



_O paradigma da contaminação fecal de águas balneares, nem sempre o humano é culpado

The paradigm of bathing water faecal contamination, humans are not always to blame

Maria Leonor Santos, João Brandão, Elisabete Valério

elisabete.valerio@insa.min-saude.pt

Departamento de Saúde Ambiental, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

_Resumo

E. coli, coliformes, enterococos intestinais, estas bactérias foram durante décadas a luz do sol na luta contra a propagação de doenças transmissíveis por águas de consumo e recreativas. A sua presença em massas de água correlaciona-se diretamente com a doença humana. No entanto, essa correlação não é total. Há uma percentagem de casos em que a sua presença não tem implicações na saúde humana. Como resolver estes casos, de forma a identificar as fontes de contaminação fecal? A Biotecnologia respondeu a esta questão. O genoma das *Bacteroides* spp., bactérias pertencentes à flora intestinal de animais de sangues quentes e difíceis de cultivar em laboratório, apresentam pequenas variações de acordo com espécies que colonizam, indicando assim se a presença do seu material genético numa água é de origem humana, bovina, canídea, suína ou avícola, por exemplo. A sua pesquisa para determinar fontes de contaminação fecal em massas de água denomina-se de *Microbial Source Tracking*. Este método não veio substituir a utilização das bactérias intestinais tradicionais, que são indicadores simples e eficientes, mas veio dar resposta à procura das fontes biológicas de uma contaminação fecal.

_Abstract

E. coli, coliforms, intestinal enterococci, these bacteria have been for decades the sunshine of the struggle against the propagation of waterborne diseases. Its presence in water bodies correlates directly with human disease. Yet, this correlation is not complete; there is a percentage of presence that has no implications in human health. How can these cases be resolved in such a way that the sources of faecal contamination be identified? Biotechnology answered this question. The genome of *Bacteroides* spp., which are bacteria that belong to the intestinal flora of warm-blooded animals, hardly cultivable in laboratory, vary according to the animal species which they colonise. Due to this characteristic, the presence of its genetic material in water may be tracked to have originated, for example, in humans, bovines, canines, swine or fowl. The determination of sources of faecal contamination in water bodies is named "Microbial Source Tracking". It does not replace the traditional use of intestinal bacteria, which are simple and efficient indicators, but it does respond to the search for biological sources of faecal contamination.

_Introdução

O papel da água na vida

A água é um recurso natural essencial à vida ⁽¹⁾, fazendo parte de diversos processos físicos, químicos e biológicos ^(2,3). Esta é uma fonte imprescindível para a vida e a sua manutenção, desempenhando um papel crucial não só para o homem como para as suas inúmeras atividades, como tarefas diárias, de lazer e de turismo ^(1,2).

Saúde ambiental

Tudo o que é introduzido na água passa pelo ambiente e chega ao homem. Sendo por isso crucial, de modo a alcançar uma boa saúde pública, protegê-la e assegurar a sua disponibilidade e qualidade para os diversos fins a que se destina. Para tal, é necessário que existam um conjunto de estratégias e leis associadas à gestão sustentável, monitorização e proteção das águas e dos seus ecossistemas. Deste modo, consegue-se alcançar uma boa qualidade, já que um controlo ineficiente das fontes de poluição, ou uma incorreta gestão, poderá afetar as massas de água destinadas ao consumo doméstico ⁽⁴⁾ ou a qualidade das águas balneares, e as usadas para outros fins recreativos.

Problemas que advêm das águas

Recursos hídricos contaminados representam não só um elevado risco para a saúde humana, devido à possibilidade de ingestão e de transmissão de doenças parasitárias e infecciosas, mas também pode afetar o ambiente e a economia, já que pode originar o encerramento de áreas recreativas, como praias, zonas de pesca e de aquacultura, assim como outros locais de lazer que envolvam massas de água contaminadas ^(3,5-9).



