



Greice Carvalho Brondani

Licenciada em Ciências Biomédicas

Identificação das fontes de contaminação fecal nas águas superficiais do Rio Tejo

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Genética Molecular e Biomedicina

Orientadora: Dra. Sílvia Monteiro

Co-orientador: Eng. Ricardo Santos

Júri:

Presidente: Paula Gonçalves

Arguente: Arsénio Fialho

Orientadora: Sílvia Monteiro

LABORATÓRIO DE ANÁLISES
INSTITUTO SUPERIOR TÉCNICO

Novembro 2015



Greice Carvalho Brondani

Licenciada em Ciências Biomédicas

Identificação das fontes de contaminação fecal nas águas superficiais do Rio Tejo

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Genética Molecular e Biomedicina

Orientadora: Dra. Sílvia Monteiro

Co-orientador: Eng. Ricardo Santos

Júri:

Presidente: Paula Gonçalves

Arguente: Arsénio Fialho

Orientadora: Sílvia Monteiro

LABORATÓRIO DE ANÁLISES
INSTITUTO SUPERIOR TÉCNICO

Novembro 2015

Identificação das fontes de contaminação fecal nas águas superficiais do Rio Tejo

Copyright Greice Carvalho Brondani, FCT/UNL, UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer aos meus orientadores Sílvia Monteiro e Ricardo Santos pela oportunidade de estágio, assim como pelo apoio, pela disponibilidade, pelo esforço, por toda a informação facultada e principalmente pela paciência e tempo que sempre demonstraram possuir em apoiar este trabalho.

Aos meus colegas de trabalho, pelo acolhimento e simpatia, pelos momentos divertidos e descontraídos, tornando mais fáceis as horas de maior dificuldade, e fazendo o local de trabalho um ambiente alegre.

A todos os meus amigos e colegas pelo apoio, compreensão e ajuda em todos os momentos, bons ou nem tão bons, em que passamos, não só neste último ano, mas ao longo de todo o curso.

À minha família, em especial meus Pais e minha irmã, que mesmo de longe sempre me ajudaram e me apoiaram de diversas maneiras, para que este momento fosse possível. Sem vocês nunca chegaria onde cheguei. **Muito obrigada.**

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para alcançar este objetivo, em especial minha prima Edna, que sempre me ajudou em todos os momentos de maior dificuldade, nunca medindo esforços para que pudesse continuar a seguir em frente e conseguisse cumprir meus objetivos. O meu sincero obrigada.

RESUMO

As águas são potenciais vias de infecção, pois servem como veículos para disseminação de possíveis microrganismos patogênicos que podem levar a surtos. Por isso é importante manter os ambientes aquáticos livres de microrganismos. Para isso é necessário a constante monitorização desses ambientes. Isto é realizado através da utilização de microrganismos indicadores (FIB), que sugerem o nível de poluição fecal da água. Porém, tem sido demonstrado que os FIB possuem graves falhas na identificação de certos tipos de microrganismos, como por exemplo, os vírus, assim como na identificação da fonte de contaminação fecal. A partir disso surgiu o *Microbial Source Tracking* (MST), que tem como objetivo principal a identificação específica do hospedeiro ou ambiente causador da contaminação fecal. Neste estudo foram utilizadas uma combinação de diferentes métodos, sendo a maioria destas técnicas moleculares, para fornecer uma nova abordagem prática, viável e integrável a partir da utilização das amostras ambientais retiradas do Rio Tejo. Para isso foram efetuadas colheitas totalizando 73 amostras em quatro pontos diferentes no rio Tejo: VFX, MPN, ALC e Belém. Nestes pontos foram analisados quantitativamente os marcadores bacteriológicos *E. coli* e EF; os considerados potenciais indicadores de vírus, CS e Bacteriófagos de GB-124 e marcadores moleculares HAdV, mtDNA humano, bovino, suíno e de aves de consumo humano. Foram encontradas positivities para todos os pontos, com 99% para *E. coli*, 97% para EF, 99% para CS, 1% para Bacteriófagos de GB-124, 40% para HAdV, 90% para mtDNA humano, 92% mtDNA bovino, 58% mtDNA suíno, 37% mtDNA de aves de consumo humano. Estes marcadores foram também correlacionados, e devido à fraca correlação encontrada, os resultados indicam que as informações fornecidas pelos indicadores bacteriológicos e CS são diferentes das informações obtidas pelos indicadores moleculares.

