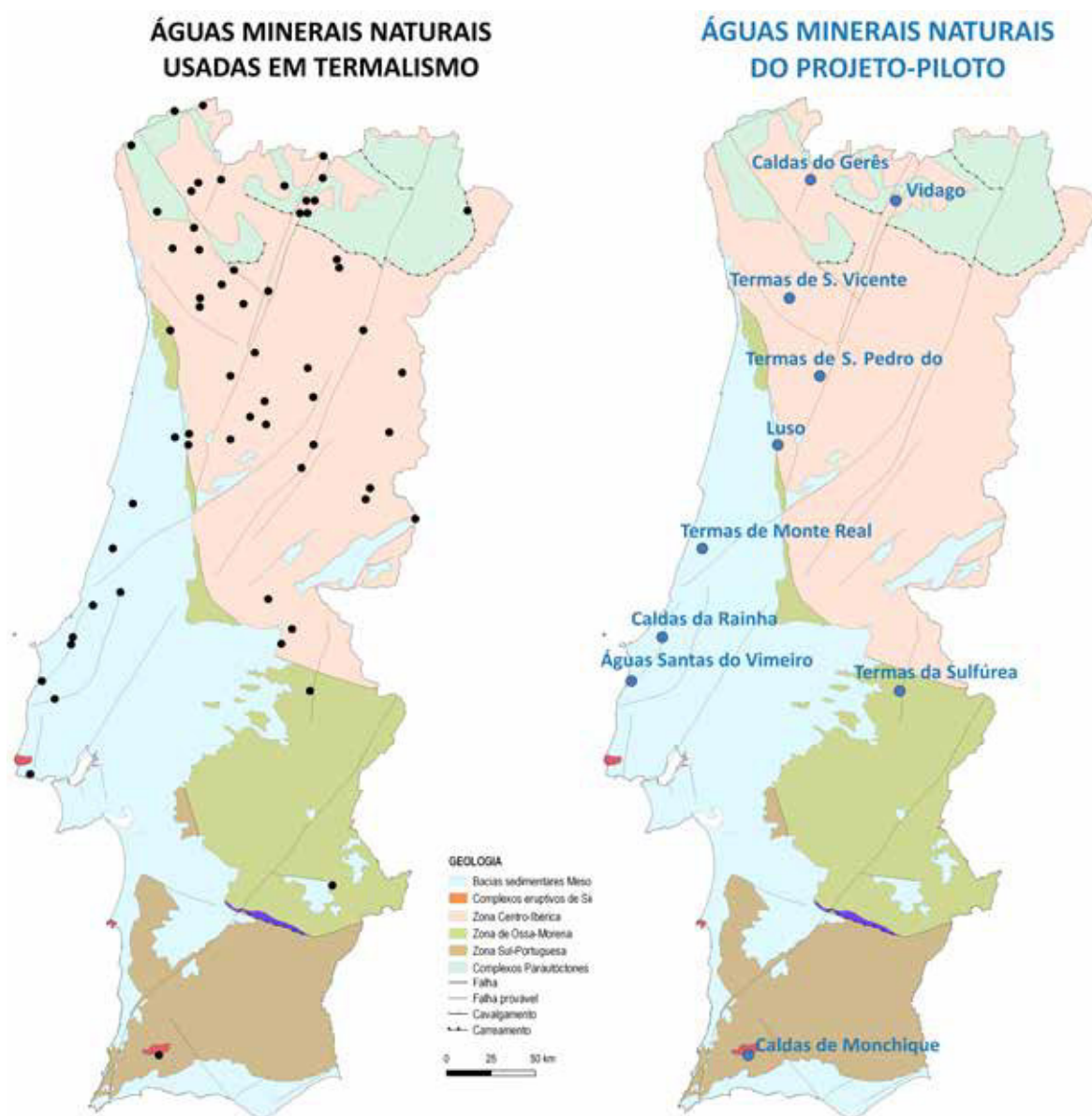


Figura 2 - AMN usadas em termalismo e as selecionadas para o projeto-piloto.

uma breve descrição dos microrganismos obtidos, com a identificação dos principais grupos taxonómicos e respetiva filogenia, através da análise metagenómica do ADN extraído das amostras recolhidas, utilizando a plataforma de sequenciação de nova geração Roche 454 (Figura 3).

dos microrganismos, no sentido de melhor compreender estes resultados e correlacionar a composição físico-química e microbiológica de cada uma destas águas com o meio ambiente em que se inserem. Os passos seguintes foram delineados de modo a alcançar maior abrangência na amostragem e caracterizar individualmente cada AMN.



Figura 3 – A metagenómica como abordagem de estudo das AMN.

A pesquisa através da sequenciação do ADN não permitiu distinguir os microrganismos vivos dos mortos, o que é possível através da análise do ARN (ácido ribonucleico). Este estudo preliminar reuniu dados reveladores sobre a riqueza microbiológica das AMN, partindo da colheita de amostras destas águas na respetiva captação (Figura 4), tendo demonstrado, por exemplo, a existência de bactérias com capacidade antibacteriana e antioxidante.



Figura 4 – Recolha de amostras de AMN durante o projeto-piloto.

Desta forma, foi reforçado o interesse e a necessidade de alargar o estudo metagenómico a todas as AMN do território continental e avançar, por outro lado, também com a análise da viabilidade

O PROJETO HIDROGENOMA

Na sequência dos resultados obtidos no projeto piloto, surge o Projeto Hidrogenoma – Uma Nova Visão Estratégica para as Águas Minerais Naturais, um estudo inovador sobre o microbismo natural destes recursos hidrominerais, liderado pela DGEG e cofinanciado pelo POSEUR (Projeto POSEUR-03-2215-FC-000001 – Montante: 1.156.278,12€), com a duração de dois anos e meio, no qual foram contempladas 81 AMN existentes em Portugal continental: 76 estão qualificadas e 5 estão em fase e/ou em perspectiva de qualificação. Destas, 7 foram excluídas no decorrer do projeto, 74 foram alvo da análise genómica, das quais 72 são AMN e 2 são águas em fase de qualificação (Figura 5).

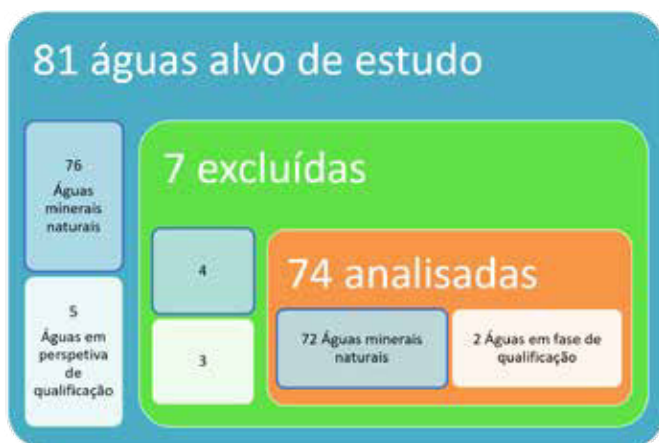


Figura 5 – Resumo do número de águas incluídas no projeto Hidrogenoma.

Para a realização deste projeto foi estabelecida uma parceria com o Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV, I.P.) e com a empresa Synege. O INIAV, I.P. é a entidade a quem foi adjudicada a realização das análises de metagenómica, constituindo um parceiro fundamental para o bom sucesso do projeto, desde a fase de amostragem, até à obtenção dos resultados. A Synege, uma empresa especializada

em projetos nas áreas da engenharia, geologia e energia, participou na análise dos modelos hidrogeológicos conceptuais, na caracterização hidrogeoquímica de cada AMN e numa primeira abordagem às realções entre hidroquimismo e microbismo através de análise estatística univariada e bivariada.

No âmbito do projeto, estas águas foram, pela primeira vez, caracterizadas ao nível da sua composição microbiana recorrendo a técnicas de biologia molecular e bioinformática, utilizando a metagenómica como abordagem de estudo. Esta técnica permitiu, para cada AMN estudada, a determinação da biodiversidade microbiana, a identificação comparativa das comunidades presentes, a deteção de microrganismos exclusivos como código hidrobiómico, assim como o isolamento e caracterização dos microrganismos viáveis, encarando estes sistemas aquíferos como unidades biológicas dinâmicas, na perspectiva de elucidar sobre a potencial bioatividade destes microrganismos a partir do material genético e deduzir possíveis aplicações futuras.

Trata-se de um projeto pioneiro, não só pela sua dimensão, pela importância e amplitude da amostragem e pela originalidade do método na medida em que o genoma destas águas é estudado sem exemplos ou modelos antecedentes, como também pelo objetivo ambicioso de caracterizar todas as AMN e averiguar a sua diversidade microbiana que representa um reservatório inexplorado de novos genes e vias metabólicas que podem desempenhar um papel fundamental na saúde ambiental e humana, bem como noutras aplicações de interesse económico.

OS OBJETIVOS DO PROJETO



HIDROGENOMA

O objetivo principal consistiu no conhecimento do microbismo natural das AMN, do ponto de vista estrutural, com o estudo da composição taxonômica das comunidades microbianas identificadas, através da análise metagenômica do microbioma destas águas. Com esta abordagem são apresentados os microrganismos representativos de cada AMN, por comparação da composição taxonômica das amostras recolhidas em duas épocas de dois anos sucessivos, para avaliação da diversidade microbiana, assim como dos microrganismos viáveis isolados e caracterizados em laboratório.

Este estudo envolve uma componente de geologia e outra de biologia, numa perspetiva multidisciplinar que aproxima, de forma complementar, ambas as áreas. Na componente geologia iniciaram-se os estudos para demonstrar a interação rocha-água-microrganismos, por forma a desenvolver uma primeira hipótese de correlação entre a dinâmica dos microrganismos identificados, o quimismo das AMN e o meio geológico envolvente. Neste âmbito, cada AMN foi descrita de acordo com o enquadramento geológico, hidrogeológico e modelo conceptual do respetivo sistema aquífero, bem como caracterizada do ponto de vista físico-químico.

Na componente da biologia caracterizou-se o microbismo natural das AMN selecionadas, através da identificação dos microrganismos representativos das comunidades microbianas destas águas, de modo a correlacionar os resultados obtidos com as características físico-químicas de cada água. Foi quantificada a diversidade microbiana, através do índice de diversidade de Shannon-Wiener (Shannon, C.E. e Weaver, W., 1949) e demonstrada a distribuição comparativa, por grupo taxonómico, dos microrganismos que compõem as comunidades microbianas em cada AMN, tendo em vista o propósito de relacionar também o microbismo natural com as indicações terapêuticas já conhecidas, através do estudo dos transcriptomas.

