

ICREW AP3:
Sumário Executivo
Desenvolvimento de Ferramentas
Analíticas para o Rastreamento de
Fontes Fecais

ÍNDICE

1. Introdução

1.1 Concepção do Estudo

1.2 Revisão da Literatura

1.2.1 Conclusões e Recomendações da Revisão de Documentos

1.3 Workshop Internacional

1.4 Selecção de Métodos

2. Resultados

3. Conclusões

4. Recomendações

1. Introdução

A Agência Ambiental de Inglaterra e País de Gales assegurou o financiamento EU INTERREG IIIB de um projecto denominado 'ICREW' – Melhorar as Águas Costeiras e Recreativas. Pretendia-se com o projecto ajudar cinco estados-membro da UE – Reino Unido, Irlanda, França, Portugal e Espanha – a melhorar a qualidade das referidas águas e preparar a implementação de nova legislação da UE respeitante às mesmas.

O projecto ICREW foi avaliado em aproximadamente €8m. e era composto por sete projectos, ou “acções piloto”. O projecto ICREW decorreu entre Abril de 2003 e Abril 2006.

Uma dessas acções piloto, Acção Piloto 3, que envolvia parceiros da Irlanda, França, Portugal e RU, abordou o tema do rastreamento da fonte microbial da poluição fecal, do ponto de vista regulamentar. O seu objectivo foi “gerar uma ferramenta de trabalho que pode ser usada para distinguir as fontes de poluição que contribuem para uma amostra ambiental”.

A qualidade das águas balneares e conquícolas, expressa em termos de concentração de organismos de indicação fecal, é normalmente sujeita a uma grande variação em qualquer determinado local. As variações da qualidade são muitas vezes acontecimentos transitórios, pelo que quando controladas pela recolha de amostras por rotina são, muitas vezes, difíceis de explicar. Tal é especialmente verdade para bacias hidrográficas complexas em que pode existir um grande variedade de locais de emissão e entradas difusas, alguns contínuos, outros intermitentes, cada um com um tempo de percurso diferente até ao ponto de recolha de amostras.

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

A tipificação microbial dá a oportunidade de examinar amostras ambientais de forma qualitativa bem como quantitativa, atribuindo os indicadores fecais encontrados nas amostras às suas várias fontes.

Foram publicados na literatura científica vários métodos de tipificação diferentes, contudo nenhum provou ter êxito como ferramenta geral para a resolução de questões ambientais práticas complexas.

O objecto deste estudo é criar uma ferramenta prática que possa ser usada para distinguir entre as fontes de poluição fecal associadas às amostras ambientais. A intenção é utilizar o rastreamento de fontes de forma prática como uma ferramenta de gestão de bacia hidrográfica na UE. Um dos potenciais benefícios de tal metodologia seria ajudar a atingir os padrões rigorosos relativamente ao *E. coli* e enterococci intestinal, que terão que ser atingidos em determinados locais quando for implementada a revisão à actual directiva sobre as águas balneares.

1.1 Concepção do Estudo

O estudo foi concebido para ter várias etapas, em que seria feita uma revisão dos progressos após cada uma delas e acordada a direcção futura do projecto. Essas etapas seriam:

- Revisão da literatura. A revisão avaliou o nível de conhecimento actual relativamente ao rastreamento de fontes fecais. A mesma decorreu entre Setembro e Dezembro de 2003.
- Workshop Internacional. O workshop juntou especialistas técnicos de todo o mundo em várias abordagens de rastreamento de fontes de poluição para rever por pares a literatura do projecto e ajudar na escolha dos métodos para o estudo. O workshop decorreu em Janeiro de 2004.
- Implementação de métodos seleccionados. Os métodos seleccionados no workshop foram implementados e o seu desempenho testado por cada um dos parceiros. Tal foi efectuado entre Março de 2004 e Março de 2005.
- Testes baseados em bacias hidrográficas. O desempenho dos métodos foi avaliado em estudos de bacias hidrográficas em cada um dos quatro países parceiros. Esta avaliação foi efectuada entre Abril e Outubro de 2005.
- Elaboração do relatório. Os parceiros acordaram as conclusões e recomendações do

final

projecto. O relatório foi concluído em Fevereiro de 2006.

1.2 Revisão da literatura

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

Contexto

O objectivo da revisão de documentos foi avaliar o trabalho publicado relativamente ao rastreamento de fontes fecais e identificar os métodos que parecerem merecedores de uma avaliação suplementar. Cada parceiro do projecto reviu um grupo específico de métodos e identificou os métodos desse grupo que justificam uma análise suplementar.

Os parceiros franceses e portugueses reviram os métodos dependentes do banco de dados genotípico. Os parceiros irlandeses reviram os métodos independentes do banco de dados genotípico e o RU reviu os métodos fenotípicos e químicos.

