

_As novas *guidelines* da Organização Mundial de Saúde para águas balneares, a qualidade das areias e a Bandeira Azul: que impacto esperar da monitorização dos fungos?

The new World Health Organisation guidelines on recreational water quality, sand quality and the Blue Flag: what to expect from fungal monitoring?

João Brandão¹, Konstantina Sarioglou¹, Susana Silva², Helena Rebelo¹

joao.brandao@insa.min-saude.pt

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

(2) Departamento de Epidemiologia, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

_Resumo

Em 2021, a 'Bandeira Azul' introduziu a qualidade das areias das praias como critério-guia para atribuição do galardão. Seguindo a recomendação das novas *guidelines* da Organização Mundial de Saúde para as águas balneares, o novo critério para areias baseia-se na quantificação do número de unidades formadoras de colónias (UFC), por grama de areia, de todos os fungos, enterococos e, adicionalmente, *Escherichia coli*. Estes dois últimos são também indicadores de qualidade da água balnear, já que a sua presença indica contaminação de origem fecal. O valor de referência para os fungos totais é de 490 UFC/g. Este estudo pretende fazer uma análise previsiva do que a implementação do novo critério-guia do galardão Bandeira Azul poderá implicar em termos de não-conformidades relativamente ao parâmetro fúngico. A análise (cega) de 105 amostras de areia recebidas no laboratório do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge durante o ano de 2020 revelou uma mediana de 29 UFC/g, um intervalo interquartil entre 5 e 79 UFC/g. Apenas 3 amostras (cerca de 3%) excederam o valor de referência para fungos. Não se espera assim um grande impacto negativo na classificação das zonas balneares designadas utilizando este critério de avaliação.

_Abstract

In 2021, the 'Blue Flag' added the sand quality of beaches as a guide-criterion for the award. Following the recommendation of the new *guidelines* for recreational waters from the World Health Organization, the new criterion is based on the quantification, per gram of sand, of the number of colony forming units (CFU) of all fungi and enterococci, but testing also *Escherichia coli*. These last two are indicators of bathing water quality, and their presence indicates faecal contamination. The reference value for all fungi is 490 CFU/g. This study aims at making a predictive assessment of what the implementation of the new Blue Flag criterion may implicate regarding the fungal parameter. The (blind) analysis of 105 sand samples received in the laboratory of the National Institute of Health Dr Ricardo Jorge during the year 2020 revealed a median of 29 CFU/g, with an interquartile range of 5 to 79 CFU/g. Only 3 samples (about 3%) exceeded the reference value for fungi. Therefore, large negative impacts are not expected on the classification of designated bathing areas based on this assessment criterion.

_Introdução

As *guidelines* da Organização Mundial de Saúde (OMS) para a qualidade das águas balneares e proteção da saúde humana, publicadas em 2003, consideravam as areias das praias como um assunto de interesse na proteção da saúde humana (1). Consequentemente, na versão de 2021, o capítulo dedicado a este tema refere os vários grupos biológicos e a sua importância em praias de qualquer região do mundo; desde os atuais parâmetros de qualidade das águas balneares (indicadores de contaminação fecal) a parâmetros tipicamente presentes na ecologia das areias (2). Refere ainda parâmetros endémicos em zonas específicas do mundo, como é o caso da pesquisa de helmintas na Lituânia, em que a areia das praias é uma conhecida matriz de contaminação inter-humana (3). Também as moscas da areia na zona do médio Oriente e parasitas transdérmicos em algumas zonas tropicais são referidas, assim como abordagens de gestão, prevenção e remediação (2). A nova versão das *guidelines* recomenda então a monitorização de parâmetros fúngicos genéricos e bacterianos de origem fecal, com valores-guia para fungos totais e de segurança para enterococos.