Por pesquisa bibliográfica, foi reunida informação sobre a atividade metabólica indicativa das espécies mais representativas do bacteroma destas águas, de modo a obter informação adicional sobre as possíveis funcionalidades destas populações microbianas, a qual precisa ser validada e complementada com estudos suplementares. A caracterização edafoclimática da área envolvente de cada AMN foi efetuada para avaliar as condições do meio envolvente que possam interferir com os resultados obtidos para estas águas.

A METODOLOGIA E OS RESULTADOS

O estudo para a caracterização do microbismo, consistiu num conjunto de etapas, previamente delineadas, que decorreram ao longo de cerca de dois anos e meio. A colheita de amostras das AMN, à boca da captação, foi repetida em 4 fases, denominadas F1, F3, F5 e F7, intercaladas por outras 4 fases de análise genómica subsequente, designadas por F2, F4, F6 e F8, perfazendo um total de 8 fases organizadas em 4 parcelares distintos, com a seguinte sequência:

- 1º parcelar:** F1 e F2
- 2º parcelar:** F3 e F4
- 3º parcelar:** F5 e F6
- 4º parcelar:** F7 e F8

A colheita das amostras foi planeada de modo a abranger duas épocas do ano distintas – a primavera (F1-F5) e o outono (F3-F7) – durante os anos hidrológicos de 2017 e 2018, como demonstrado na Figura 6.

A colheita de cerca de 300 amostras foi realizada, de acordo com as indicações estabelecidas pela DGEG, nas captações enumeradas na Tabela 1, para as quais foram avaliadas as condições em que as mesmas se encontravam, à medida que os trabalhos decorriam.

Todas as amostras recolhidas foram sujeitas a um controlo de qualidade, de acordo com os parâmetros estabelecidos

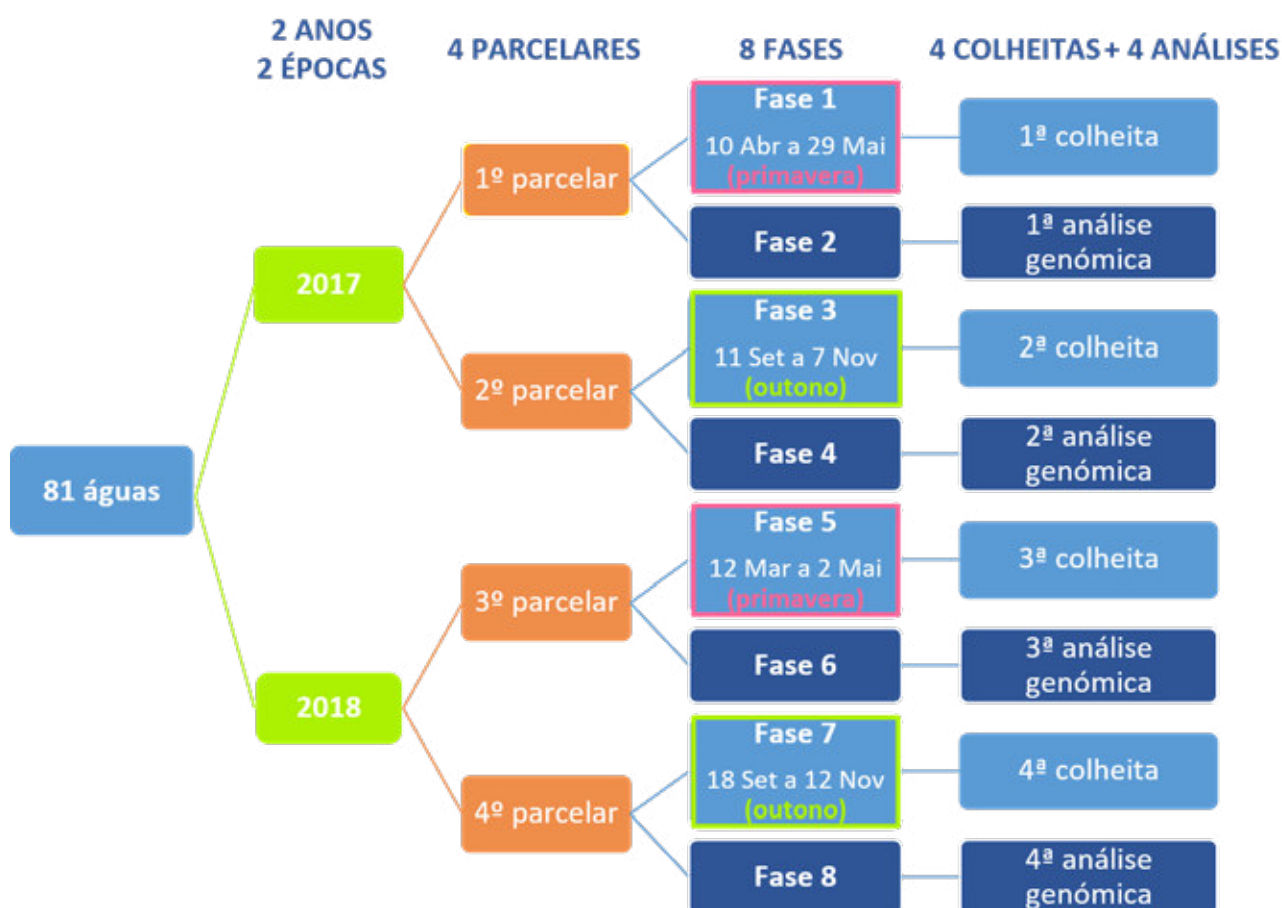


Figura 6 – As diferentes fases do Projeto Hidrogenoma e organização parcelar, ao longo dos anos 2017 e 2018.

no Decreto-Lei n.º 156/98, de 6 de junho, e na Portaria n.º 1220/2000, de 29 de dezembro. Nesta etapa foi realizada a contagem do número de colónias viáveis, posteriormente isoladas e caracterizadas ao nível da sua morfologia (forma e arranjo, cor e tamanho) e aplicando testes bioquímicos (catalase, oxidase, teste KOH) para a sua identificação. Por fim, foram identificados os microrganismos viáveis provenientes das águas em estudo, organizados em grupos representativos, com particularidades semelhantes entre si, validados por sequenciação de Sanger (F.Sanger, *et al.*, 1977).

Nas amostras que passaram no controlo de qualidade antecedente, foi extraído o ADN e quantificado, avaliando estatisticamente (recorrendo ao *software* IBM SPSS) se as variáveis - quimismo, temperatura de emergência e pH - interferiam no rendimento do material genético obtido e permitindo a

programação das condições para a análise genómica seguinte.

De seguida, foram preparadas as bibliotecas de sequências metagenómicas de ADN, utilizando a metodologia *amplicon sequencing*, que permite amplificar fragmentos de interesse com marcadores moleculares fluorescentes que marcam os nucleótidos e, dessa forma, possibilitam o estudo da biodiversidade microbiana e da estrutura populacional. Nesta etapa foram produzidas bibliotecas específicas por grupo de microrganismos a estudar. O genoma das AMN em estudo foi analisado, usando o sistema MiSeq da Illumina que integra uma plataforma de sequenciação de nova geração, incluindo a análise de dados integrada realizada no *software* BaseSpace Sequence Hub (www.illumina.com/basespace), especializada na qualidade e quantidade de informação biológica gerada com ferramentas intuitivas (Figura 7).



Figura 7 – Esquema representativo do procedimento de NGS e respetivas etapas a partir da recolha de amostras.

Neste sistema, as sequências produzidas (*reads*) são limpas e alinhadas para a produção de sequências mais longas que, mais facilmente, são anotadas sem ambiguidades. É aplicado o *pipeline* de análise metagenômica, tendo em consideração a determinação da abundância, o tamanho dos fragmentos, os erros, as repetições e locais de ligação incorretos. Após este processamento, as sequências produzidas são automaticamente comparadas com as sequências armazenadas e disponíveis em bases de dados e bibliotecas metagenômicas públicas, determinando assim as afiliações taxonômicas possíveis com a informação disponível, a diversidade e a estrutura dos hidrogenomas respetivos.

Desta forma, com o tratamento de resultados gerados por NGS é identificada a estrutura

representativa das comunidades microbianas de cada uma das AMN, por caracterização do respetivo hidrogenoma, validada por análise comparativa dos resultados provenientes das várias fases deste estudo (F2, F4, F6 e F8). Os resultados de afiliação taxonómica são apresentados através da percentagem de *reads* (sequências) validadas, evidenciando as diferenças de designação, de acordo com as características destas AMN, nomeadamente o quimismo, a temperatura de emergência, o pH e a localização.

A afiliação ao nível de espécie, essencial para definir o código hidrobiómico destas águas, tem tendência para aumentar com o número de amostras analisadas. Verifica-se que estes resultados são muito variáveis, perceptível pela diferença entre o valor máximo e o mínimo obtidos em cada uma das fases de análise (Figura 8).