Cada parceiro utilizou os critérios acordados para avaliar os métodos. Os critérios e sistema de pontuação usados para avaliar os métodos são apresentados no Quadro 1.

Quadro 1: Critérios usados como parte da estrutura de avaliação do método apresentando a pontuação para os métodos seleccionados

CRITÉRIOS	IMPORTÂNCIA	MÉTODO	
		F+ RNA	<i>Bacteroidetes</i> PCR
Âmbito de utilização anterior	Baixa (até 5 pontos)	3	3
Flexibilidade para começar com qualquer meio ambiente	Baixa (até 5 pontos)	3	5
Custos para o utilizador final	Média (até 10 pontos)	3	5
Praticabilidade da utilização	Média (até 10 pontos)	3	4
Velocidade e produtividade em Laboratório	Média (até 10 pontos)	4	8
Requisitos de amostragem	Média (até 10 pontos)	10	10
Quantificação e considerações estatísticas	Elevada (até 15 pontos)	13	13
Uso de um organismo indicador de conformidade	Elevada (até 15 pontos)	5	5
Garantia de qualidade e reprodutibilidade	Elevada (até 15 pontos)	6	12
Custos no projecto	Muito Elevada (até 20 pontos)	10	12
Capacidade discriminatória e exactidão	Muito Elevada (até 20 pontos)	10	17
Necessidade de desenvolvimento	Muito Elevada (até 20 pontos)	9	10
Pontuação total	(até 155 pontos)	79	104

Das revisões individuais dos parceiros, foram apresentadas doze técnicas, três de cada uma das quatro revisões foram classificadas com potencial e merecedoras de uma análise suplementar, de acordo com os critérios de avaliação. No Quadro 2 são apresentados esses métodos.

1.2.1 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES DA REVISÃO DA LITERATURA

Contexto

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

Resultados da revisão

Das revisões individuais dos parceiros, foram apresentadas doze técnicas, três de cada um dos laboratórios participantes foram classificadas com potencial para um estudo suplementar, de acordo com os critérios de avaliação. No Quadro 2 são descritos esses métodos seleccionados que se considera possuírem as características desejáveis dentro da estrutura de avaliação.

Recomendações suplementares

Embora seja evidente que as avaliações individuais dos métodos estão sujeitas a variações de interpretação dos critérios de selecção e à perícia dos parceiros em áreas específicas, as análises estão maioritariamente em conformidade com o objectivo comum estabelecido. Contudo, é também evidente que poucos dos métodos seleccionados estão bem estabelecidos e não foram largamente usados no campo da tipificação de fontes fecais. Alguns métodos necessitam de ser validados relativamente ao tipo de fonte e poderá ser necessário um desenvolvimento mínimo adicional. Os protocolos normalizados completos sob a forma de métodos ISO/CEN ou similares não estão disponíveis e visto que existe a capacidade de análise de amostras usando esses métodos em laboratórios especializados individuais, o seu levantamento em laboratórios não especializados exigiria uma entrada considerável de recursos e transferência de formação/tecnologia avançadas.

Recomenda-se vivamente que enquanto existir alguma liberdade para I&D no âmbito da estrutura do projecto ICREW é imperativo que seja utilizada uma abordagem genérica normalizada realista por todos os parceiros de forma a providenciar a base para quaisquer estudos de desenvolvimento. Tal irá evitar o desenvolvimento de métodos isolados que tenham o potencial para duplicação e questões de não transferabilidade entre países parceiros. Terá ainda a vantagem de fornecer informações vitais sobre a avaliação de métodos. Recomenda-se, por conseguinte, que paralelamente à I&D em cada instituto, seja utilizado um método comum para estabelecer um conjunto de informações equivalente em todos os países cooperantes. Sugere-se também que seja criado um programa de amostragem bem definido e abrangente em cada país ao longo de uma escala temporal adequada de modo a abranger a variação sazonal e temporal. Por outro lado, de modo a que a análise “de rotina” a *E. coli* e *streptococci* fecais forneça dados comparativos de fundo relativamente às bacias hidrográficas de amostragem identificadas, devem ser conduzidos muito poucos ou apenas um método de tipificação.

Quadro: 2 Métodos identificados pela revisão dos documentos para avaliação suplementar.