Palavras-chave: MST, microrganismos indicadores, águas, mtDNA, HAdV, Colifagos somáticos.

ABSTRACT

Water is a potential source of infection, because it serve as a vehicle for putative pathogenic microorganisms' dissemination that may lead to outbreaks. Therefore, is important to maintain the aquatic environments free of microorganisms. For that, a constant monitoring of these environments is required. This monotoring is performed by using Fecal Indicator Bacteria (FIB) that indicates fecal level of pollution of the water. However, it has been established that FIB hold serious flaws identifying certain types of microorganisms, like virus, as well as identifying the fecal contamination source. From these evidences, the use of Microbial Source Tracking (MST) has emerged, aiming the identification of the specific host as well as the environment responsible for fecal contamination.

In this study, a combination of methods was used, most of them molecular techiques, in order to provide a new practical approach, viable and integrable, by using environmental samples removed from Rio Tejo. To do that, the water was collected from four points of Rio Tejo – VFX, MPN, ALC and Belém- making a final amount of 73 samples. In this four points, the following bacteriologic markers were quantitatively analysed: *E.coli* and fecal Enterococcus; the virus potential indicators – CS and GB-214 bacteriophages, and finally, the molecular markers HAdv and mtDNA from human, porcine, bovine and birds for human consumption. Positive results were found in all points, with the scores of 99% for *E.coli*, 97% for Enterococcus, 99% for CS, 1% for GB-124 bacteriophages, 40% for HAdV, 90% for human mtDNA, 92% for bovine mtDNA, 58% for porcine mtDNA and 37% for birds for human consumption mtDNA. These markers were also correlated and due to the low correlation that was found, this results indicate that the information obtained from bacteriologic indicators and CS are different from the one obtained using molecular markers.

Key-words: MST, FIB, water, mtDNA, HAdV, Somatic Coliphages.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	III
RESUMO	V
ABSTRACT.....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE ABREVIATURAS	XV
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 CONTROLO DE QUALIDADE DA ÁGUA	1
1.2 INDICADORES MICROBIOLÓGICOS CLÁSSICOS.....	5
1.2.1 <i>Escherichia coli</i>	6
1.2.2 <i>Enterococos fecais</i>	7
1.3 INDICADORES MICROBIOLÓGICOS ALTERNATIVOS	8
1.4 MICROBIAL SOURCE TRACKING (MST)	9
1.4.1 Bacteriófagos	12
1.4.2 Colifagos somáticos	13
1.4.3 Bacteriófagos F-RNA específicos.....	14
1.4.4 Bacteriófagos de <i>Bacteroides fragilis</i>	14
1.4.5 Bacteriófagos de <i>B. fragilis</i> em MST.....	15
1.4.6 Vírus entéricos.....	16
1.4.7 Adenovirus.....	17
1.4.8 Adenovirus em MST.....	18
1.4.9 DNA mitocondrial	19
1.4.10 DNA mitocondrial em MST	20
1.5 QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS POR QPCR.....	21
1.6 OBJETIVO DO ESTÁGIO.....	21
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
2.1 LOCAIS DE COLHEITA E COLHEITA DE AMOSTRAS.....	23
2.2 QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE MICRORGANISMOS INDICADORES EM AMOSTRAS DE ÁGUA	26
2.3 PROCEDIMENTO DE ISOLAMENTO E QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE COLIFAGOS SOMÁTICOS COM AMOSTRAS DIRETAS	27
2.3.1 Concentração, isolamento e quantificação do número de Colifagos Somáticos nas amostras de água	28
2.4 ISOLAMENTO E QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE BACTERIÓFAGOS DE <i>B. FRAGILIS</i> NAS AMOSTRAS DE ÁGUA.....	29
2.5 CONCENTRAÇÃO DE AMOSTRAS PARA DETEÇÃO DE DNA MITOCONDRIAL.....	30
2.6 CONCENTRAÇÃO DE AMOSTRAS PARA DETEÇÃO DE ADENOVIRUS.....	31
2.7 EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS.....	32
2.8 QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS POR QPCR	32
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
3.1 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DOS INDICADORES MICROBIOLÓGICOS CLÁSSICOS E DOS MARCADORES MST	37
3.2 AVALIAÇÃO DOS INDICADORES	38
3.3 MARCADORES POR PONTO	43
3.3.1 <i>Escherichia coli</i>	43
3.3.2 <i>Enterococos Fecais</i>	44
3.3.3 Colifagos somáticos	46
3.3.4 Adenovirus.....	47