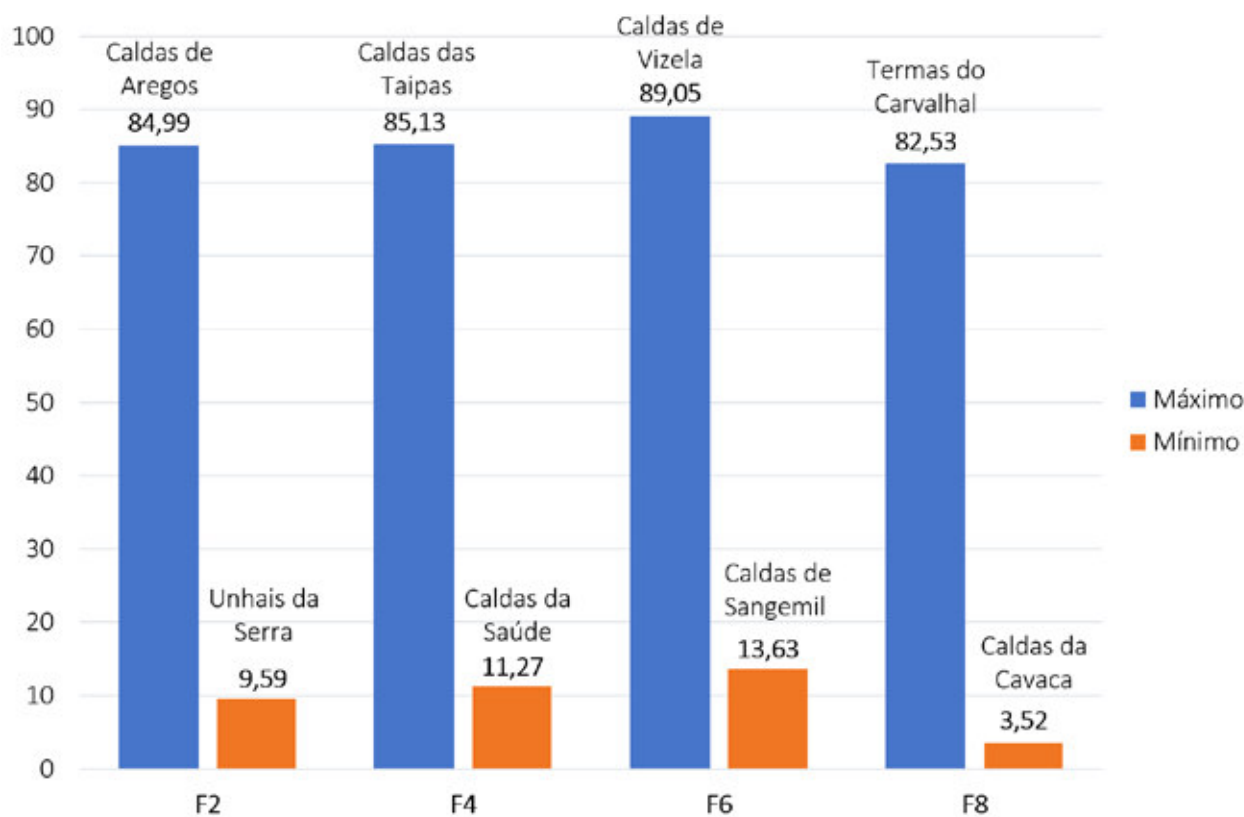


Figura 8 - Resultados da afiliação ao nível de espécie: % de *reads* validadas (valor máximo e mínimo) por fase de análise genómica (F2, F4, F6 e F8).

Tendo em conta que este estudo é pioneiro, tanto pela sua abrangência, como pelo tipo de amostras (AMN), o sucesso da afiliação ao nível da espécie depende da existência de informação compatível com a das bases de dados existentes (GenBanks), que disponibilizam publicamente sequências de mais de 250 mil espécies. Contudo, frequentemente não se obtém atribuição para muitos dos microrganismos sequenciados, uma vez que as sequências que os caracterizam não foram ainda estudadas e depositadas nestas bases de dados. Consequentemente, a microbiota das AMN sem atribuição taxonómica são novos contributos para o aumento do conhecimento nesta área e para a introdução de novas espécies de bactérias que podem levar à descoberta de novos genes. Por sua vez, a determinação da afiliação ao nível da espécie para as águas incluídas neste estudo, distinguindo aquelas que são exclusivas em certas águas, é um dos desafios deste projeto.

Das 74 AMN caracterizadas, foram identificadas espécies exclusivas em 28 águas. Destas, 10 apresentam hidrogenoma consolidado: Caldas de Chaves, Corgas Largas, Areal, Piedade, Caldas do Cró, Termas do Vale da Mó, Água do Fastio, Água Santas do Vimeiro (Fonte dos Frades), Termas Salgadas da Batalha e Termas de S. Miguel, entre as quais foram identificadas 28 espécies exclusivas. Para as restantes 18 AMN, denominadas Fadagosa de Nisa, Água de Grichões, Luso, Caldas e Fonte Santa, Pisões-Moura, Caldas Santas de Carvalhelhos, Caldas de Monção, Termas do Carvalhal, Fonte Santa de Monfortinho, Águas de Vilarelho, São Silvestre, Termas de Moura, Caldas das Murtas, Corgas-Buçaco, Caldas de Vizela, Águas de Tarouca, Termas do Bicanho e Caldas de

São Paulo, o hidrogenoma não foi validado estatisticamente, tendo sido identificadas 46 espécies exclusivas.

Pela primeira vez, foi também efetuado o estudo de transcriptomas, através da extração do ARN das amostras de AMN recolhidas, para comprovar algumas das indicações terapêuticas com base nos dados da atividade biológica indicativa dos genes expressos (ORFs), para os quais se obteve maior número de cópias e cujos transcritos estão registados. Esta análise baseia-se no princípio de que o ARN mensageiro (ARNm) corresponde a uma dada sequência de nucleótidos que, por sua vez, se traduz numa sequência de aminoácidos específica, que constitui uma dada proteína num processo celular designado por tradução. Tecnicamente são preparadas bibliotecas de ADN complementar sintetizado a partir do ARNm extraído das amostras, de maneira a gerar dados de transcriptómica por sequenciação do ARN e detetar as leituras biologicamente ativas. Foram estudados 4 transcriptomas correspondentes a 4 AMN, respetivamente do tipo hipossalina, sulfúrea, bicarbonatada e gasocarbónica, com hidrogenoma consolidado e indicações terapêuticas conhecidas.

Os resultados da atividade biológica indicativa, obtidos pela análise dos transcritos provenientes destas águas, estão resumidos na Figura 9, juntamente com as indicações terapêuticas respetivas, atualmente conhecidas. Foi criado um modelo válido para o estudo do transcriptoma das AMN com critérios definidos, por forma a que se possa estender este estudo a todas as águas. Contudo, é necessário ter em conta de que se as AMN forem consideradas um fármaco

com determinadas indicações terapêuticas, é necessário estudar a variação genética entre diferentes indivíduos e as suas respostas à ação ou efeito de cada AMN, ou seja, realizar

estudos de farmacogenómica (M Whirl-Carrillo, *et al.*, 2013) que poderão conduzir a resultados que associem algumas das propriedades destas AMN.

Tipo de água: BICARBONATADA	
Indicações terapêuticas	Atividade biológica indicativa (transcritos)
<ul style="list-style-type: none"> Doenças reumáticas e músculo-esqueléticas Doenças da pele Doenças metabólico-endócrinas Doenças do aparelho digestivo Doenças do aparelho circulatório Doenças ginecológicas Doenças do sistema nervoso 	<ul style="list-style-type: none"> Atividade de biorremediação Atividade antifúngica Atividade sulfidogénica (redução de sulfato e outros compostos de enxofre) Compostos bioativos ligados a certos benefícios para a saúde: aumento da longevidade, melhor utilização da energia e proteção contra espécies reativas de oxigénio (atividade antioxidante) (Winyoo Chohanadisai, <i>et al.</i>, 2010)
Tipo de água: SULFÚREA	
Indicações terapêuticas	Atividade biológica indicativa (transcritos)
<ul style="list-style-type: none"> Doenças do aparelho respiratório Doenças reumáticas e músculo-esqueléticas 	<ul style="list-style-type: none"> Bacteriocinas com atividade antimicrobiana, úteis no desenvolvimento de antibióticos Metabolização do enxofre (vias biosintéticas de oxidação/redução) Quino-hemoproteína ADH com potencial de oxirredução
Tipo de água: GASOCARBÓNICA	
Indicações terapêuticas	Atividade biológica indicativa (transcritos)
<ul style="list-style-type: none"> Doenças do aparelho respiratório Doenças reumáticas e músculo-esqueléticas Doenças metabólico-endócrinas Doenças do aparelho digestivo 	<ul style="list-style-type: none"> Compostos bioativos ligados a certos benefícios para a saúde: aumento da longevidade, melhor utilização da energia e proteção contra espécies reativas de oxigénio (atividade antioxidante) (Winyoo Chohanadisai, <i>et al.</i>, 2010). Produção de pigmentos (carotenoides) Proteínas associadas à produção de exopolissacarídeos (EPS) e etanol
Tipo de água: HIPOSSALINA	
	Atividade biológica indicativa (transcritos)
	<ul style="list-style-type: none"> Proteínas com atividade citotóxica e com efeitos antimicrobianos Proteínas associadas à fixação de azoto atmosférico Atividade antienvhecimento (chaperoninas) Reguladores da apoptose (mecanismos de morte celular) Reguladores da homeostase do oxalato, mecanismo associado ao tratamento de doenças renais (prevenção de pedras nos rins)

Figura 9 – Resultados obtidos no estudo dos transcriptomas das AMN.

Os dados da metagenómica obtidos para as 74 AMN caracterizadas neste projeto, foram também analisados por quimismo, de acordo com a composição físico-química (Figura 10) e a respetiva classificação (Tabela 2). A forma como as AMN foram classificadas deve ser considerada como uma tentativa de as agrupar, pois considera-se que estabelecer critérios que levem a uma classificação das AMN é uma tarefa difícil e complexa. (Manuela Simões, 1993, B.M.). A análise teve como objetivo revelar tendências entre os grupos-tipo, relacionando os atributos físico-químicos

com o microbismo natural das AMN de cada grupo. Verificou-se que, tal como esperado, a caracterização das comunidades bacterianas das AMN varia de acordo com o quimismo das mesmas, demonstrando que a composição hidroquímica influencia a estrutura destas comunidades e a respetiva diversidade microbiana. De uma forma geral, a diversidade global de géneros e espécies mais significativos (valores superiores a 1000 hits) das bactérias identificadas nestas águas indica que a composição do microbismo se modifica naturalmente com o tipo de água (Tabela 3).