Método	Tipo
Reacção em cadeia pela polimerase com elemento repetitivo (rep-PCR)	Dependente do banco de dados genotípico
Tipificação de sequência Multi locus (MLST)	Dependente do banco de dados genotípico
Electroforese em gel de campo pulsado (PFGE)	Dependente do banco de dados genotípico
Polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição (RFLP)	Dependente do banco de dados genotípico
Polimorfismo de DNA amplificado aleatoriamente (RAPD)	Dependente do banco de dados genotípico
Detecção de adenovírus	Independente do banco de dados genotípico
<i>Bifidobacteria</i> fermentada em Sorbitol	Independente do banco de dados fenotípico/genotípico
Detecção de agentes de branqueamento fluorescentes (FWA)	Independente do banco de dados químico
Biomarcadores de Enterotoxina	Independente do banco de dados genotípico
Genotipificação de <i>Bacteróides</i> sp.	Independente do banco de dados genotípico
Genotipificação de F+ <i>coliphage</i>	Independente do banco de dados genotípico
Espectroscopia Vibracional	Dependente do banco de

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

1.3 Workshop Internacional

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

O objectivo do workshop foi juntar peritos técnicos de todo o mundo numa série de abordagens ao rastreamento de fontes de poluição de modo a apoiar os membros da Acção Piloto 3 na tomada de decisões para seleccionar as abordagens de rastreamento mais apropriadas às necessidades do projecto. A intenção foi desenvolver os métodos seleccionados, determinando-os num laboratório em cada país participante e efectuar testes de campo para demonstrar a sua eficácia.

O workshop incluiu apresentações por parte da equipa de projecto ICREW que descreveu os resultados das revisões da literatura efectuadas, bem como contributos de outros que estavam familiarizados com esses métodos que parecem dar mais garantias de aplicação no âmbito do projecto. Pretendia utilizar-se o workshop para rever por pares e estimular as conclusões retiradas das revisões da literatura e ajudar na selecção dos métodos a utilizar para os aspectos práticos do estudo.

Os participantes do Workshop foram divididos em três grupos e foi-lhes pedido que recomendassem dois métodos que pudessem ser avaliados como parte do projecto. Os Grupos recomendaram o seguinte.

Grupo um:- Detecção de *Adenovirus* 40 / 41, Isolamento e enumeração de *Bifidobacterium* sp que fermentam em sorbitol, genotipificação de *Bacteroidetes* usando PCR, genotipificação de bacteriófago F+RNA por hibridação.

Grupo dois:- Genotipificação de *Bacteróides* usando PCR, genotipificação de bacteriófago F+RNA por hibridação.

Grupo três:- genotipificação de bacteriófago F+RNA por hibridação, rep-PCR usando *Escherichia coli*.

1.4 Selecção de Métodos

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

Os 3 grupos presentes no workshop recomendaram genotipificação do bacteriófago por hibridação F+RNA e dois dos grupos recomendaram a genotipificação de *Bacteroidetes* usando a PCR.

O grupo do Projecto concordou em avaliar ambos os métodos na fase de estudo de bacia hidrográfica do projecto.

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

Figura 1: Exemplo de um gel PCR apresentando resultados positivos para o Indicador CF128f de *Bacteroidetes*

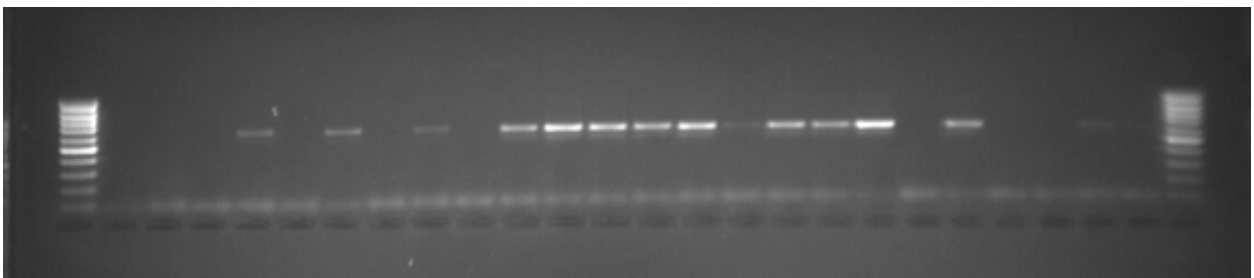
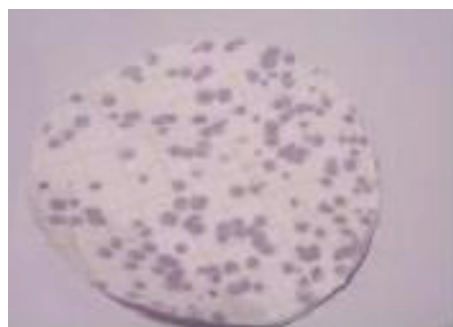


Figura 2: Exemplo de um filtro de hibridação positivo relativamente ao bacteriófago F+RNA



2. Resultados

Os resultados obtidos por cada país estão resumidos na tabela 3, no anexo IV da *Acção Piloto 3* encontram-se os dados analíticos completos: *relatório técnico de rastreamento de fonte de poluição em desenvolvimento*.

Durante a primeira fase do estudo francês, a amostragem de 3 águas urbanas superficiais de drenos de Plouguin, Saint Pabu e Tréglonou foi efectuada duas vezes por dia em datas de amostragem diferentes: 30/11/04 e 06/12/04.