Os riscos para a saúde associados à água podem ser inseridos em duas categorias principais. Uma das categorias está relacionada com a ingestão de água contaminada por agentes biológicos (vírus, bactérias, fungos e parasitas), e através do contacto direto ou por meio de insetos vetores que necessitam da água no seu ciclo biológico. A outra categoria inclui os riscos derivados de poluentes químicos em geral, fluentes de esgotos industriais e agrícolas (3).

Origens de contaminação de águas

A poluição em águas pode ser classificada como pontual ou difusa (3,7,10-12). A pontual atinge o corpo de água num único local, de forma concentrada e é composta maioritariamente por efluentes domésticos e industriais. A difusa, ao atingir o corpo de água, difunde por extensas áreas e é maioritariamente composta por resíduos provenientes da agricultura e pelo escoamento superficial urbano e rural (escorrências) (3,7,10-12). Assim, as fontes pontuais são relativamente fáceis de identificar, ao contrário das difusas, que podem advir do transporte de várias fontes misturadas a grandes distâncias (3,7,11-13).

Os cursos de água podem ser contaminados pela agricultura, pecuária, áreas rurais ou urbanas e estações de tratamento de água (3,7,9,10,14), existindo por isso diversas possíveis fontes de contaminação. As principais e de origem fecal podem ter como fonte o homem, ruminantes, animais selvagens, animais domésticos ou aves (figura 1) (3,7,10,15,16).

Figura 1: Representação esquemática de diferentes fontes possíveis de contaminação de águas fluviais.



Cada uma dessas fontes apresenta um risco diferente para a saúde humana, sendo a água dos esgotos a mais nociva (12,17,18), já que podem conter microrganismos patogénicos vários, de origem humana e animal (3,5,7-12,16,17). Assim, é importante destacar que a principal fonte de contaminação dos ambientes aquáticos naturais está associada às águas de esgotos domésticos e industriais não-tratadas ou que são sujeitas a tratamentos insuficientes/inadequados (figura 2) (3,7,10,15,16).

Figura 2: Representação esquemática de diferentes fontes possíveis de contaminação de águas balneares.



_Objetivo

Avaliar a relevância da abordagem *Microbial Source Tracking* no contexto da contaminação fecal de águas fluviais e balneares.

_Métodos

Tendo em vista que a poluição fecal nas águas é frequentemente o resultado de uma contaminação mista, torna-se crucial determinar os componentes individuais, de modo a salvaguardar a saúde pública e orientar os esforços para a sua mitigação (10,18).

Habitualmente, as bactérias indicadoras fecais (FIB) têm sido ótimas ferramentas para monitorizar a poluição, avaliar a qualidade e o tratamento da água e estudar os riscos de



saúde pública associados à mesma (5,9,12,14,16-19). Estas são caracterizadas por um grupo heterogéneo de taxa bacterianos, definidos por características fenotípicas que permitem a sua deteção e quantificação (12). Os principais FIB usados mundialmente são atualmente *E. coli* e *Enterococcus* (8,10,17,18,20,21), que foram selecionados com base nas vantagens que apresentam na sua capacidade indicatória de contaminação fecal (16,17).

Por exemplo, em Portugal, a avaliação da qualidade das águas balneares rege-se pelos critérios da Diretiva 2006/7/CE, e do Decreto-lei n.º 113/2012 (22,23). Esta é realizada com base na análise bacteriológica para identificação de *Enterococos* intestinais e *Escherichia coli*. De acordo com os resultados dessas análises bacteriológicas, cada água balnear é classificada como “excelente”, “boa”, “aceitável”, ou “má” (22,23).

No entanto, a utilização destas FIB apresenta algumas limitações, por um lado não é necessariamente representativa de todos os agentes patogénicos possíveis, em todos os momentos no tempo, por outro lado, e mais relevante, não permite saber qual a sua fonte biológica, ou seja, qual a origem da contaminação fecal. Esta é uma enorme desvantagem, sobretudo na caracterização do risco para a saúde pública, na implementação de medidas corretivas e processos de mitigação (5,8,14,16-18,20,21).