No entanto, não basta recomendar. É necessário criar todo um sistema de avaliação dos resultados da monitorização que operacionalize a classificação das praias com base na qualidade das areias. Os valores agora recomendados são provisórios até que se confirmem através de estudos epidemiológicos. De referir que, relativamente aos enterococos, o limite foi extrapolado com base no cálculo de risco quantitativo microbiano (QMRA, na sigla em inglês) a partir do valor de 200 UFC/100 ml para águas balneares, o que



artigos breves_ n. 2

corresponde a um risco de desenvolvimento de doença pós-exposição de até 5%. Relativamente aos fungos, a discriminação de alguns grupos é pertinente, mas não se conhece a influência na saúde desses parâmetros individuais para poder determinar valores-limite (4). Exemplos de parâmetros individuais são: *Candida albicans*, uma levedura oportunista de origem quase exclusivamente fecal humana (5); *Rhodotorula* spp., conhecida por causar endocardites em imunocomprometidos; dermatófitos, fungos patogénicos responsáveis por infeções cutâneas, como a tinha e o pé de atleta ou onicomicoses; e os fungos filamentosos indiferenciados, sempre bastante presentes em amostras ambientais e frequentes causadores de alergias e infeções invasivas em hospedeiros suscetíveis (6).

O Galardão Bandeira Azul

A Associação Bandeira Azul da Europa (ABAE) atribui um galardão classificativo de qualidade baseado em 32 critérios, imperativos ou guia, de segurança, conforto e de educação ambiental (7). Tendencialmente os critérios-guia antecedem os critérios imperativos e têm como objetivo a sua inclusão de forma suave. Dessa lista de critérios fazem parte a qualidade da água, a exposição pública dos seus resultados na praia, instalações e equipamentos em boa qualidade e quantidade apropriada ao bom funcionamento da zona balnear, acessibilidade à praia em segurança e particularmente, pelo menos uma praia por conselho, terá de assegurar acesso especialmente orientado para deficientes motores. Cerca de metade das zonas balneares designadas são anualmente galardoadas em Portugal.

Baseada nas novas recomendações da OMS, a ABAE entendeu integrar a qualidade da areia das praias, já na época balnear de 2021, como critério-guia para atribuição do galardão. Para a sua monitorização, o novo critério baseia-se na quantificação, por grama de areia, do número de unidades formadoras de colónias (UFC) de todos os fungos, enterococos e *Escherichia coli*. Estes dois últimos são também indicadores de qualidade da água balnear e a sua presença revela contaminação de origem fecal. Os valores de referência são 490 UFC/g para os fungos totais (correspondente ao percentil 80 encontrado no estudo internacional *Mycosands* que envolveu 13 países e vários climas, com uma mediana de 89 UFC/g (6));

67 UFC/g para enterococos (correspondentes ao limite de segurança de 200 UFC/100ml em águas balneares calculados por avaliação de risco microbiano quantificado – QMRA) (2) e 25 UFC/g de *E. coli* (resultante de um estudo realizado no ano 2000 e que representa a mediana nacional (8)).

_Objetivo

Este estudo pretende fazer uma análise previsiva do que a implementação do novo critério-guia do galardão Bandeira Azul poderá implicar em termos de não-conformidades relativamente ao parâmetro fúngico.

_Materiais e métodos

No estudo exploratório do impacto da implementação do novo critério para atribuição do galardão relativamente à presença de fungos nas areias das praias, estimaram-se, para estes microrganismos, a mediana, o mínimo, o máximo e o intervalo interquartil de 105 amostras de areia de 22 praias, analisadas no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, entre junho e novembro de 2020.

A análise fúngica realizou-se por “lavagem” de 40 g de areia com 40 mL de água destilada estéril sob agitação orbital (100 rotações por minuto). 200 µL do sobrenadante foram espalhados em placas de Petri com agar de malte (contendo extrato de malte e cloranfenicol para crescimento e identificação de fungos filamentosos e leveduras) e em placas de Petri com agar micobiótico (com actidiona e cloranfenicol para crescimento e identificação de dermatófitos). Realizaram-se três réplicas de cada inoculação por meio. A incubação foi feita a 27.5 (+/- 2.5) °C durante 5 a 7 dias para as placas de malte e 15 a 20 dias para as de agar micobiótico.