Os bacteriófagos F+RNA, genótipo II e, a um nível mais reduzido, o genótipo III estavam maioritariamente presentes nestes três locais de amostra. Estes resultados indicam uma contaminação humana e coincidem com a caracterização prévia destas águas. No entanto, numa amostra de Plouguin, os bacteriófagos genótipo I estavam isolados em pequenas quantidades, (Grupo I 1.4% e Grupos II/III 65%) e numa amostra de Treglonou (Grupo I 0.9% e Grupos II/III 75.7%) indica igualmente um baixo nível de poluição de origem animal. Tal poderia ser explicado pela presença de terras de bovino próximas das águas estudadas. Neste caso, a terra inclina-se em direcção ao rio. Os *Bacteroidetes*, os 2 conjuntos de bases seleccionados para identificar a origem bovina e humana (CF128f-Bac708r e HF183f-Bac708r) foram aplicados juntamente com o conjunto geral (Bac32f-Bac708r). Os resultados com o conjunto iniciador humano confirmam os resultados de bacteriófagos F+RNA. De facto, todas as águas deram resultado positivo, em que o conjunto geral indica contaminação fecal e o conjunto humano indica contaminação de fontes urbanas.

Das águas represadas agrícolas (Carpont, Kerilien, Keredern) recolhidas em Janeiro de 2005, foi detectado um número insuficiente de bacteriófagos (< 100 bacteriófagos F RNA / 100 ml) para levar a cabo qualquer hibridação (genótipo). Estas amostras de água foram também analisadas com os dois conjuntos seleccionados de iniciadores específicos de hospedeiro e com o conjunto geral. Exceptuando uma das duas amostras analisadas em Janeiro de 2005 de Keredern, todas as amostras analisadas deram resultado positivo com o conjunto geral, realçando a presença de genes com código RNA 16S de *Bacteroidetes*. As amostras de Keredern não deram nenhum sinal positivo com os iniciadores específicos de humanos ou bovinos. Este resultado pode dever-se ao baixo nível de poluição fecal ou a uma outra fonte de poluição fecal que não a humana ou bovina. As amostras de Kerillien deram um resultado positivo com os iniciadores específicos de bovinos e um negativo com os iniciadores específicos de humanos, indicando uma fonte de poluição de origem bovina.

As amostras de Carpont – previamente caracterizada como zona rural – deram um resultado positivo com os indicadores específicos de humanos, revelando uma fonte urbana de poluição. A bacia vertente de Carpont é grande e drena terrenos com habitat diverso, o que significa que a entrada de fontes de poluição urbana não pode ser excluída. De igual modo, o fluxo deste pequeno rio era bastante grande comparativamente a outros dois efluentes rurais (Keredern e Kerillien).

Foram realizados mais seis eventos de amostragem depois de Março de 2005 e, mais uma vez, em relação a este tipo de água, a concentração de bacteriófagos F+RNA era insuficiente para levar a cabo um processo de genótipo. Em vez disso, os isolamentos individuais (um mínimo de 20 halos) de bacteriófagos foram recolhidos e genotipificados. Estes resultados só caracterizam as águas e serão efectuadas mais investigações sobre este tipo de águas.

Durante o último evento de amostragem (Outubro de 2005), foram analisadas amostras adicionais de água. Estas eram mais representativas do estuário de Aber Benoît que dos efluentes agrícolas e urbanos, algumas delas eram águas balneares e outras eram águas localizadas perto de áreas agrícolas conquícolas.

As amostras eram águas salinas e, no caso das águas balneares, não revelaram nenhuma ou pouca contaminação com os bacteriófagos F+RNA ou com os indicadores de *Bacteroidetes*. Em relação à descarga da saída urbana (Saint Pabu) para o estuário, reparámos que à medida que o nível de salinidade aumentava, a contaminação fecal diminuía com a diluição. Era mais difícil enumerar os bacteriófagos F+RNA e hibridar: pequenos halos de bacteriófagos com menos sucesso ao nível da hibridação.

Em relação aos canais de descarga rurais, no caso de Carpont, a água não foi bem misturada com as águas do estuário e não foi possível revelar contaminação suficiente que permitisse a caracterização. O canal de descarga de Keredern mostrou um valor de salinidade de 24‰ e foi pouco contaminado.

Na Irlanda, foram recolhidas amostras de água em locais específicos (estações) na bacia hidrográfica de Dargle em condições de fluxo-baixo (tempo seco) e fluxo-elevado (tempo húmido) e analisadas quanto à presença de indicadores *Bacteroidetes* ruminantes e humanos. Foi demonstrado no estudo prévio da bacia hidrográfica de Dargle (Bruen et al., 2001) que a ‘ordem de magnitude’ aumenta em concentrações indicadoras do organismo ocorridas em determinadas estações de amostragem de sub-bacia hidrográfica após situações de chuva, mas não noutras.