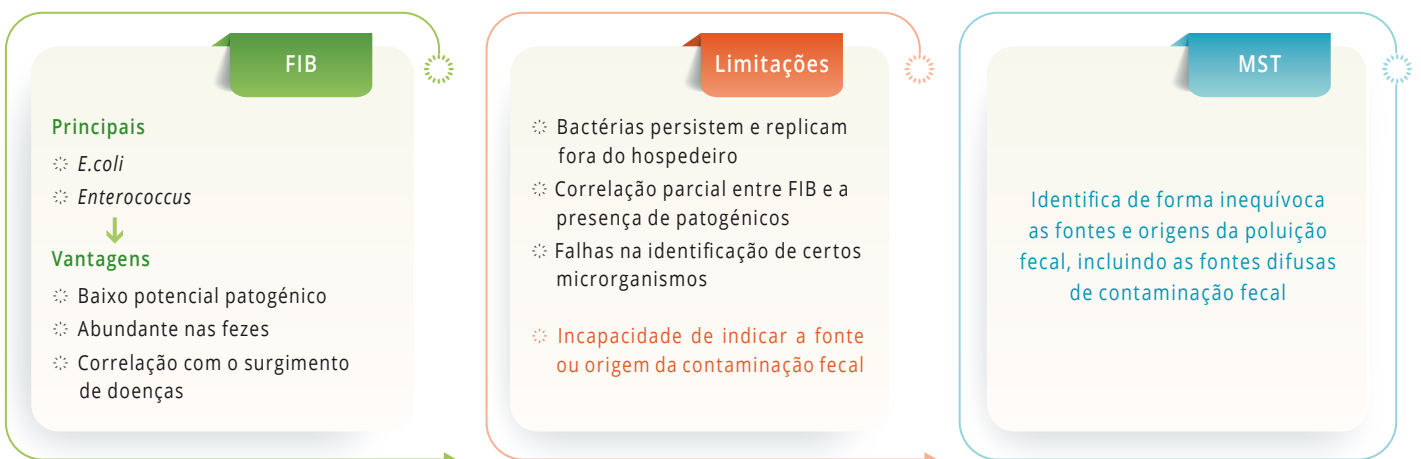
Na figura 3 está representado um esquema simplificado do surgimento do conceito de *Microbial Source Tracking* (MST), que permite complementar a informação gerada pela utilização das FIB – pois permite identificar os grupos biológicos que originam a poluição fecal.

As técnicas de rastreamento molecular da fonte microbiana (MST), do inglês *Microbial Source Tracking*, surgiram no final do século XX (17) e têm sido desenvolvidas na última década, de modo a dar resposta à limitação indicada anteriormente: identificar de forma inequívoca as fontes e origens da poluição fecal, incluindo as fontes difusas de contaminação fecal (7-9,11,12,14,16,17,19-21,24-26). Esta identificação é crucial para avaliar a qualidade da água e o risco associado à saúde humana, de forma a alocar verbas e a reformular as legislações em vigor, já que estas poderão ser cruciais na interrupção da transmissão de agentes patogénicos que irão afetar a saúde pública (7,9,16,17,19,20,24,25). Geralmente, são necessários grandes esforços e investimentos financeiros para mitigar as fontes de contaminação, como tal, a identificação das fontes de contaminação, facilita a sua resolução e definição dos recursos necessários (7,20,24,25).

Como funciona a técnica MST

A premissa da técnica MST baseia-se na associação de certos microrganismos fecais com um hospedeiro em particular, dado que cada organismo possui um conjunto

Figura 3: Esquema simplificado do aparecimento do conceito do *Microbial Source Tracking* (MST), que surge de modo a colmatar as limitações indicadas pela ferramenta FIB.





de microrganismos específicos no seu trato intestinal e estes tendem a passar para as massas de água pelas fezes (5,7-9,12,14,16,17,20,21,24,26).