3.3.5 DNA mitocondrial Humano.....	48
3.3.6 DNA mitocondrial de Bovinos.....	49
3.3.7 DNA mitocondrial de Suínos.....	50
3.3.8 DNA mitocondrial de Aves de consumo humano.....	50
3.4 CORRELAÇÕES ENTRE OS MARCADORES MICROBIOLÓGICOS CLÁSSICOS E COLIFAGOS SOMÁTICOS ...	51
3.5 CORRELAÇÕES ENTRE OS MARCADORES MICROBIOLÓGICOS E MARCADORES MOLECULARES	54
4 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	63
5 BIBLIOGRAFIA.....	65
6 ANEXOS.....	I
ANEXO A – PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES PARA CONCENTRAÇÃO DE ADENOVÍRUS	I
ANEXO B – PREPARAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA PARA PESQUISA DE COLIFORMES SOMÁTICOS E BACTEROIDES DE <i>B. FRAGILIS</i>	I
ANEXO C – PREPARAÇÃO DOS INÓCULOS PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COLIFAGOS SOMÁTICOS E BACTERIÓFAGOS DE <i>B. FRAGILIS</i>	V
ANEXO D – PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES PARA CONCENTRAÇÃO DE INDICADORES MICROBIOLÓGICOS NA ÁGUA VI	
ANEXO E – QUANTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS INDICADORES.....	VII
ANEXO F – DADOS DE TEMPERATURA E PLUVIOSIDADE NO PERÍODO DE MONITORIZAÇÃO DAS ÁGUAS	VIII
ANEXO G – TABELA DE RESULTADO.....	XII
ANEXO H – TABELA DAS CARACTERÍSTICAS DAS ÁGUAS NOS DIAS DE COLHEITAS.....	XV

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1) <i>Escherichia coli</i> em microscópio eletrônico de varredura.....	6
Figura 2) <i>Enterococcus faecalis</i> em Microscopia eletrónica de varredura	7
Figura 3) <i>Bacteroides fragilis</i> em microscópio	14
Figura 4) Estrutura física de Bacteriófagos de <i>Bacteroides fragilis</i> por microscopia eletrónica de transmissão	15
Figura 5) Representação da estrutura de um adenovírus	18
Figura 6) Localização da mitocôndria dentro da célula	20
Figura 7) DNA mitocondrial humano	20
Figura 8) Pontos das colheitas realizadas ao longo do rio Tejo	24
Figura 9) Localização das ETAR's na cidade de Lisboa.....	25
Figura 10) Concelhos abrangidos pelo Sistema Multimunicipal de Saneamento do Tejo e Trancão ...	25
Figura 11) Criações de bovinos, suínos e aves de consumo humano nas proximidades das zonas abrangidas pelas ETAR's	26
Figura 12) Curva de amplificação da reta de calibração de humanos obtida por qPCR	34
Figura 13) Percentagem de positividade de todos os dias e todas as amostras.....	38
Figura 14) Resultados obtidos para os marcadores analisados <i>E. coli</i> , EF; CS; Bacteriófagos de <i>B. fragilis</i> ; HAdV; mtDNA humano, mtDNA bovino; mtDNA suíno; mtDNA aves nos diferentes locais de amostragem.....	39
Figura 15) Percentagens de todos os marcadores analisados durante o período de colheitas nos pontos de VFX; MPN; ALC e Belém	40
Figura 16) Concentração de <i>E. coli</i> nos diferentes pontos de colheita.....	44
Figura 17) Concentração de EF nos diferentes pontos de colheita	46
Figura 18) Concentração de Colifagos somáticos nos diferentes pontos de colheita.....	47
Figura 19) Concentração de Adenovirus humanos nos diferentes pontos de colheita.....	47
Figura 20) Concentração de DNA mitocondrial humano nos diferentes pontos.....	48
Figura 21) Concentração de DNA mitocondrial bovino nos diferentes pontos.....	49
Figura 22) Concentração de DNA mitocondrial suíno nos diferentes pontos.....	50
Figura 23) Concentração de DNA mitocondrial de aves nos diferentes pontos.....	51
Figura 24) Correlação de EF e <i>E. coli</i> , CS e <i>E. coli</i> ; CS e EF no ponto MPN.....	52
Figura 25) Correlação de EF e <i>E. coli</i> , CS e <i>E. coli</i> ; CS e ES no ponto de Belém	52
Figura 26) Correlação de ES e <i>E. coli</i> , CS e <i>E. coli</i> ; CS e EF no ponto de VFX.....	53
Figura 27) Correlação de EF e <i>E. coli</i> , CS e <i>E. coli</i> ; CS e EF no ponto de ALC.....	53
Figura 28) Correlação da bactéria <i>E. coli</i> com os marcadores moleculares HAdV, DNA mitocondrial de humano, DNA mitocondrial de bovinos, DNA mitocondrial de suínos e DNA mitocondrial de aves do ponto de colheitas localizado na MPN	55
Figura 29) Correlação do marcador EF com os marcadores moleculares HAdV, DNA mitocondrial de humano, DNA mitocondrial de bovinos, DNA mitocondrial de suínos e DNA mitocondrial de aves do ponto localizado na MPN.....	56
Figura 30) Correlação de CS com os marcadores moleculares HAdV, DNA mitocondrial de humano, DNA mitocondrial de bovinos, DNA mitocondrial de suínos e DNA mitocondrial de aves do ponto localizado na MPN	56
Figura 31) Correlação do marcador <i>E. coli</i> com os marcadores moleculares HAdV, DNA mitocondrial de humano, DNA mitocondrial de bovinos, DNA mitocondrial de suínos e DNA mitocondrial de aves do ponto de Belém.....	57
Figura 32) Correlação do marcador EF com os marcadores moleculares HAdV, DNA mitocondrial de humano, DNA mitocondrial de bovinos, DNA mitocondrial de suínos e DNA mitocondrial de aves do ponto de Belém.....	57
Figura 33) Correlação de CS com os marcadores moleculares Adenovirus humano, DNA mitocondrial de humano, DNA mitocondrial de bovinos, DNA mitocondrial de suínos e DNA mitocondrial de aves do ponto localizado em Belém	58