Tal como previsto a partir da utilização da terra e dos estudos microbiológicos de represa, independentemente das condições climáticas, as amostras de água de sub-bacias hidrográficas “urbanas” de Kilmacanogue, Swann e Kilruddery apresentavam o indicador

humano, ao passo que a sub-bacia hidrográfica de Glensoulan não. A sub-bacia hidrográfica de Glensoulan tem muito poucas povoações e muito pouca agricultura. Achou-se que o indicador humano era menos pronunciado em amostras de amostras da sub-bacia hidrográfica “rural” de Killough e County Brook. Nestas sub-bacias hidrográficas, as áreas construídas são pequenas, mas são evidentemente significativas no que diz respeito à poluição microbiana humana. Encontrou-se sempre o indicador humano nas amostras CSO Enniskerry.

Tabela 3: Resumo dos Resultados para cada uma das 4 Bacias hidrográficas

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

Afluente de Pemboa South	Mista	-(0/6)	+(1/6)	+(2/6)	-(0/6)	+(2/6)	Mista / Rural
Afluente de Rosevaer	Rural	+(1/10)	+(3/10)	-(0/10)	-(0/10)	+(3/10)	Mista / Rural
Mawgan Creek @ Ponte de Trelowarren Mill	Rural	-(0/10)	+(9/10)	-(0/10)	-(0/10)	+(1/10)	Urbana / Rural
Afluente de Caervallack Landrivick	Rural	-(0/10)	-(0/10)	-(0/10)	-(0/10)	+(1/10)	Rural
Helford slipway	Rural	-(0/8)	+(2/8)	-(0/8)	-(0/8)	+(5/8)	Urbana / Rural
Lanarth	Rural	-(0/4)	-(0/4)	-(0/4)	+(4/6)	+(2/6)	Desconhecido /Mista
Carne	Rural	+(2/10)	+(4/10)	+(1/10)	+(1/10)	+(3/10)	Desconhecido /Mista
		+(3/6)	+(3/6)	+(2/6)	+(2/6)	+(1/6)	Mista

+ = Detecção de indicador - = Indicador não detectado NE = Não executado/ bacteriófago não detectado / abaixo do limiar de hibridação de 20 halos.

Os valores entre parêntesis são o número de amostras que deram resultado positivo em relação ao número total de amostras.

O indicador ruminante nunca esteve presente nas amostras de sub-bacias hidrográficas de Swan e Kilruddery; estas apresentam pouca utilização da terra. No entanto, esteve presente após uma intensa chuva a 24 de Julho de 2005 em amostras da sub-bacia hidrográfica de Kilmacanogue, mas não depois de uma outra queda de chuva a 29 de Julho de 2005; a proporção da utilização da terra agrícola nesta sub-bacia hidrográfica é significativa, e evidentemente suficiente para, por vezes, aumentar a poluição microbial detectável de fontes agrícolas.

Encontrou-se com maior frequência o indicador ruminante em amostras de sub-bacias hidrográficas de Glensoulan e County Brook: o primeiro é dominado por florestas e pastoreio de ovelhas em charnecas, o último pela exploração laticínia e de terrenos aráveis; mas em relação à sub-bacia hidrográfica de Killough, que tem a maior quantidade e proporção de gado em pastoreio intensivo e pasto de gado bovino, o indicador só foi encontrado depois de uma chuva intensa.

Em todas as amostras, o número de bacteriófagos F+RNA detectado era abaixo dos 20 halos e, nesse sentido, não foi realizado nenhum teste de hibridação em relação a estas amostras.

Na bacia hidrográfica portuguesa, pensou-se que havia 4 lugares “mistos”, 2 “rurais” e 3 “urbanos” antes da conclusão do estudo. Oito dos nove locais deram resultado positivo tanto para o indicador humano, como para o indicador *Bacteroidetes* bovino. Os indicadores não foram detectados em todas as ocasiões de amostra e alguns locais apenas apresentaram um resultado positivo fraco. O único local com resultado negativo para ambos os indicadores, em cada ocasião de amostra foi Pintados no reservatório de Montargil. Aquando da validação dos indicadores *Bacteroidetes* verificou-se que em Portugal o indicador CF128f-Bac708r tinha um

nível baixo de especificidade e dava resultados positivos a partir de fontes humanas. Tal poderia explicar os resultados positivos verificados com o indicador CF128f-Bac708r em todos os locais, incluindo aqueles designados como “urbanos”. O bacteriófago F+RNA foi de novo detectado em pouca quantidade, sendo o genótipo grupo II o mais comumente detectado.

No Reino Unido, nem todos os locais foram testados em relação a cada ocasião de amostragem e foram acrescentados novos locais durante o período de amostragem. A bacia hidrográfica de Helford, embora actualmente descrita como rural, na verdade tem muitas habitações isoladas com fossas sépticas devido ao facto de não existir rede de esgotos na bacia hidrográfica. Por isso, até uma pequena habitação pode ter um grande impacto sobre a qualidade da água.