SULFÚREAS n=33		BICARBONATADAS n=17		HIPOSSALINAS n=9	
HM-01	Felgueira	HM-06	Caldas de Monchique	HM-04	Água de Grichões
HM-02	Fadagosa de Nisa	HM-17	Pisões-Moura	HM-07	Luso
HM-03	Fonte Santa de Almeida	HM-31	Caldas do Gerês	HM-20	Ribeirinho e Fazenda do Arco
HM-08	Caldas e Fonte Santa	HM-37	Caldas Santas de Carvalhelhos	HM-22	Caldas de Penacova
HM-11	Caldas da Cavaca	HM-47	Termas do Vale da Mó	HM-25	Corgas Largas
HM-12	Termas do Monte da Pedra	HM-54	São Silvestre	HM-27	Ladeira de Envendos
HM-13	Caldas de Sangemil	HM-58	Águas Santas do Vimeiro (Fonte Santa Isabel)	HM-45	Fonte Santa de Monfortinho
HM-14	Caldas da Rainha	HM-60	Termas de Moura	HM-56	Água do Fastio
HM-18	Unhais da Serra	HM-63	Corgas-Buçaco	HM-74	Águas de Tarouca
HM-21	Caldas do Carlão	HM-69	Granjal	CLORETADAS / SULFATADAS n=5	
HM-23	Entre-os-rios (Quinta da Torre)	HM-71	Termas de São Miguel	HM-15	Termas do Estoril
HM-24	Caldas de Aregos	HM-72	Vilar de Mouros	HM-34	Piedade
HM-32	Caldas de Moledo	HM-73	Termas de São Tiago	HM-58	Águas Santas do Vimeiro (Fonte dos Frades)
HM-33	Termas de São Pedro do Sul	HM-75	Termas do Bicanho	HM-65	Termas Salgadas da Batalha
HM-35	Caldas de S. Jorge	HM-76	Healsi	MIN-57	Curia
HM-36	Termas da Sulfúrea	MIN-06	Caldelas		
HM-40	Caldas de Monção	HMP-31	Fontainhas		
HM-41	Termas de S. Vicente	GASOCARBÓNICAS n=10			
HM-43	Termas do Carvalhal	HM-05	Águas de Bem Saúde		
HM-44	Caldas da Saúde	HM-09	Caldas de Chaves		
HM-46	Caldas do Cró	HM-16	Água Campilho		
HM-49	Banho de Alcafache	HM-26	Melgaço		
HM-52	Termas do Eirogo	HM-28	Pedras Salgadas		
HM-53	Longroiva	HM-29	Vidago		
HM-55	Caldas de S. Lourenço	HM-30	Areal		
HM-59	Caldas das Taipas	HM-39	Águas de Sandim		
HM-62	Caldas das Murtas	HM-48	Águas de Vilarelho		
HM-64	Termas da Moimenta	HM-77	Cardal		
HM-66	Termas da Terronha				
HM-67	Termas das Águas				
HM-68	Caldas de Vizela				
HM-70	Termas das Gaeiras				
HMP-33	Caldas de São Paulo				

Figura 10 - AMN por tipo de água: bicarbonatadas, sulfúreas, hipossalinas, cloretadas/sulfatadas e gasocarbónicas.

Tabela 1 - Listagem das AMN contempladas no projeto, as captações selecionadas e a indicação das fases e colheitas de amostras realizadas.

Nº Cadastro	Denominação	Captação	75 colheitas	73 colheitas	73 colheitas	75 colheitas
			Fase 1 1ª colheita	Fase 3 2ª colheita	Fase 5 3ª colheita	Fase 7 4ª colheita
HM-01	Felgueira	AC3	abr/17	out/17	abr/18	out/18
HM-02	Fadagosa de Nisa	ACP4	Sem condições de assepsia	set/17	abr/18	set/18
HM-03	Fonte Santa de Almeida	AQ1	mai/17	set/17	abr/18	set/18
HM-04	Águas de Grichões	Salutis	abr/17	out/17	mai/18	out/18
HM-05	Águas Bem saúde	FRIZE 7	mai/17	nov/17	mar/18	nov/18
HM-06	Caldas de Monchique	CHIC	mai/17	out/17	abr/18	out/18
HM-07	Luso	1L	abr/17	set/17	mar/18	out/18
HM-08	Caldas e Fonte Santa	AC2	mai/17	nov/17	mar/18	nov/18
HM-09	Caldas de Chaves	AC2	abr/17	set/17	abr/18	out/18
HM-11	Caldas da Cavaca	Cavaca 3	mai/17	Não cumpriu parâmetros qualidade previamente definidos	mar/18	nov/18
HM-12	Termas do Monte da Pedra	JK4	mai/17	set/17	abr/18	set/18
HM-13	Caldas de Sangemil	HDN1	abr/17	out/17	abr/18	out/18
HM-14	Caldas da Rainha	JK1	abr/17	set/17	abr/18	set/18
HM-15	Termas do Estoril	AC5/ AC3A	mai/17	Não cumpriu parâmetros qualidade previamente definidos	Alteração captação AC3A	Alteração captação AC5
HM-16	Água Campilho	Campilho 1	mai/17	set/17	abr/18	out/18
HM-17	Pisões-Moura	Castello 3	mai/17	out/17	abr/18	out/18
HM-18	Unhais da Serra	ACP1/US1	mai/17	Alteração captação US1	mar/18	nov/18
HM-20	Ribeirinho e Fazenda do Arco	Vitalis III	mai/17	set/17	abr/18	set/18
HM-21	Caldas do Carlão	AM2	mai/17	nov/17	mar/18	nov/18
HM-22	Caldas de Penacova	CP3	abr/17	set/17	mar/18	out/18
HM-23	Entre-os-rios (Quinta da Torre)	Barbeitos	mai/17	out/17	Não cumpriu parâmetros qualidade previamente definidos	out/18
HM-24	Caldas de Aregos	AC1	mai/17	set/17	mar/18	out/18
HM-25	Corgas Largas	Fonte da Lua 1	mai/17	nov/17	mar/18	nov/18
HM-26	Melgaço	Melgaço 2	abr/17	out/17	mai/18	out/18
HM-27	Ladeira de Envendos	Vital 3	mai/17	set/17	abr/18	set/18
HM-28	Pedras Salgadas	Pedras Salgadas 25	abr/17	set/17	abr/18	out/18
HM-29	Vidago	Vidago 20	abr/17	set/17	abr/18	out/18
HM-30	Areal	Vidago A3	abr/17	set/17	abr/18	out/18
HM-31	Caldas do Gerês	Forte	mai/17	out/17	abr/18	out/18
HM-32	Caldas de Moledo	AC1	mai/17	set/17	mar/18	nov/18
HM-33	Termas de São Pedro do Sul	AC1	mai/17	out/17	abr/18	out/18
HM-34	Piedade	SB1	abr/17	set/17	abr/18	set/18
HM-35	Caldas de S. Jorge	SJ1	mai/17	out/17	abr/18	out/18
HM-36	Termas da Sulfúrea	Sulfúrea II	mai/17	set/17	abr/18	set/18
HM-37	Caldas Santas de Carvalhelhos	Carvalhelhos 1 (Fonte Lucy)	abr/17	set/17	abr/18	out/18
HM-38	Termas do Vale dos Cucos	Nascente 1	Não cumpriu parâmetros qualidade previamente definidos	Caudal insuficiente	Não cumpriu parâmetros qualidade previamente definidos	Excluída do projeto
HM-39	Águas de Sandim	AC2	abr/17	nov/17	Acesso condicionado	out/18
HM-40	Caldas de Monção	G01	abr/17	out/17	mai/18	out/18
HM-41	Termas de S. Vicente	Santo Agostinho	mai/17	out/17	abr/18	out/18
HM-42	Termas de Monte Real	–	–	–	Excluída do projeto	
HM-43	Termas do Carvalhal	AC-G1	mai/17	set/17	mar/18	nov/18
HM-44	Caldas da Saúde	AC1A	mai/17	set/17	Não cumpriu parâmetros qualidade previamente definidos	out/18
HM-45	Fonte Santa de Monfortinho	AC7	mai/17	set/17	abr/18	set/18
HM-46	Caldas do Cró	ACP2	mai/17	set/17	abr/18	set/18

Nº Cadastro	Denominação	Captação	75 colheitas	73 colheitas	73 colheitas	75 colheitas
			Fase 1 1ª colheita	Fase 3 2ª colheita	Fase 5 3ª colheita	Fase 7 4ª colheita
HM-47	Termas do Vale da Mó	SL-01	abr/17	set/17	mar/18	out/18
HM-48	Águas de Vilarelho	ACP1-F3	Sem condições de assepsia	Alteração captação ACP1-F3	abr/18	out/18
HM-49	Banho de Alcafache	AC1	abr/17	out/17	abr/18	out/18
HM-50	Caldas de Canaveses	Nascente	Sem condições de assepsia	Caudal insuficiente	Excluída do projeto	
HM-52	Termas do Eirogo	Castanheirinhos	mai/17	set/17	abr/18	out/18
HM-53	Longroiva	AC1-A	mai/17	set/17	mar/18	set/18
HM-54	São Silvestre	São Silvestre 2	abr/17	set/17	abr/18	set/18
HM-55	Caldas de S. Lourenço	AC1	mai/17	nov/17	mar/18	nov/18
HM-56	Água do Fastio	N.º Sr.ª Fastio	mai/17	out/17	abr/18	out/18
HM-58	Águas Santas do Vimeiro (Fonte dos Frades)	Fonte Frades 7	Não cumpriu parâmetros qualidade previamente definidos	out/17	abr/18	set/18
HM-58	Águas Santas do Vimeiro (Fonte Santa Isabel)	EAV9	abr/17	out/17	abr/18	set/18
HM-59	Caldas das Taipas	AC-P2	mai/17	set/17	Não cumpriu parâmetros qualidade previamente definidos	out/18
HM-60	Termas de Moura	SD3Bicas1	Sem condições de assepsia	Não cumpriu parâmetros qualidade previamente definidos	abr/18	out/18
HM-61	Água de Cambres	–	–	–	Excluída do projeto	
HM-62	Caldas das Murtas	AC3	mai/17	set/17	mar/18	out/18
HM-63	Corgas-Buçaco	AM-3	abr/17	set/17	mar/18	out/18
HM-64	Termas da Moimenta	AMB1	mai/17	out/17	abr/18	out/18
HM-65	Termas Salgadas da Batalha	SL4	abr/17	set/17	abr/18	set/18
HM-66	Termas da Terronha	AQ1	mai/17	nov/17	mar/18	nov/18
HM-67	Termas das Águas	AM4	mai/17	set/17	Não cumpriu parâmetros qualidade previamente definidos	set/18
HM-68	Caldas de Vizela	GO-01	mai/17	out/17	abr/18	out/18
HM-69	Granjal	AQ1	abr/17	set/17	mar/18	out/18
HM-70	Termas das Gaeiras	AQ4	abr/17	set/17	abr/18	set/18
HM-71	Termas de S. Miguel	F2	mai/17	nov/17	mar/18	nov/18
HM-72	Vilar de Mouros	MDJ3	abr/17	out/17	mai/18	out/18
HM-73	Termas de São Tiago	P1	mai/17	set/17	abr/18	set/18
HM-74	Águas de Tarouca	F5	mai/17	set/17	abr/18	nov/18
HM-75	Termas do Bicanho	SL4	mai/17	set/17	mar/18	out/18
HM-76	HEALSI	Healsi	–	Adicionada ao estudo	Não cumpriu parâmetros qualidade previamente definidos	set/18
HM-77	Cardal	FC1	mai/17	set/17	abr/18	out/18
MIN-06	Caldelas	AC6	mai/17	out/17	abr/18	out/18
MIN-57	Curia	AC-P2	abr/17	set/17	mar/18	out/18

ÁGUAS EM FASE E/OU PERSPETIVA DE QUALIFICAÇÃO						
HMP-25	Caldas de São Paulo	F1-CSP	mai/17	nov/17	mar/18	out/18
HMP-31	Fontainhas	Fontainhas 1	–	–	–	Adicionada ao estudo
–	Azenha	Sem designação	Sem condições de assepsia	Caudal insuficiente	Excluída do projeto	
–	Amieira	–	–	–	Excluída do projeto	
–	Alfama	–	–	–	Excluída do projeto	

Tabela 2 – Classificação das AMN de acordo com os parâmetros físico-químicos.