As colónias isoladas foram contadas e identificadas em cada meio com base nas seguintes características: cor do lado frontal das colónias, cor do reverso, morfologia, textura e aspeto geral e meio cromogénico para as leveduras. A identificação microscópica realizou-se utilizando o corante com azul de lactofenol e ampliação de 400x. Foram registadas médias aritméticas dos triplicados de cada um dos meios (fungos filamentosos e leveduras do agar de malte e dermatófitos do agar micobiótico).



artigos breves_ n. 2

_Resultados

A análise (cega) revelou uma mediana de 29 UFC/g e um intervalo interquartil entre 5 e 79 UFC/g. A contagem máxima encontrada foi de 834 UFC/g, tendo apenas 3 amostras (cerca de 3%) excedido o valor de referência. O **gráfico 1** mostra a distribuição de valores obtidos pelas contagens em UFC/g por número de amostra.

A distribuição discriminada de fungos evidencia que o grupo que mais contribui para a contagem total de fungos são os filamentosos esporulantes, onde se incluem as espécies mais frequentemente isoladas no laboratório e que pertencem aos géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* e *Fusarium*. O **gráfico 2** mostra a relação entre os vários parâmetros: fungos filamentosos, *Candida albicans*, *Rhodotorula* spp, dermatófitos e leveduras.

_Discussão

A implementação da nova diretiva europeia relativa à qualidade das águas balneares (9) obrigou a enormes investimentos dos Estados-Membros (EM), com a coparticipação de fundos de coesão comunitários. O grande objetivo deste investimento foi a redução substancial da poluição fecal que chegava às águas costeiras dos EM. Este processo conduziu a uma redução substancial dos indicadores de contaminação fecal presentes nas águas e areias, e dos fungos mais associados a doença humana através das areias, melhorando bastante a qualidade de ambas as matrizes. Este efeito é evidente ao comparar resultados de uma avaliação das areias das costas portuguesas de 2000 e de 2010, 4 anos após o início deste processo. As médias dos indicadores analisados reduziram substancialmente: as leveduras baixaram de

Gráfico 1: ▾ Distribuição das contagens por número de amostra com representação do valor de referência a tracejado (UFC/g).

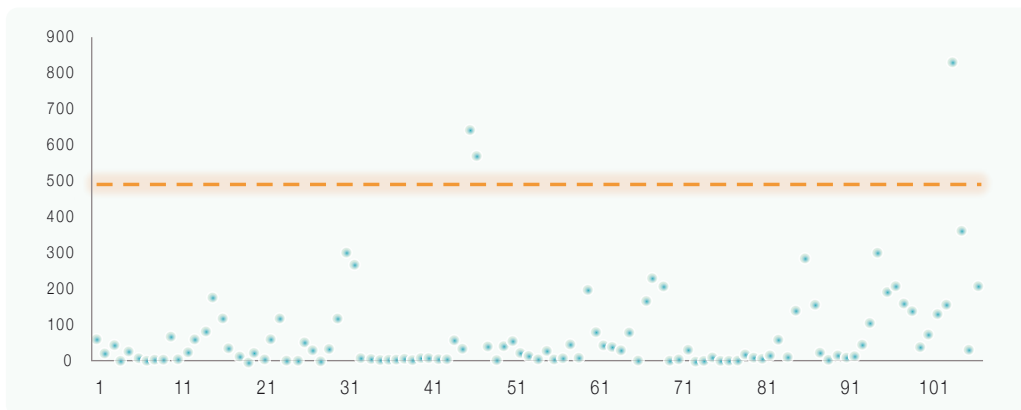
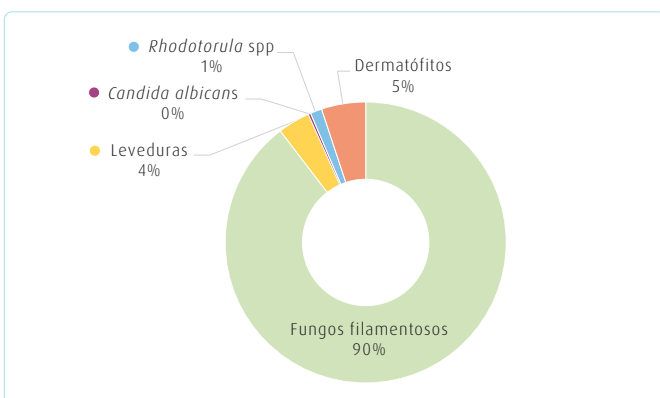


Gráfico 2: ▾ Contribuição dos potenciais parâmetros fúngicos determinados laboratorialmente (UFC/g).