Os métodos de MST independentes de bibliotecas de dados (LI-MST) são preferencialmente utilizados, pois visam uma característica particular de uma espécie ou tipo específico de patógeno, tornando-se assim mais apelativos para a identificação ao nível da espécie contaminante. Alguns destes métodos recorrem a cultura, sendo baseados pelo crescimento de vírus, bacteriófagos ou bactérias específicas da fonte e mtDNA (5,9,17,20). Por outro lado, caso sejam independentes de cultura, serão utilizados os testes químicos (como a deteção de cafeína, esteróis e estanois fecais, pesticidas e policíclicos) e moleculares (como a extração dos ácidos nucleicos dos alvos em questão) (5,9,20).

As bactérias usadas em MST apresentam quantidades e características distintas, como padrões de resistência a antibióticos (11,13,17,20,26) ou fragmentos específicos de um gene que está inequivocamente associado a um hospedeiro (11,12). Esta especificidade deve-se a processos evolutivos (11) e ao facto de as espécies de microrganismos diferirem com a dieta, fatores socioeconómicos e culturais, fisiologia e anatomia do hospedeiro, como a idade, genética e estado de saúde, e com a localização geográfica do hospedeiro (5,7,12,18,19,24,27). Ao conhecer essas relações, que variam dentro de uma população ao longo do tempo e entre diferentes populações no espaço, é possível identificar a fonte de contaminação fecal, já que muitos dos métodos que compõem esta técnica dependem de uma sequência específica de DNA, a que se designa de marcador molecular (7,8,11,12,14,17,19-21,24-26).

Aplicabilidade dos marcadores moleculares em MST

Os marcadores moleculares usados em MST são sequências de DNA que pertencem a microrganismos específicos de um hospedeiro (17). Usualmente, recorre-se a vários marcadores para um único hospedeiro e a métodos de combinação, com o objetivo de aumentar a discriminação e precisão ou para confirmar os resultados (9,17,20,24).

De forma a caracterizar o seu desempenho e aplicabilidade, os marcadores podem ser testados através de métodos qualitativos e quantitativos (24,19). Estes são avaliados conforme a especificidade e sensibilidade que apresentam (7,12,17,24). Um marcador específico é um marcador que pertence exclusivamente a um hospedeiro, o que permite indicar com elevada precisão a fonte de contaminação, já a sua sensibilidade consiste na sua capacidade de detetar fezes do hospedeiro, quando estas se encontram presentes nos recursos hídricos (11,24). A especificidade ao hospedeiro é definida com base nos resultados verdadeiramente negativos das análises quando se analisa material genético de hospedeiros não-alvo. Porém, é de destacar que nenhum dos marcadores bacterianos exhibe especificidade absoluta, provavelmente não só devido à fisiologia, dietas semelhantes e coabitação dos organismos, mas também graças à possibilidade de haver homologia entre algumas regiões do genoma de genes marcadores, com outros microrganismos que não os esperados. Devem, portanto, ser sempre validados para uma zona geográfica antes de serem usados rotineiramente.

Apesar dos marcadores virais apresentarem especificidade absoluta ao hospedeiro, de um modo geral, estes são menos prevalentes que os bacterianos nas amostras fecais (7,14,17,19,20,24,28).

A sensibilidade do método é definida pela proporção de amostras verdadeiramente positivas em que o marcador é detetado, ou seja, é a capacidade que o marcador tem de ser detetado em amostras fecais, mistas ou puras.

A escolha dos marcadores tem, então, como base a especificidade e sensibilidade do método selecionado e o que se sabe até à data sobre as fontes de contaminação na área de estudo (24). O uso de diversos marcadores permitirá determinar a principal fonte biológica de contaminação fecal.

_Conclusões

A abordagem *Microbial Source Tracking* (MST) é relevante no contexto da contaminação fecal de águas fluviais e balneares. Esta ferramenta de MST é extremamente útil para a prevenção e no estabelecimento de medidas de mitigação,



pois ao se fazer a associação a um culpado, de todos os possíveis suspeitos que andam entre nós, é possível tomar as medidas mais indicadas para a gestão do problema.