Figura 34) Correlação de <i>E. coli</i> com os marcadores moleculares HAdV, DNA mitocondrial de humano, DNA mitocondrial de bovinos, DNA mitocondrial de suínos e DNA mitocondrial de aves do ponto localizado em VFX.....	58
Figura 35) Correlação de EF com os marcadores moleculares HAdV, DNA mitocondrial de humano, DNA mitocondrial de bovinos, DNA mitocondrial de suínos e DNA mitocondrial de aves do ponto localizado em VFX.....	59
Figura 36) Correlação de CS com os marcadores moleculares HAdV, DNA mitocondrial de humano, DNA mitocondrial de bovinos, DNA mitocondrial de suínos e DNA mitocondrial de aves do ponto localizado em VFX.....	59
Figura 37) Correlação de <i>E. coli</i> com os marcadores moleculares HAdV, DNA mitocondrial de humano, DNA mitocondrial de bovinos, DNA mitocondrial de suínos e DNA mitocondrial de aves do ponto localizado em ALC.....	60
Figura 38) Correlação de EF com os marcadores moleculares HAdV, DNA mitocondrial de humano, DNA mitocondrial de bovinos, DNA mitocondrial de suínos e DNA mitocondrial de aves do ponto localizado em ALC.....	60
Figura 39) Correlação de EF com os marcadores moleculares. HAdV, DNA mitocondrial de humano, DNA mitocondrial de bovinos, DNA mitocondrial de suínos e DNA mitocondrial de aves do ponto localizado em ALC.....	61
Figura 40) Valores de temperatura máxima e mínima diários em Lisboa, para os meses de colheitas..	ix
Figura 41) Valores diários de precipitação nos meses de realização das colheitas	xi