TEMPERATURA DE EMERGÊNCIA	
	T (°C)
Frias	< 20
Hipotermiais	≥20 e ≤ 25
Mesotermiais	> 25 a ≤ 35
Termais	> 35 a ≤ 40
Hipertermiais	> 40
MINERALIZAÇÃO TOTAL	
	Concentração (mg/L)
Hipossalinas	< 200
Fracamente mineralizadas	≥200 e <1000
Mesossalinas	≥1000 e <2000
Hipersalinas	≥ 2000
TIPO DE ÁGUA	
	Composição físico-química
Hipossalina	Há que diferenciar as águas que têm:
	- Mineralização total até cerca de 50 mg/L, pH < 6, dureza < 1 e % de sílica elevada (> 30%) - Mineralização total >100 mg/L, pH > 6, dureza > 1 e % de sílica muito mais baixa (< 30%)
Sulfúrea	Presença de formas reduzidas de enxofre ou ácido sulfídrico
	pH normalmente > 8,3
	Iões normalmente dominantes: HCO ₃ ⁻ e Na ⁺
	Presença de carbonatos: CO ₃ ²⁻
Gasocarbónica	Presença de silicatos
	Elevado teor em sílica e flúor
	Dureza muito baixa
	Teor em gás carbónico livre (CO ₂) > 250 mg/L
Bicarbonatada	Hipersalinas
	Iões normalmente dominantes: HCO ₃ ⁻ e Na ⁺
	Baixo teor em sílica e flúor
	Hipotermiais sódicas ou cálcicas: pH ≈ 6
Cloretada	Hipertermiais sódicas: pH ≈ 7
	Anião dominante: HCO ₃ ⁻
	Hipotermiais
	pH ≈ 7
Sulfatada	Muito baixo teor em sílica e flúor
	Cálcicas, fracamente mineralizadas
	Sódico-cálcicas, mesossalinas
	Anião dominante: Cl ⁻
Sódica	Muito baixo teor em sílica e flúor
	Mesotermiais
	Hipersalinas com pH ≈ 7
	Fracamente mineralizadas com pH > 7
Cálcica	Catião dominante: Ca ²⁺
	Hipersalinas e hipotermiais
	Muito baixo teor em sílica e flúor
	Catião dominante: Na ⁺
Magnesiana	Catião dominante: Ca ²⁺
	Catião dominante: Mg ²⁺
	Teor em flúor (F ⁻) > 1 mg/L
	Teor em ferro (Fe ²⁺) > 1 mg/L

Baseado em (Simões, M. Manuela Curto, 1993).

Tabela 3 - Diversidade de géneros e espécies de bactérias mais significativas (> 1000 hits) identificadas nas AMN.

Tipo de água: Gasocarbónicas (n=10)			Tipo de água: Cloretadas (n=4)			Tipo de água: Hipossalinas (n=9)			Tipo de água: Sulfúreas (n=33)			Tipo de água: Bicarbonatadas (n=17)		
Géneros/ Espécies	Nº Águas	%	Géneros/ Espécies	Nº Águas	%	Géneros/ Espécies	Nº Águas	%	Géneros/ Espécies	Nº Águas	%	Géneros/ Espécies	Nº Águas	%
<i>Rhodoferax</i>	4	40	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>	3	75	<i>Methylobacterium</i>	7	77,8	<i>Thermodesulfobivrio aggregans</i>	13	39,4	<i>Thermodesulfobivrio aggregans</i>	7	41,2
<i>Rhodoferax antarcticus</i>	4	40	<i>Desulfosarcina ovata</i>	2	50	<i>Oxalobacter vibrioformis</i>	5	55,6	<i>Thiovirga sulfuroxydans</i>	13	39,4	<i>Thermodesulfobivrio thiophilus</i>	6	35,3
<i>Acidovorax temperans</i>	3	30	<i>Methylobacterium</i>	2	50	<i>Azospirillum</i>	4	44,4	<i>Methyloversatilis universalis</i>	10	30,3	<i>Methyloversatilis universalis</i>	5	29,4
<i>Gallionella</i>	3	30	<i>Pseudomonas</i>	2	50	<i>Methylobacterium mesophilicum</i>	4	44,4	<i>Thiofaba</i>	10	30,3	<i>Azoarcus</i>	3	17,6
<i>Nitrosovibrio</i>	3	30	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	2	50	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>	4	44,4	<i>Sulfuritalea</i>	9	27,3	<i>Chondromyces pediculatus</i>	3	17,6
<i>Rhodoferax ferrireducens</i>	3	30	<i>Thermodesulfobivrio aggregans</i>	2	50	<i>Moorella glycerini</i>	4	44,4	<i>Sulfuricurvum kujiense</i>	8	24,2	<i>Dechloromonas</i>	3	17,6
<i>Thermodesulfobivrio aggregans</i>	3	30	<i>Thermodesulfobivrio thiophilus</i>	2	50	<i>Gallionella</i>	3	33,3	<i>Thiovirga</i>	7	21,2	<i>Dechloromonas hortensis</i>	3	17,6
<i>Burkholderia ubonensis</i>	2	20	<i>Acinetobacter oleivorans</i>	1	25	<i>Paucibacter</i>	3	33,3	<i>Denitratissoma oestradiolicum</i>	6	18,2	<i>Oxalobacter vibrioformis</i>	3	17,6
<i>Giesbergeria</i>	2	20	<i>Anaerospira</i>	1	25	<i>Pseudomonas</i>	3	33,3	<i>Sulfurospirillum</i>	6	18,2	<i>Sphingobium amniense</i>	3	17,6
<i>Methyloversatilis universalis</i>	2	20	<i>Aquabacterium</i>	1	25	<i>Thermodesulfobivrio thiophilus</i>	3	33,3	<i>Thiobacillus</i>	6	18,2	<i>Sphingomonas panni</i>	3	17,6
<i>Propionivibrio dicarboxylicus</i>	2	20	<i>Azoarcus evansii</i>	1	25	<i>Bradyrhizobium</i>	2	22,2	<i>Thiothrix</i>	6	18,2	<i>Thermodesulfatator atlanticus</i>	3	17,6
<i>Schlegelella aquatica</i>	2	20	<i>Azospira restricta</i>	1	25	<i>Burkholderia</i>	2	22,2	<i>Ectothiorhodospira imhoffii</i>	5	15,2	<i>Zoogloea resiniphila</i>	3	17,6
<i>Sulfuricurvum kujiense</i>	2	20	<i>Azovibrio</i>	1	25	<i>Burkholderia bryophila</i>	2	22,2	<i>Thermodesulfobivrio thiophilus</i>	5	15,2	<i>Candidatus Scalindua brodae</i>	2	11,8
<i>Sulfurospirillum</i>	2	20	<i>Bifidobacterium bombi</i>	1	25	<i>Candidatus Tammella caduceiae</i>	2	22,2	<i>Thermus</i>	5	15,2	<i>Chromatium weissei</i>	2	11,8
<i>Uliginosibacterium gangwonense</i>	2	20	<i>Blautia coccoides</i>	1	25	<i>Chondromyces pediculatus</i>	2	22,2	<i>Thiomonas intermedia</i>	5	15,2	<i>Desulfobulbus elongatus</i>	2	11,8
<i>Zoogloea oryzae</i>	2	20	<i>Chlorobaculum limnaeum</i>	1	25	<i>Cupriavidus basilensis</i>	2	22,2	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	4	12,1	<i>Gallionella</i>	2	11,8
<i>Bifidobacterium bombi</i>	1	10	<i>Chondromycespedic ulatus</i>	1	25	<i>Gallionella ferruginea</i>	2	22,2	<i>Acinetobacter tjernbergiae</i>	4	12,1	<i>Methylobacterium mesophilicum</i>	2	11,8
<i>Brachyspira ibaraki</i>	1	10	<i>Clostridium</i>	1	25	<i>Haliangium</i>	2	22,2	<i>Desulfomonile tiedjei</i>	4	12,1	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>	2	11,8

A análise efetuada por tipo de água, ao nível de classe, demonstra que Gammaproteobacteria é predominante, exceto nas AMN bicarbonatadas. Nas águas hipossalinas (Figura 11) as classes Gammaproteobacteria, Clostridia, Deltaproteobacteria, Betaproteobacteria, Alphaproteobacteria e Actinobacteria

predominam. Neste tipo de águas o número de espécies identificadas é mais elevado e não tem destaque na comunidade global, revelando características mais transversais que exercem menor pressão seletiva sobre as populações existentes, contribuindo, assim, para uma diversidade microbiana também mais elevada.