A partir dos resultados obtidos, muitas das áreas tidas como rurais, na verdade sofreram, de alguma forma, com a intervenção humana, possivelmente a partir de fontes de fossas sépticas. Um facto que ressalta dos resultados é a questão da bacia hidrográfica ter um nível muito baixo de bacteriófagos F+RNA. Mesmo após a concentração de amostras para a análise de bacteriófagos F+RNA, os números isolados eram baixos ou abaixo do limite de detecção para o método. Tal era também uma característica para os indicadores genéticos *Bacteroidetes* – HF183f, CF128f – com apenas 14.7% (42/285) de amostras com resultado positivo para qualquer um dos indicadores. Uma vez que não foi executado nenhum indicador geral *Bacteroidetes* PCR em paralelo com as amostras no RU, sabe-se que a ausência de indicador, ou foi devida à entrada de poluição de uma fonte diferente – não Humana ou Bovina – ou não havia presença de *Bacteroidetes* DNA.

Quando foi isolado o bacteriófago F+RNA, foi normalmente efectuado em pequenas quantidades com menos que trinta halos disponíveis para a hibridação. Nos casos em que tal ocorreu, foram escolhidos halos individualmente e congelados até se verificar um número suficiente para a hibridação. Embora tenham sido obtidos resultados destes halos, devido à reduzida quantidade presente na amostra original, não é possível tirar qualquer ilação em relação ao tipo de fonte da poluição naquela altura, ainda que os resultados de hibridação possam dar uma indicação.

Os níveis de bacteriófago F+RNA isolado e a quantidade de indicadores *Bacteroidetes* PCR detectados parecem indicar um baixo nível de fundo de poluição que se encontra na bacia hidrográfica. Tal explicaria também algumas das diferenças encontradas entre análises repetidas da mesma amostra. O baixo nível de chuva verificado no período de amostragem teve também um impacto. Foram realizados mais outras duas ocasiões de amostragem em Setembro e Outubro após ou durante chuva intensa. Estas ocasiões revelaram um aumento do

número de *E.coli* e Enterococci Intestinal isolado, porém os níveis de bacteriófago F+RNA detectados permaneceram razoavelmente estáveis. Foi também observada uma segunda bacia hidrográfica grande no Noroeste de Inglaterra sob condições secas e húmidas. Tal revelou níveis elevados de bacteriófago F+RNA após e durante a chuva. Estes valores de bacteriófago F+RNA correspondiam a um aumento na presença de sinais de fontes animais. Tal indicaria que a bacia hidrográfica de Helford tem pouca entrada de bacteriófago F+RNA devido ao seu tamanho.

Resumo

O estudo efectuado nas bacias hidrográficas de Aber Benoit (França), Dargle (Irlanda), Montargil (Portugal) e Helford (RU) foi levado a cabo durante o período de Abril – Outubro de 2005. Foi analisado um total de 321 amostras, a distribuição de amostras por parceiro e tipo encontra-se na tabela 4.

Tabela 4: Distribuição de amostras por parceiro e tipo de área.

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

Embora tenha caído alguma chuva nas bacias hidrográficas de Dargle e Helford durante Outubro, a maior parte do trabalho foi efectuada durante um período de pouca ou nenhuma chuva. Nesse sentido, houve pouca oportunidade de testar extensivamente os métodos durante os períodos de escoamento agrícola elevado.

A maioria das amostras deu resultados de *E. coli* inferiores a 2000cfu por 100 ml como indicado na tabela 5

Tabela 5: Distribuição por parceiro e concentração de *E.coli*.

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

53.9% das amostras apresentavam uma concentração de *E.coli* inferior a 2000 cfu /100 ml. Deveu-se ao tempo seco e à subsequente falta de escoamento agrícola em todas as 4 bacias hidrográficas.

O método *Bacteroidetes* PCR foi avaliado tendo em conta as seguintes regras:-

Uma fonte de poluição humana positiva era apresentada se o indicador HF183f fosse positivo e o indicador CF128f negativo.

Uma fonte de poluição bovina era apresentada se o indicador HF183f fosse negativo e o indicador CF128f fosse positivo.

Apresentava-se uma fonte mista positiva se tanto o indicador HF183f como o CF128f fossem positivos.

Os resultados para o método de *Bacteroidetes* PCR estão indicados na tabela 6

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

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

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

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

O número de amostras classificadas aumentou com a concentração de *E. coli*.

Das amostras com resultados *E.coli* de <500 cfu /100ml apenas 15.7% estavam classificadas. Contrariamente, 81% das amostras com resultados *E.coli* de >15000 cfu /100 ml estavam classificadas.