ÍNDICE DE TABELAS	
Tabela 1) Tabela de surtos reportados na União Europeia entre os anos de 2008 e 2012	4
Tabela 2) Comparação das vantagens e desvantagens de cada <i>Microbial Source Tracking</i> baseados em genotipagem e fenotipagem.....	11
Tabela 3) Concentração de vírus entéricos humanos em águas de mar	17
Tabela 4) <i>Primers</i> e sondas utilizados para a detecção de HAdV, mtDNA de Humanos, mtDNA de Bovinos, mtDNA de Suínos, mtDNA de Aves, respectivamente	36
Tabela 5) Reagentes e quantidades utilizados na preparação de SM	i
Tabela 6) Reagentes e quantidades necessárias para a preparação da solução de Phosphate buffer.....	i
Tabela 7) Componentes e quantidades para preparação da solução de Na ₂ CO ₃	i
Tabela 8) Reagentes e quantidades para a preparação da solução de MgCl ₂	ii
Tabela 9) Reagentes e quantidades utilizadas na preparação do meio MSB para Colifagos somáticos .	ii
Tabela 10) Reagentes e quantidades utilizadas na preparação do meio MSA basal para Colifagos somáticos.....	ii
Tabela 11) Reagentes e quantidades utilizadas para preparação de Cloreto de cálcio.....	iii
Tabela 12) Reagentes e quantidades necessários para completar o meio de cultura MSA, para Colifagos somáticos	iii
Tabela 13) Quantidades e reagentes utilizados na preparação do meio BPRMB para bacteriófagos de <i>Bacteroides</i>	iii
Tabela 14) Reagentes e quantidades necessários para a preparação de NaOH 1M.....	iv
Tabela 15) Reagentes e quantidades utilizadas para a preparação da solução de hemina.....	iv
Tabela 16) Quantidades e reagentes utilizados para completar o meio de cultura após esterilização por autoclave.....	iv
Tabela 17) Compostos e quantidades utilizados para a preparação do meio BPRMA, para bacteriófagos de <i>Bacteroides</i>	v
Tabela 18) Reagentes e quantidades utilizados para completar o meio de cultura BPRMA, após autoclavado.....	v
Tabela 19) Reagentes e quantidades necessárias para preparação de uma solução 4,14 M de MgCl ₂ .6H ₂ O	vi
Tabela 20) Quantidades e reagentes necessárias para a preparação do eluente na concentração de Colifagos somáticos	vii
Tabela 21) Interpretação dos resultados obtidos a partir de Enterolert	vii
Tabela 22) Interpretação dos resultados obtidos a partir de Colilert-18.....	vii
Tabela 23) Tabela de todos os resultados obtidos neste estudo de todos os pontos e datas de colheitas	xiv
Tabela 24) Características das águas em cada ponto nos dias das colheitas	xv

LISTA DE ABREVIATURAS

°C – grau Celsius

ALC - Alcântara

B. fragilis – *Bacteroides fragilis*

BPRMA – *Bacteroides Phage Recovery Medium Agar*

BPRMB – *Bacteroides Phage Recovery Medium Broth*

CaCl₂ – Cloreto de cálcio

CT – Coliformes Totais

CF – Coliformes Fecais

CS – Colifagos Somáticos

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

E. coli – *Escherichia coli*

EF – Enterococos Fecais

ETAR's – Estações de Tratamento de Águas Residuais

FIB – Bactérias indicadoras de contaminação fecal (*Fecal Indicator Bacteria*)

h – Horas

HCl – ácido clorídrico

L – Litros

M – concentração Molar

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

min - Minutos

mL – mililitros

MPN – Marina do Parque das Nações

MSA – *Modified Scholtens' Agar*

MSB – *Modified Scholtens' Broth*

mtDNA – DNA mitocondrial

Na₂CO₃ - Carbonato de sódio

O.N – *Over Night* (deixado de um dia para o outro)

PB – *Phosphate Buffer*

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

RNA – Ácido Ribonucleico

RPM – Rotações por minuto

qPCR – *Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction*

SM – *Skimmed Milk*

ssBPRMA – *Semi-Solid Bacteroides Phage Recovery Medium Agar*

ssMSA – *Semi-Solid Modified Scholtens' Agar*

UE – União Européia

Ug – Unidade genómica

U.V – Ultra Violeta

PFU – *Plaque Forming Unit*

VFX – Vila Franca de Xira

1 INTRODUÇÃO

1.1 Controlo de qualidade da água

A preocupação com a qualidade da água tem aumentado com o passar dos anos, devido a frequentes contaminações dos recursos hídricos por bactérias, vírus e protozoários patogénicos (Cunha *et al.*, 2012; Savictheva e Okabe, 2006), causando um número elevado de surtos (Payment *et al.*, 2003). Em países em desenvolvimento, as doenças de veiculação hídrica representam um dos mais graves problemas de saúde pública (Ferreira, 2003). As águas de esgotos domésticos e industriais, que não são tratadas ou são sujeitas a tratamentos inadequados, são descarregadas em rios, lagos e oceanos. Estas águas residuais contêm uma quantidade muito grande de microrganismos de origem animal e humana, e são a fonte principal de contaminação dos ambientes aquáticos naturais (Bosch *et al.*, 1991; Ferreira, 2003).