Apesar do MST ser uma técnica promissora para identificar a fonte de contaminação fecal, deve-se, sempre que possível, apostar numa abordagem combinada, onde se recorre às bactérias indicadoras fecais (FIB), à MST e à quantificação de marcador, pois só assim é que se terão informações mais confiáveis sobre a qualidade da água e riscos para a saúde pública.

Referências bibliográficas:

- (1) Comissão Europeia. A Directiva-quadro da Água: algumas informações. Luxemburgo: Serviço das Publicações Oficiais das Comunidades Europeias, 2002. http://apambiente.pt/dqa/assets/brochure_dqa.pdf
- (2) Instituto da Água. Implementação da directiva quadro da água: 2000-2005. Lisboa: Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional, 2006. https://apambiente.pt/dqa/assets/publ_portugal_dqa.pdf
- (3) Soares E, Ferreira R. Avaliação da qualidade da água e a importância do saneamento básico no Brasil. *Revista Meio Ambiente E Sustentabilidade*. 2017;13(6):50-76. <https://doi.org/10.22292/mas.v13i6.762>
- (4) Decreto-Lei n.º 306/2007, de 27 de agosto. DR Série I, n.º 164 (2007-08-27):5747-65. Estabelece o regime da qualidade da água destinada ao consumo humano, revendo o Decreto-Lei n.º 243/2001, de 5 de Setembro, que transpôs para a ordem jurídica interna a Directiva n.º 98/83/CE, do Conselho, de 3 de Novembro. <https://data.dre.pt/eli/dec-lei/306/2007/08/27/p/dre/pt/html>
- (5) Oliveira S. Avaliação da presença de biomarcador molecular de contaminação fecal hospedeiro específico em águas de recreação costeira no estado do Rio de Janeiro. (Dissertação de mestrado em Vigilância Sanitária, apresentada ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. 2014).
- (6) Purnell S, Halliday A, Newman F, et al. Pathogen infection risk to recreational water users, associated with surface waters impacted by de facto and indirect potable reuse activities. *Sci Total Environ*. 2020 Jun 20;722:137799. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137799>
- (7) Ballesté E, Demeter K, Masterson B, et al. Implementation and integration of microbial source tracking in a river watershed monitoring plan. *Sci Total Environ*. 2020 Sep 20;736:139573. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139573>
- (8) Holcomb DA, Knee J, Sumner T, et al. Human fecal contamination of water, soil, and surfaces in households sharing poor-quality sanitation facilities in Maputo, Mozambique. *Int J Hyg Environ Health*. 2020 May;226:113496. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2020.113496>
- (9) Brondani, G. Identificação das fontes de contaminação fecal nas águas superficiais do Rio Tejo (Dissertação de mestrado em Genética Molecular e Biomedicina, apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa, 2015)
- (10) Derose K, Roche L, Lile D, et al. Microbial Water Quality Conditions Associated with Livestock Grazing, Recreation, and Rural Residences in Mixed-Use Landscapes. *Sustainability*. 2020;12(12):5207. <https://doi.org/10.3390/su12125207>
- (11) Unno T, Staley C, Brown CM, et al. Fecal pollution: new trends and challenges in microbial source tracking using next-generation sequencing. *Environ Microbiol*. 2018 Sep;20(9):3132-3140. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14281>
- (12) García-Aljaro C, Blanch AR, Campos C, et al. Pathogens, faecal indicators and human-specific microbial source-tracking markers in sewage. *J Appl Microbiol*. 2019 Mar;126(3):701-717. <https://doi.org/10.1111/jam.14112>
- (13) Lee S, Suits M, Wituszynski D, et al. Residential urban stormwater runoff: A comprehensive profile of microbiome and antibiotic resistance. *Sci Total Environ*. 2020 Jun 25;723:138033. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138033>
- (14) Buma E. Identificação e distinção de fonte de poluição fecal na bacia hidrográfica ribeirã João Leite por metodologias moleculares (Dissertação de mestrado em medicina tropical e saúde pública, apresentada à Universidade Federal de Goiás, 2017)