Verificou-se que havia um requisito para o indicador geral DNA PCR ribossómico a ser executado em combinação com os outros dois indicadores. Tal actuaria como um controlo analítico interno e traria confiança em qualquer resultado negativo de indicador específico. O indicador geral permitiria também que a contaminação fecal adicional fosse atribuída a outra fonte que não a humana ou ruminante.

Os dados combinados para todas as quatro bacias hidrográficas resultaram em 45.8% de amostras rurais que foram categorizadas como contaminadas a partir de uma fonte animal. Tal aumenta para 62.9% quando os dados de Portugal são excluídos, devido à baixa especificidade do indicador CF128f em Portugal. Das amostras urbanas testadas 63.5% foram categorizadas como revelando contaminação de uma fonte humana, e das amostras mistas, 50 % indicavam provas de contaminação tanto de fonte animal como humana. Estes valores mudam para 90.9% para amostras urbanas e 30.8% para fontes mistas, mais uma vez, excluindo os dados de Portugal.

As amostras rurais da bacia hidrográfica de Aber Benoit na Bretanha foram todas classificadas como contaminadas a partir de uma fonte animal, ao passo que 89.5% das amostras urbanas revelaram provas de contaminação de fontes humanas.

Em relação à bacia hidrográfica de Dargle na Irlanda, 55.6% das amostras rurais foram classificadas como contaminadas a partir de fontes animais, 92.9% das amostras urbanas foram classificadas como contaminadas a partir de fonte humana e 66.7% das amostras foram classificadas como mistas, apresentavam tanto indicadores de fonte animal como humana.

Em relação à bacia hidrográfica de Montargil em Portugal, a maioria das amostras, independentemente de serem classificadas como rurais, urbanas ou mistas, apresentava tanto indicadores de fonte animal como humana.

A bacia hidrográfica de Helford no Sudoeste de Inglaterra é uma bacia rural sem áreas urbanas. 52.6% das amostras rurais apresentaram somente contaminação de fonte animal, e das amostras mistas, 85.7% revelaram somente fonte humana.

Na literatura e nos laboratórios de França, Portugal e Reino Unido tem sido revelado que os génotipos I e II são os mais frequentemente isolados (Brion et al, 2002).

Em águas residuais e nos sedimentos analisados (dados franceses), verificou-se que o génotipo II e III predominavam (sobre 75%) e em estrumes líquidos de porco, o génotipo I e IV encontravam-se na mesma proporção.

As características de sobrevivência de bacteriófagos F+ RNA pareciam variar com os génotipos: o grupo I apresentou os períodos mais longos de sobrevivência, seguido do génotipo II. Os génotipos III e IV apresentaram períodos de sobrevivência similares e os mais curtos de todos em relação aos bacteriófagos F+ RNA. (Long e Sobsey, 2004; Brion et al.,).

Os dados do método de bacteriófago F+ foram submetidos à mesma análise dos resultados como os *Bacteroidetes*. Em relação à análise estatística, as amostras revelaram ≥ 1 fago genotipificado como humano (Grupos II ou III) a contaminação da amostra foi considerada de origem animal. As amostras foram classificadas mistas, se tanto o génotipo I e IV como o II e III fossem positivos.

Tabela 7: Classificação de amostras que utilizam o método de bacteriófago F+RNA comparado com a classificação da amostra.

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

Tabela 8: Classificação de amostras nos casos em que a contagem de halos se situava em 20

			Classificado F+RNA		Total
			Não Classificado	Classificado	
F+RNA Halos	<20	Contagem	148	55	203
	20				

	% em F+ 20 halos	72.9%	27.1%	100%
>=20	Contagem	12	61	73
	% em F+ 20 halos	16.4%	83.6%	100%
Total	Contagem	160	116	276
	% em F+ 20 halos	58.0%	42.0%	100%

Como poderemos verificar a partir da tabela 8, nos casos em que 20 ou mais halos de bacteriófagos F+RNA foram isolados e submetidos à hibridação foram classificados mais de 83.6% de amostras, ao passo que abaixo dos 20 apenas foram classificados 27.1%.

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

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

Uma das limitações do método de genótipo de bacteriófago F+RNA está a isolar o número suficiente de halos de bacteriófago para classificar. Para que se obtenha um resultado seguro, teriam de ser hibridados um mínimo de 20 halos.

O indicador HF183f *Bacteroidetes* humano funcionou em todas os estudos das quatro bacias hidrográficas e foi um indicador forte da poluição fecal humana.

O indicador bovino de *Bacteroidetes* (CF128f) era específico para o gado bovino na bacia hidrográfica irlandesa, reagindo transversalmente com alguns porcos jovens em França e no R.U. Foi muito menos específico em Portugal. Foi, desta forma, um bom indicador animal em França, Irlanda e R.U., mas apresentava uma especificidade insuficiente para ser usada em Portugal. Os resultados do estudo da bacia hidrográfica em Portugal, que revelou indicadores mistos na maioria das amostras analisadas, podem indicar uma diferença nas práticas agrícolas e na drenagem de águas residuais, comparado com os de outros países participantes.