As águas dos esgotos despejados nos ambientes aquáticos podem possuir diversos tipos de microrganismos patogénicos, tais como *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Aeromonas*, protozoários como *Cryptosporidium* e *Giardia* e vários tipos de vírus, incluindo adenovirus, rotavirus, norovirus, virus da hepatite A, entre outros (Savictheva e Okabe, 2006; Martellini *et al.*, 2005; Gantzer *et al.*, 1998).

É de suma importância, tanto para os consumidores de água, como fornecedores de água e autoridades de saúde pública, a proteção das águas utilizadas para recreação e necessidade humana, nomeadamente as águas das praias, água para consumo humano e água para rega contra agentes patogénicos (Martellini *et al.*, 2005; Simpson *et al.*, 2002; Scott *et al.*, 2002; Payment *et al.*, 2003). A contaminação desses sistemas pode representar um alto risco à saúde humana, como também pode acarretar em significativas perdas económicas devido à necessidade de encerramento de praias, zonas de pesca e sítios de lazer que envolvam recursos hídricos contaminados (Scott *et al.*, 2002; Payment *et al.*, 2003).

Atividades recreativas que utilizem a água como base são todas potenciais vias de infeção, e, portanto, como já referido, podem levar a surtos (Martellini *et al.*, 2005; Payment *et al.*, 2003). Durante 1999-2000, houve um total de 39 surtos associados à água potável contaminada em 25 estados dos Estados Unidos. Estes surtos causaram graves doenças gastrointestinais à aproximadamente 2.068 pessoas e causaram duas mortes (Lee *et al.*, 2002). Em 1993, houve um surto de cryptosporidiosis, em Milwaukee, nos Estados Unidos. Foi estimado um total de 400.000 pessoas que sofreram sintomas gastrointestinais, na maioria dos casos foi reportada a causa da infeção o protozoário *Cryptosporidium*, transportado pela água (Hunter e Syed, 2001). O número de surtos que vem sendo reportados (Tabela 1) demonstra que os microrganismos patogénicos que são transmitidos pela água potável permanecem uma causa significativa de doenças (Payment *et al.*, 2003; Hunter e Syed, 2001; Lee *et al.*, 2002).

Microrganismos	Cenário	País	Evidências de surtos				Informação adicional
			N	Casos	Hospitalizações	Mortes	
2012							
Calicivirus –Norovirus (NoV)		Dinamarca	1	183	0	0	Água contaminada após reparação em tubulação de água
	Escola, primária	Grécia	1	79	0	0	Água da torneira em escola primária
Calicivirus - Sapovirus (SoV)	Cozinha doméstica	Finlândia	1	225	0	0	Sistema de distribuição de água
Cryptosporidium – C. parvum	Casos disseminados	Irlanda	1	11	3	0	Água de superfície tratada pública
Escherichia coli (EC), pathogenic – Verotoxigenic EC (VTEC) – VTEC 0157	Cozinhas domésticas	Irlanda	2	2	1	0	
			1	2	-	-	Abastecimento de água privado
	Outros motivos		1	27	-	-	Água de poço tratada
			3	3	2	0	Água de poço
			1	6	0	0	Águas subterrâneas e de poço não tratadas
EC, pathogenic – VTEC – VTEC 026	Cozinha doméstica	Irlanda	1	1	0	0	
			1	2	-	0	Águas de poço e águas subterrâneas
Rotavirus	Cozinha doméstica	Grécia	1	552	2	0	Água tratada de um Sistema de abastecimento de água de uma área rural
Unknown	Cozinha doméstica	Finlândia	1	20	0	0	
EU Total			16	1,113	8	0	
2011							
Calicivirus – including NoV	Cozinha doméstica	Finlândia	3	54	0		Em um dos surtos, houve falha no tratamento, assim como no isolamento de <i>Campylobacter</i>
	Outros motivos		1	8	0	0	
Campylobacter – C. jejuni	Restauração coletiva temporária (feiras, festivais)	Bélgica	1	64	0	0	Ingrediente não processado contaminado
	Cozinha doméstica	Finlândia	1	10	0	0	
Cryptosporidium hominis	Casos disseminados	Suécia	1	20,000	46	0	
EC, pathogenic – VTEC – VTEC 0157	Cozinha doméstica	Irlanda	1	3	-	-	
	Casos disseminados						