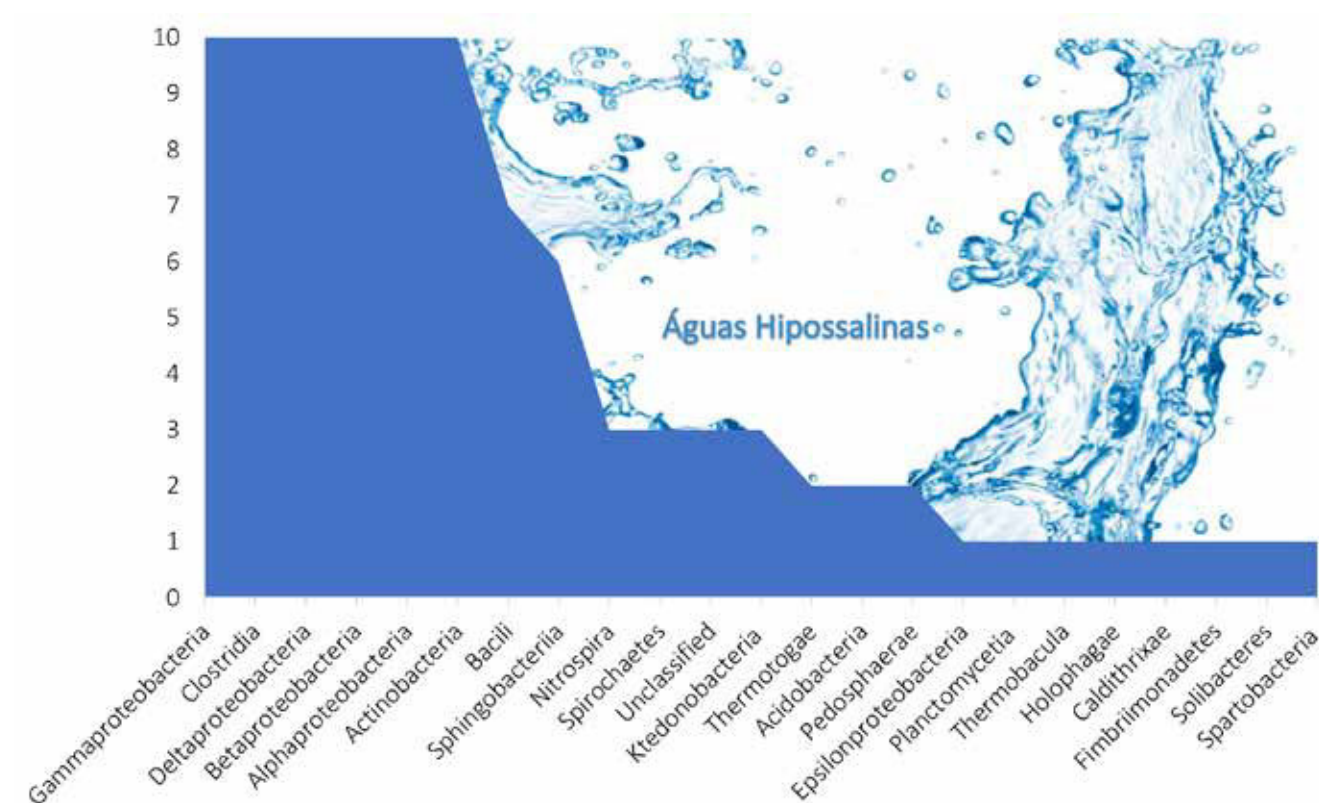


Figura 11 – Caracterização das comunidades bacterianas, ao nível de classe, das AMN hipossalinas.

Nas águas bicarbonatadas (Figura 12) as classes Clostridia, Deltaproteobacteria, Betaproteobacteria, Alphaproteobacteria, são igualmente dominantes, seguindo-se Nitrospira, Gammaproteobacteria e Actinobacteria. Estas águas reúnem

particularidades das águas do tipo hipossalinas e sulfúreas, nas quais os microrganismos com capacidade de utilizar compostos de enxofre têm também presença significativa.

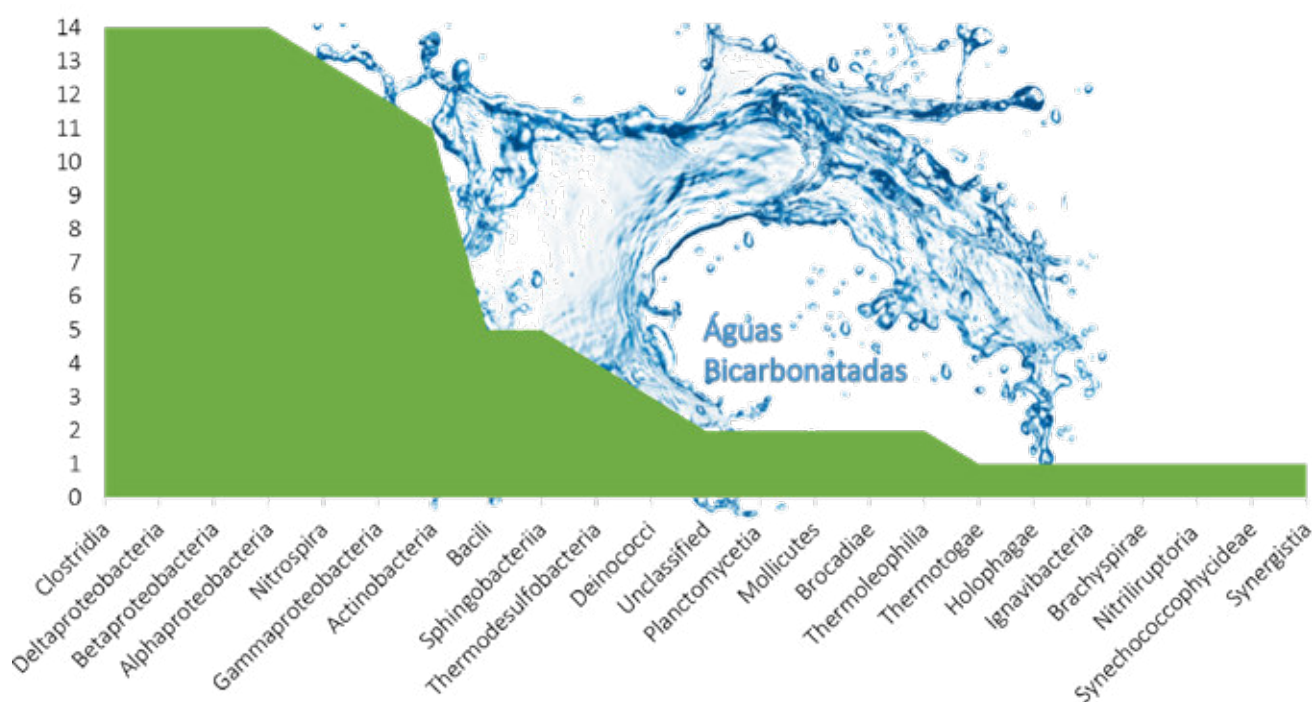


Figura 12 - Caracterização das comunidades bacterianas, ao nível de classe, das AMN bicarbonatadas.

As águas sulfúreas (Figura 13) apresentam uma composição bacteriana mais complexa, associada ao enxofre, o que proporciona uma maior seleção natural dos microrganismos que as compõem, destacando-se as espécies quimiolitotróficas, aptas a oxidar

compostos inorgânicos para obtenção de energia e metabolizar compostos deste elemento. As classes identificadas com maior expressão são Gammaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Alphaproteobacteria e Nitrospira.

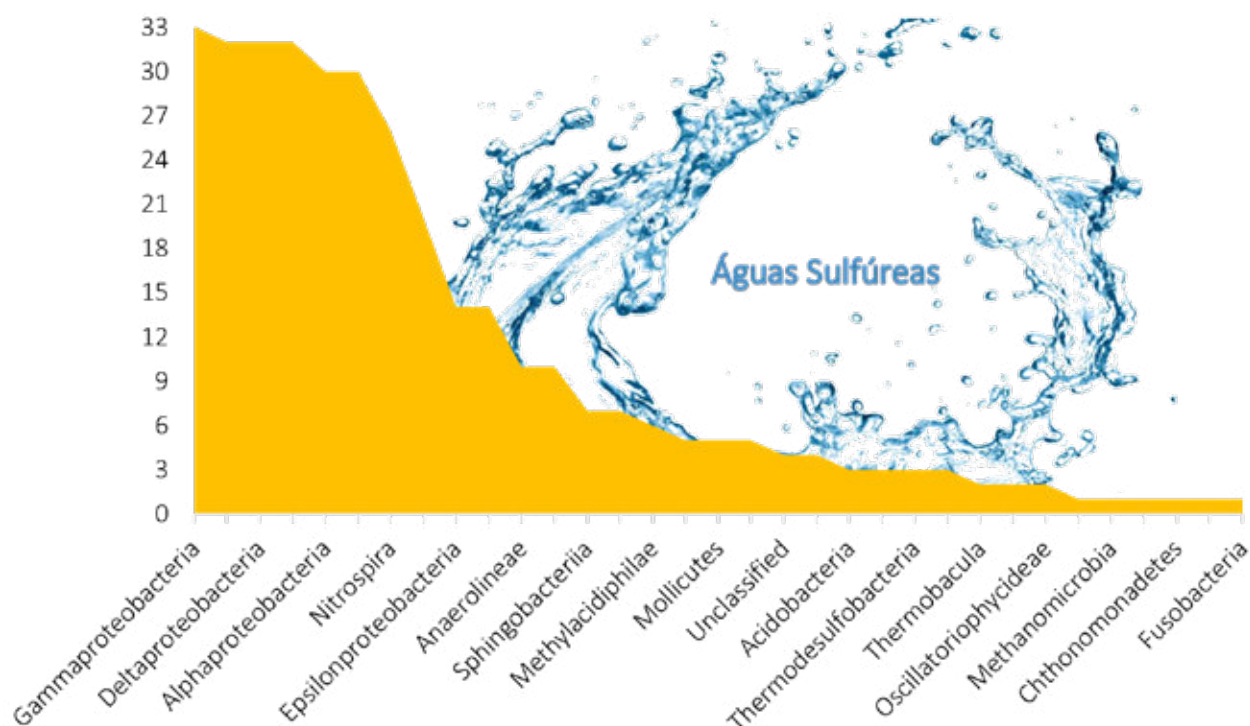


Figura 13 - Caracterização das comunidades bacterianas, ao nível de classe, das AMN sulfúreas.

Nas águas gasocarbônicas (Figura 14) as espécies de bactérias com maior expressão distinguem-se das identificadas nas restantes águas, apresentando uma distribuição mais uniforme de vários grupos bacterianos,

o que aponta para a adaptação destas comunidades a condições variáveis. Neste tipo de águas predominam as classes Gammaproteobacteria, Clostridia, Betaproteobacteria, Alphaproteobacteria, Deltaproteobacteria e Actinobacteria.