- (15) United Nations. Water, Sanitation and Hygiene [Internet] (consult. 20/8/2020). <https://www.unwater.org/water-facts/water-sanitation-and-hygiene/>
- (16) Vadde KK, McCarthy AJ, Rong R, et al. Quantification of Microbial Source Tracking and Pathogenic Bacterial Markers in Water and Sediments of Tiaoxi River (Taihu Watershed). *Front Microbiol*. 2019 Apr 24;10:699. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00699>
- (17) Harwood VJ, Staley C, Badgley BD, et al. Microbial source tracking markers for detection of fecal contamination in environmental waters: relationships between pathogens and human health outcomes. *FEMS Microbiol Rev*. 2014 Jan;38(1):1-40. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12031>
- (18) Staley ZR, Boyd RJ, Shum P, et al. Microbial Source Tracking Using Quantitative and Digital PCR To Identify Sources of Fecal Contamination in Stormwater, River Water, and Beach Water in a Great Lakes Area of Concern. *Appl Environ Microbiol*. 2018 Oct 1;84(20):e01634-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.01634-18>
- (19) Zhang Y, Wu R, Lin K, et al. Performance of host-associated genetic markers for microbial source tracking in China. *Water Res*. 2020 May 15;175:115670. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115670>
- (20) Field KG, Samadpour M. Fecal source tracking, the indicator paradigm, and managing water quality. *Water Res*. 2007 Aug;41(16):3517-38. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.06.056>
- (21) McKee BA, Molina M, Cyterski M, et al. Microbial source tracking (MST) in Chatahochee River National Recreation Area: Seasonal and precipitation trends in MST marker concentrations, and associations with E. coli levels, pathogenic marker presence, and land use. *Water Res*. 2020 Mar 15;171:115435. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115435>
- (22) Decreto-Lei n.º 113/2012 de 23 de maio. DR Série I n.º 100 (23/5/2012):2715-26. Procede à primeira alteração ao Decreto-Lei n.º 135/2009, de 3 de junho, que estabelece o regime de identificação, gestão, monitorização e classificação da qualidade das águas balneares. <https://data.dre.pt/eli/dec-lei/113/2012/05/23/p/dre/pt/html>
- (23) Diretiva 2006/7/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 15 de Fevereiro de 2006 relativa à gestão da qualidade das águas balneares e que revoga a Directiva 76/160/CEE. JO 4.3.2006: L 64/37-51. <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2006/7/oj>
- (24) Ahmed W, Gyawali P, Feng S, et al. Host Specificity and Sensitivity of Established and Novel Sewage-Associated Marker Genes in Human and Nonhuman Fecal Samples. *Appl Environ Microbiol*. 2019 Jul 1;85(14):e00641-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.00641-19>
- (25) Layton BA, Cao Y, Ebentier DL, et al. Performance of human fecal anaerobe-associated PCR-based assays in a multi-laboratory method evaluation study. *Water Res*. 2013 Nov 15;47(18):6897-908. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.05.060>
- (26) Stoeckel DM. Selection and application of microbial source tracking tools for water-quality investigations. Washington DC: US Geological Survey, 2005 (Techniques and Methods; 2-A3). https://pubs.usgs.gov/tm/2005/tm2a3/pdf/Book2_Collection%20of%20Environmental%20Data.pdf
- (27) Xue J, Feng Y. Comparison of microbial source tracking efficacy for detection of cattle fecal contamination by quantitative PCR. *Sci Total Environ*. 2019 Oct 10;686:1104-1112. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.091>
- (28) Cao Y, Raith MR, Griffith JF. Droplet digital PCR for simultaneous quantification of general and human-associated fecal indicators for water quality assessment. *Water Res*. 2015 Mar 1;70:337-49. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.12.008>