60 UFC/g para 15 UFC/g, os fungos filamentosos de 85 UFC/g para 17 UFC/g e os dermatófitos de 15 UFC/g para 8 UFC/g (8,10). Não considerando parâmetros fúngicos discriminados, o valor médio situava-se, em 2000, entre 300 e 560 UFC/g quando o percentil 80 no estudo Mycosands é de 490 UFC/g. Este valor parece estar, contudo, de acordo com os dados de 2000, apesar das reduções verificadas nos parâmetros individuais. Possivelmente a redução de poluição fecal levou, não a uma redução da quantidade de flora fúngica, mas a uma alteração da sua composição. No entanto, são desconhecidas atualmente quais as taxa mais prevalentes na sequência de um episódio de poluição fecal em areias.



artigos breves_ n. 2

Este estudo pretendeu fazer uma análise previsiva do que a implementação do novo critério-guia do galardão Bandeira Azul poderá implicar em termos de não-conformidades relativamente ao parâmetro fúngico. O impacto dos parâmetros bacteriológicos não foi estudado por estar já descrito anteriormente (8,10).

_Conclusão

Considerando que o novo critério-guia exige que 80% das amostras de uma praia, analisadas mensalmente desde o mês anterior ao início da época balnear até final da época, se situem com contagens de fungos por grama de areia abaixo do valor de referência de 490 UFC/g, a probabilidade de uma praia ser desqualificada seria muito baixa em 2020 (cerca de 3%). Entende-se assim ser pertinente e de baixo impacto negativo na classificação das praias, a abordagem decidida pela Associação Bandeira Azul da Europa para a monitorização das areias das praias para atribuição do galardão Bandeira Azul.

Referências bibliográficas:

- (1) World Health Organization. Guidelines for safe recreational water environments. Volume 1, Coastal and fresh waters. Geneva: WHO, 2003. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42591>
- (2) World Health Organization. Guidelines on recreational water quality: volume 1: coastal and fresh waters. Geneva: WHO, 2021. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/342625>
- (3) Republic of Lithuania. Ministry of Health. Lithuanian hygiene standard HN 92: 2018 "Beaches and their quality of bathing water". 2007 (versão consolidada de 01.05.2018 a 25/07/2019). <https://e-seimas.lrs.lt/portal/legalAct/lt/TAD/TAIS.311976/wTyZKkKekTr>
- (4) Weiskerger CJ, Brandão J. Fungal contaminants in water and sand: a new frontier for quantitative microbial risk assessment. *Curr Opin Environ Sci & Health*. 2020 Aug;16:73-81. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2020.03.001>
- (5) Angebault C, Djossou F, Abélanet S, et al. Candida albicans is not always the preferential yeast colonizing humans: a study in Wayampi Amerindians. *J Infect Dis*. 2013 Nov 15;208(10):1705-16. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit389>
- (6) Brandão J, Gangneux JP, Arikan-Akdagli S, et al. Mycosands: Fungal diversity and abundance in beach sand and recreational waters - Relevance to human health. *Sci Total Environ*. 2021 Aug 10;781:146598. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146598>
- (7) Associação Bandeira Azul da Europa. Critérios de atribuição da Bandeira Azul para as Praias [online]. [consult. 22/7/2021]. Disponível em: <https://bandeiraazul.abae.pt/plataforma/index.php?p=criteria&s=beaches>
- (8) Sabino R, Veríssimo C, Cunha MA, et al. Pathogenic fungi: an unacknowledged risk at coastal resorts? New insights on microbiological sand quality in Portugal. *Mar Pollut Bull*. 2011 Jul;62(7):1506-11. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.04.008>
- (9) Comissão Europeia. 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 Diretiva 76/160/CEE. JO 4.3.2006: L 64/37-51. <http://data.europa.eu/eli/dir/2006/7/oj>
- (10) Brandão J, Veríssimo C, Rosado ML, et al. Qualidade microbiológica de areias de praias litorais: relatório final. Alfragide: Instituto do Ambiente, 2002. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4917.7441>