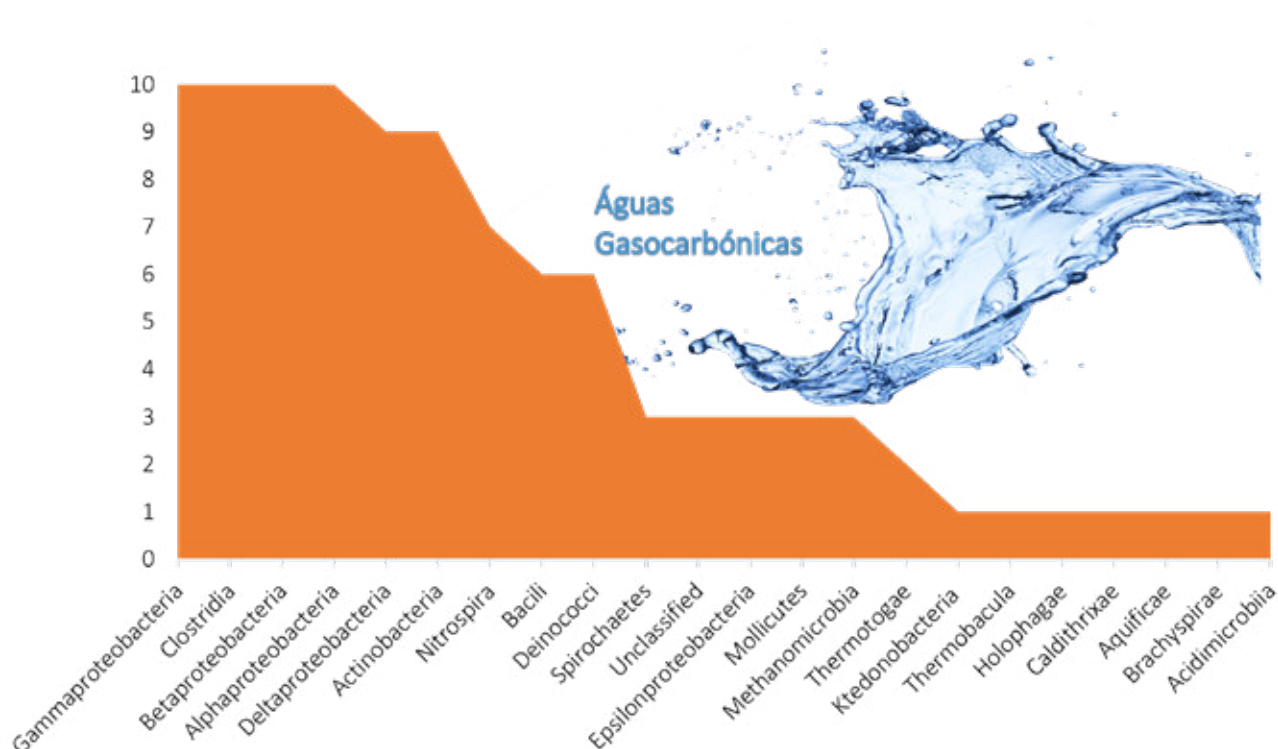


Figura 14 - Caracterização das comunidades bacterianas, ao nível de classe, das AMN gasocarbônicas.

Por último, as águas cloretadas (Figura 15) apresentam microrganismos resistentes a radiação gama (γ) (Green, P.N., *et al.*, 1983), assim como outros relacionados com a metabolização do

enxofre. Nestas águas destacam-se as classes Gammaproteobacteria, Clostridia, Deltaproteobacteria, Alphaproteobacteria, Actinobacteria e Nitrospira.

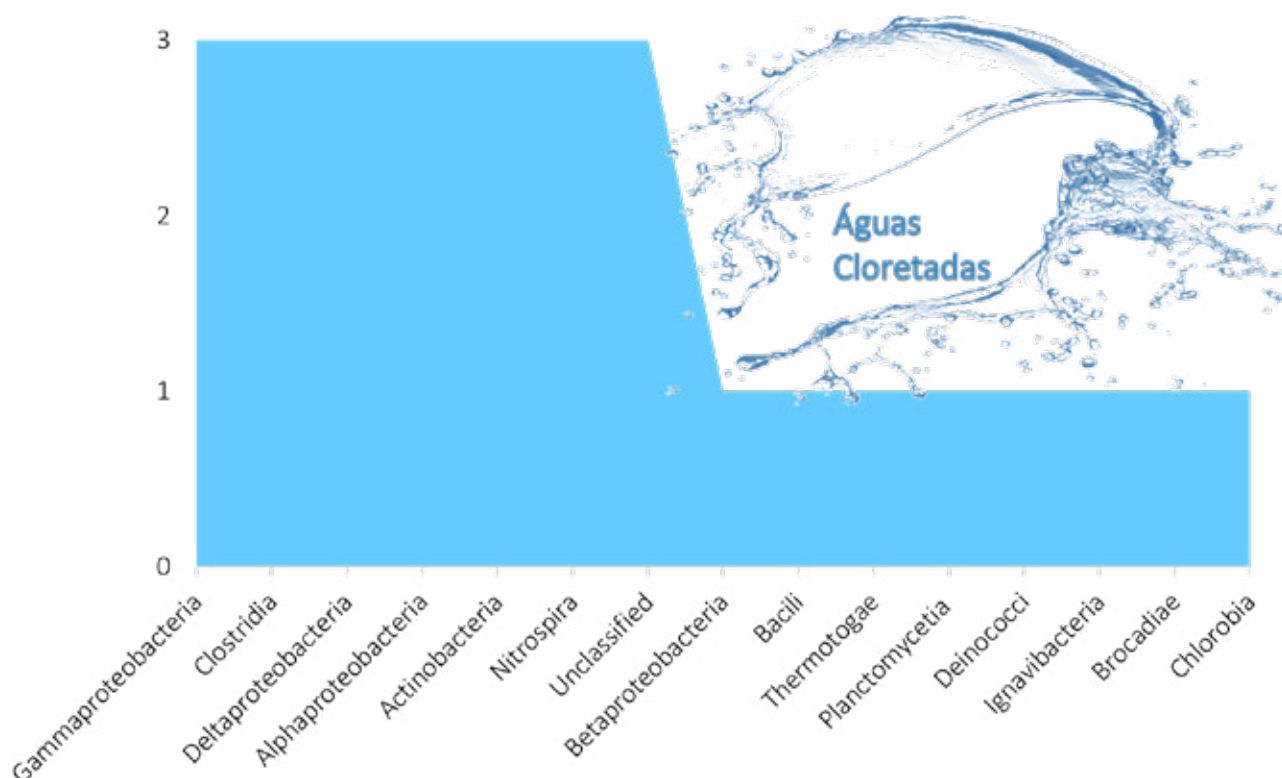


Figura 15 - Caracterização das comunidades bacterianas, ao nível de classe, das AMN cloretadas.

Pela avaliação da estabilidade dos valores do índice de diversidade e da estrutura das comunidades bacterianas identificadas nas amostras colhidas (F1, F3, F5 e F7) para cada uma das AMN, constatou-se que as águas cloretadas são as que apresentam com maior frequência

o hidrogenoma consolidado, ou seja, sem variabilidade genômica significativa, seguidas pelas águas bicarbonatadas, as sulfúreas, as gasocarbônicas e, por último, as hipossalinas que revelaram maior variação na diversidade de microrganismos (Figura 16).

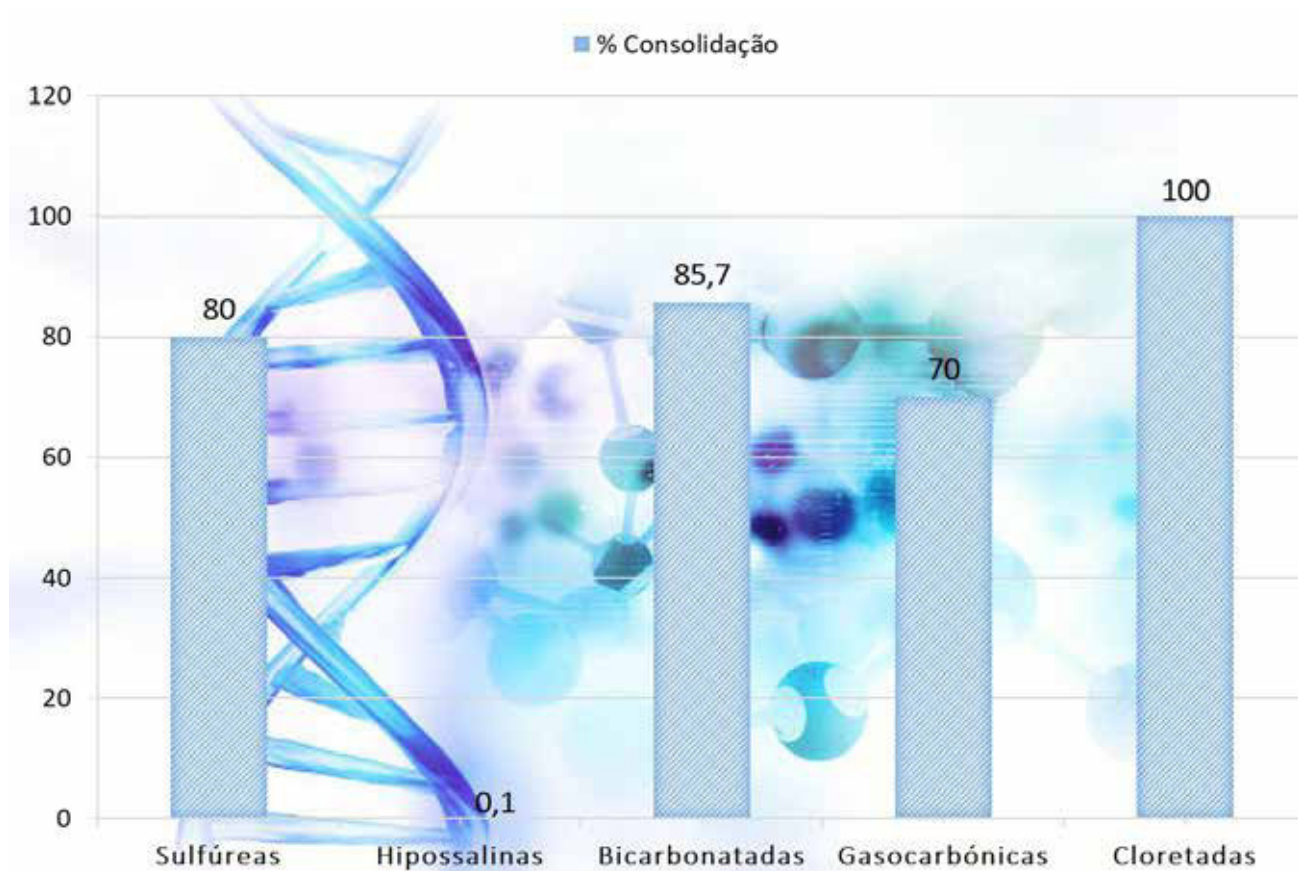


Figura 16 – Percentagem de hidrogenomas consolidados por tipo de AMN.

Não é de excluir que as condições climáticas durante o período de colheita das amostras ou outros fatores não conhecidos, possam

ter contribuído para a variação da diversidade de microrganismos, que frequentemente se verificou entre as amostras analisadas.