Tabela 9: Classificação de amostras por *Bacteroidetes* e bacteriófago F+ RNA

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

A tabela 9 ilustra a combinação entre os dois métodos sobre a classificação de amostras. Os dois métodos chegaram à conclusão que em 73.9% de amostras a poluição era da mesma fonte. 47.8% de fonte humana por ambos os métodos e 26.1% de fonte mista.

3. Conclusões

Os objectivos da Acção Piloto 3 do ICREW eram avaliar o estado actual de conhecimentos em relação ao rastreamento de fonte fecal e identificar e testar esses métodos significativamente bem desenvolvidos para permitir a análise no campo.

Foram identificados dois métodos como adequados para os testes de campo, o método *Bacteroidetes* PCR para indicadores de fonte humana e bovina e genotipificação de bacteriófagos F+RNA. Estes métodos foram testados em bacias hidrográficas em França, Irlanda, Portugal e R.U., durante o período de Abril a Outubro 2005.

O período de estudo foi um período de muito pouca chuva em todas as áreas de estudo, com pouca possibilidade de escoamento agrícola nas bacias hidrográficas em estudo. Os resultados dos estudos de campo foram consistentes com os resultados esperados, dado o conhecimento sobre a bacia hidrográfica e as condições climáticas predominantes. Os resultados revelaram baixos níveis de poluição de fonte humana, mesmo em bacias hidrográficas rurais. Havia pouca poluição de fonte animal na ausência de chuva significativa e de escoamento agrícola.

O indicador *Bacteroidetes* HF183f provou ser um indicador fiável de poluição de fonte humana, em todas as quatro áreas de estudo. O indicador bovino CF128f mostrou reagir transversalmente com os porcos no R.U., França, e revelou ser falível em Portugal. No entanto, nos estudos da bacia hidrográfica provou ser um indicador fiável de poluição de fonte animal em França, Irlanda e no R.U., mas falível em Portugal. Esta falta de especificidade do marcador CF128f na bacia hidrográfica portuguesa poderá reflectir as diferenças na produção animal ou na drenagem de águas residuais comparado com os outros países participantes.

O método de genotipificação de bacteriófago F+RNA parecia funcionar bem em França e no R.U., mas de forma menos consistente na Irlanda e Portugal. Tal poderá dever-se aos baixos níveis de poluição e, por isso, ao baixo número de bacteriófagos presentes nas amostras analisadas.

Uma das questões em torno do método de bacteriófago F+RNA foi o número de bacteriófagos isolados e, por isso, disponíveis para classificação. Verificou-se que para garantir um nível de confiança no resultado é necessário um mínimo de 20 halos de bacteriófago para classificação.

Os níveis de poluição verificados durante os estudos de bacia hidrográfica eram baixos. Nenhum dos métodos funcionou bem a baixos níveis de poluição, ou seja, nos casos em que as contagens de *E. coli* eram inferiores a 500 cfu por 100 ml. À medida que o nível de poluição aumenta como reflectido pelo aumento na contagem *E.coli*, ambos os métodos deram melhores resultados.

A sensibilidade de ambos os métodos pode ser melhorada, aumentando o volume da amostra analisada para um litro ou mais.

Pareceu ser mais fácil realizar o método de *Bacteroidetes* PCR que o método de genotipificação de bacteriófago F+RNA.

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

Uma das vantagens do Projecto ICREW é a forma através da qual permite que cientistas de vários países europeus partilhem o seu conhecimento e perícia para abordar questões comuns.

Ao participar na Acção Piloto 3, os cientistas envolvidos desenvolveram relações profissionais que serão importantes depois da vida útil do projecto.

4. Recomendações

Mais trabalho nas bacias hidrográficas durante o tempo húmido acrescentaria informação adicional sobre a performance dos métodos.

O indicador humano *Bacteroidetes* PCR HF183f pode ser eficazmente usado em bacias hidrográficas em França, Irlanda, Portugal e no R.U.

O indicador bovino *Bacteroidetes* PCR CF128f pode ser eficazmente usado como um indicador geral animal em bacias hidrográficas em França, Irlanda e no R.U.

O método de genotipificação de bacteriófago F+ RNA pode ser usado para diferenciar fontes animais e humanas de poluição fecal. No entanto, para que seja eficaz é necessário usar-se um mínimo de 20 halos para genotipificação.

Uma maior optimização dos métodos melhoraria a sua performance.

É necessário mais trabalho para identificar e desenvolver indicadores adicionais para grupos específicos de animais, ou seja, pássaros e porcos.

Desenvolver os métodos PCR em tempo real para utilizar com os iniciadores HF183f e CF128f de forma a fornecer resultados quantitativos.