FICHAS DE CARACTERIZAÇÃO

No âmbito deste projeto, como resultado final, foi elaborada para cada uma das 74 AMN com resultados genómicos, uma ficha de caracterização individual (Figura 17), específica para a captação selecionada para este estudo (Tabela 1), que contempla as características gerais do recurso hidromineral, o seu enquadramento

geológico e hidrogeológico e, sempre que possível, o modelo conceptual do respetivo sistema aquífero. São igualmente apresentados os resultados do hidrogenoma de cada uma destas águas, com a caracterização preliminar do respetivo microbismo natural ao nível da sua estrutura.

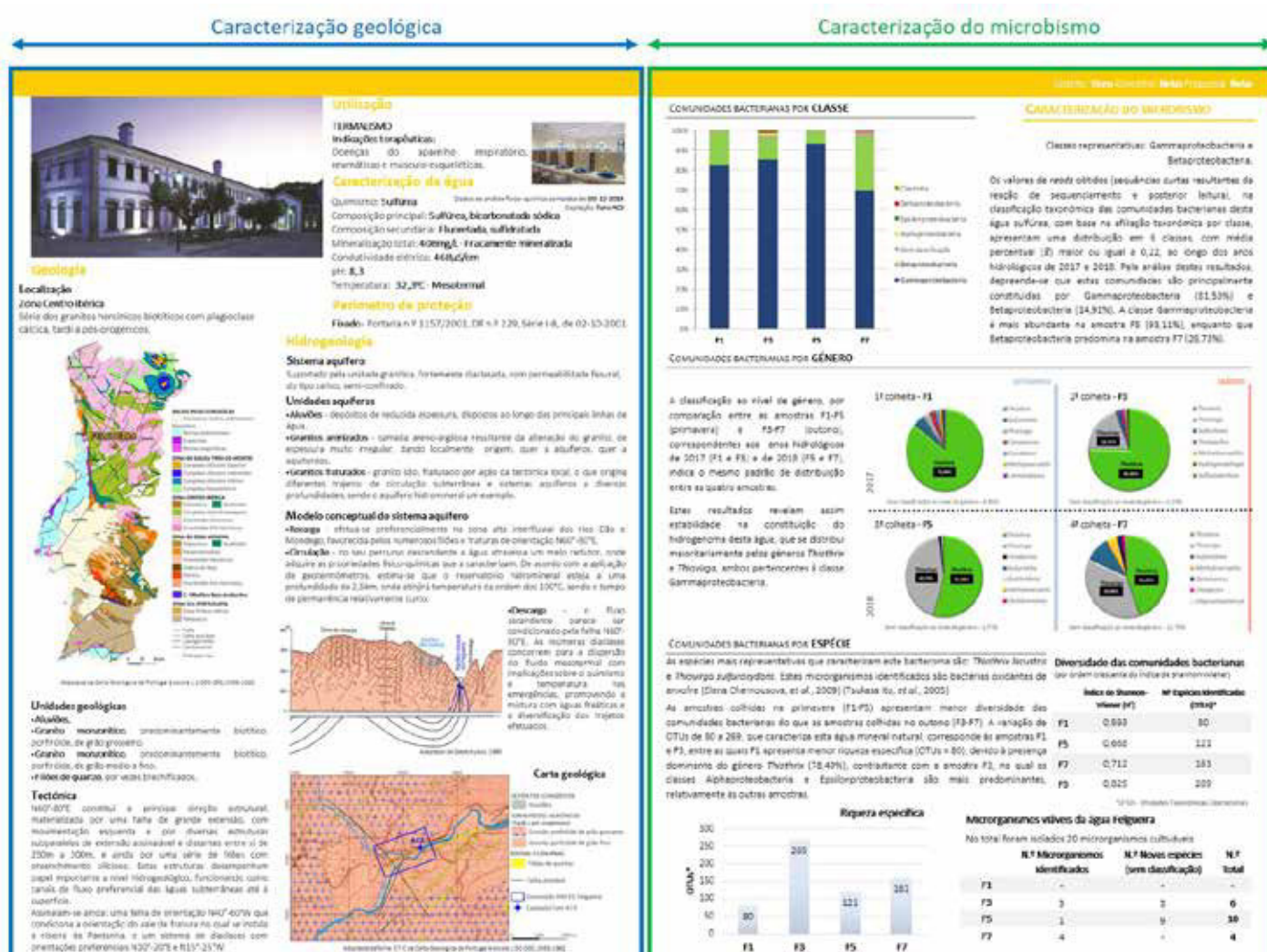


Figura 17 - Exemplo de uma ficha de caracterização de uma AMN com uma página para a geologia e outra para a microbiologia natural.

Estas fichas individuais estão organizadas segundo um código de cores personalizado, de acordo com a utilização de cada uma das AMN incluídas no projeto. As águas utilizadas apenas em **termalismo** apresentam a cor amarela, as que são aproveitadas para **engarrafamento** apresentam a cor azul e quando utilizadas para ambos os setores de atividade, o **termalismo** e o **engarrafamento**, exibem a cor verde. Por último, as águas com utilização conjunta em **termalismo** e **geotermia** são representadas com a cor vermelha.

Nas páginas pares destas fichas, pode-se encontrar a localização da concessão hidromineral sobre uma carta geológica adaptada da Carta Geológica de Portugal à escala 1:1.000.000, editada pelo Laboratório Nacional de Energia e Geologia (LNEG) em 2010, uma breve caracterização geológica da área envolvente de cada concessão de AMN, com uma descrição sumária de unidades geológicas e tectónica, e a apresentação de uma carta geológica. Todos os mapas apresentados estão projetados segundo o sistema de projeção oficial: PT-TM06/ETRS89. É ainda apresentada uma síntese hidrogeológica com uma apresentação resumida do sistema aquífero, unidades aquíferas e modelo conceptual do mesmo.

Compõem ainda as páginas pares, o tipo de utilização (termalismo, engarrafamento e geotermia) de cada AMN, a respetiva caracterização com base nos dados da

última análise físico-química completa realizada à captação selecionada e a referência à portaria que fixou o perímetro de proteção.

Por sua vez, a caracterização do microbismo natural é apresentada nas páginas ímpares e engloba a apresentação da composição comparativa das comunidades microbianas por grupo taxonómico (Classe, Género e Espécie) que caracterizam o hidrogenoma de cada AMN. A descrição das espécies representativas inclui uma breve referência, com base em pesquisa bibliográfica, da atividade metabólica indicativa desses mesmos microrganismos. É avaliada a diversidade das comunidades bacterianas em cada AMN, através do índice de Shannon Wiener e do número de espécies identificadas (OTUs) em cada uma das amostras colhidas. Os microrganismos viáveis, provenientes de cada AMN, isolados e identificados são enumerados nestas fichas, assinalando aqueles que não têm classificação e que correspondem a novas espécies, por não serem ainda conhecidos e não existirem registos nas bases de dados consultadas.

Para as AMN em que foi possível determinar uma assinatura hidrobiómica, consta a enumeração das espécies exclusivas, por fase, com designação taxonómica conhecida, indicando se o hidrogenoma é consolidado. Para as águas em que o hidrogenoma não foi consolidado, devem ser analisadas mais amostras para que o mesmo possa ser validado.

CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

O projeto Hidrogenoma proporcionou inúmeros resultados e novos contributos relevantes (Figura 18) ao nível do conhecimento das Águas Minerais Naturais portuguesas. Este livro, assim como a plataforma digital interativa desenvolvida durante o projeto, têm como principal objetivo divulgar os dados obtidos,

entre especialistas, concessionários e o público em geral, para potenciar a utilização destes recursos de forma mais consistente e eficaz, bem como promover a realização de estudos subsequentes que complementem este primeiro grande passo na história destas águas.



Figura 18 - Resumo dos resultados obtidos no Projeto Hidrogenoma em números.

O repositório digital do projeto Hidrogenoma consiste numa base de dados com pesquisa interativa, com o intuito de partilhar continuamente informação sobre estes recursos hidrominerais, entre especialistas, técnicos e concessionários, o que permitirá,

não só consultar digitalmente os dados que constam neste livro, como também adicionar outros conteúdos (p.e. notícias, eventos, artigos, publicações) e resultados de estudos seguintes sobre esta temática. Na prática promove a continuidade do projeto, sabendo

que há necessidade de prosseguir com outras análises e pesquisas, criando uma forma mais simples e dinâmica de alcançar o público-alvo, numa época tão digital e tecnológica, na qual a disponibilidade de informação é cada vez mais valorizada e preferencial, suscitando assim o interesse para o tema entre os interessados. Para aceder à plataforma basta consultar o website da DGEG www.dgeg.gov.pt.

A caracterização do microbismo natural de cada uma das AMN sujeitas a este estudo, revela uma associação entre a diversidade microbiana e as principais características físico-químicas deste tipo de águas, cujos microrganismos identificados são, em alguns casos, concordantes com as utilizações e setores de atividade existentes.

O primeiro objetivo de caracterização microbiológica, ao nível da estrutura e composição microbiana, foi concluído. No entanto, pretende-se ainda debruçar mais especificamente sobre a funcionalidade genómica, através do estudo dos microrganismos isolados destas AMN, uma fonte riquíssima para investigação e análise genética, assim como promover a realização de mais análises ao nível do transcriptoma, com o objetivo de poder vir a comprovar os benefícios terapêuticos atualmente conhecidos e averiguar a bioatividade com possíveis aplicações biotecnológicas.

Devido não só à complexidade e dimensão do projeto, como também à ocorrência de alguns constrangimentos durante a colheita das amostras, não foi possível efetuar um

estudo mais exclusivo para cada AMN, de acordo com as especificações técnicas ao nível da captação, caudal, enquadramento climático e geológico, contexto ambiental, localização, entre outras. Contudo, foram adquiridos experiência e conhecimento, fatores fundamentais e necessários ao prosseguimento deste estudo.

Para as AMN com hidrogenomas consolidados, é importante continuar com os estudos dos transcriptomas, adaptados às condições laboratoriais que cada AMN exige (agora conhecidas), de modo a obter resultados reproduzíveis. Por outro lado, em todas as AMN em que a diversidade genética do bacteroma é significativa, é aconselhável a prossecução da análise para confirmar a estabilidade do respetivo hidrogenoma e determinar quais os fatores que podem contribuir para a variabilidade observada.

É igualmente essencial seguir com a investigação no sentido de avaliar o impacto dos fatores externos na variabilidade do hidrogenoma destas águas e avaliar se a amostragem utilizada é representativa do hidrogenoma de cada uma das AMN, ou apenas reflete uma caracterização pontual das amostras contempladas neste estudo.

O projeto Hidrogenoma constitui uma etapa significativa na história das Águas Minerais Naturais, ainda com muito por descobrir, revelando, pela primeira vez, a caracterização do microbismo natural destas águas, localizadas em Portugal Continental.