	Cozinha doméstica		1	20	7	0	Suspeita de água de fonte ter sido contaminada com fezes de animais
			1	2	0	-	
Unknown	Cozinha doméstica	Finlândia	1	6	0	0	Sistema de distribuição de água
	UE Total		11	20,167	53	0	

2010

Calicivirus – including NoV	Casos Disseminados	Bélgica	1	3,000	-	-	
	Água de poço	Finlândia	1	17	0	0	
	Restaurante, café, pub, bar, hotel	Irlanda	1	50	0	0	
Campylobacter spp., unspecified	Casos disseminados, Restaurante, café, pub, bar, hotel	Suécia	3	1,015	0	0	
	Água de torneira	Dinamarca	1	400	0	0	
	Água de torneira incluindo água de poço	Dinamarca ¹	1	400	0	0	Água do mar engolida durante uma prova de natação em um evento de triathlon
	Abastecimento de água potável privado	Reino Unido	1	44	0	0	
Salmonella Enteritidis	Cozinha privada	Polónia	1	11	4	0	
Other bacterial agents	Restaurante, café, bar, hotel	Polónia	2	56	0	0	
Cryptosporidium hominis	Casos disseminados	Suécia	1	12,700	0	0	
	UE Total		14	17,733	4	0	

¹Outros agentes detectados: ETEC, Giardia

2009

Calicivirus – including NoV	Água de poço não tratada	Finlândia	1	74	0	0	
	Vazamento de águas residuais		1	117	0	0	
Campylobacter – C. jejuni	Desconhecido	Suécia	1	173	0	0	
	Outras causas	Dinamarca	1	500	3	0	
	Água de torneira tratada	Grécia	1	60	14	0	Água tratada do Sistema de abastecimento de água de uma área rural em ilha grega
Campylobacter spp.	Desconhecido	França	1	11	1	0	
EC, pathogenic – VTEC – VTEC 0157	Cozinha doméstica	Irlanda	4	8	3	0	
EC, pathogenic	Desconhecido	Suécia	1	4	0	0	

<i>Shigella flexneri</i>	Desconhecido	França	1	4	4	0	
<i>Shigella spp., unspecified</i>	Desconhecido	França	1	15	10	0	
Unknown	Desconhecido	França	1	15	10	0	
	Cozinha doméstica	Polónia	1	6	0	0	
UE Total			15	987	45	0	
2008							
<i>Campylobacter – C. jejuni</i> ²	Sistema de distribuição	Suíça	1	185	-	0	Problema técnico no Sistema de distribuição de água da torneira
<i>Campylobacter spp.</i>	Campo	França	1	15	0	0	
EC	Outras causas	França	1	8	6	0	
EC, pathogenic – VTEC – VTEC 0157	Poço privado	Irlanda	3	14	5	0	Contaminação por poço privado de família
Calicivirus – including NoV		Suécia	1	2,000	-	-	
	Sistema de distribuição	Hungria	1	597	4	0	O encanamento do município era muito velho e sem Sistema de esgoto. Por conseguinte, a água da torneira estava contaminada
<i>Shigella flexneri</i>	Cozinha	França	1	3	3	0	
<i>Francisella tularensis</i>	Água privada	Noruega	1	15	3	0	O surto foi causado por uma contaminação das fontes de água privada com roedores mortos ou fezes de roedores infectados. O agente só foi isolado a partir de casos humanos
<i>Salmonella Enteritidis</i>	Cozinha doméstica	Espanha	1	8	0	0	Abastecimento de água privado fornecendo a mais de um agregado familiar
<i>Salmonella typhimorium</i>	Cozinha doméstica	Espanha	1	2	1	0	Abastecimento doméstico individual (poço privado)
UE Total			12	2,847	22	0	

²Além disso, infecção com NoV, VTEC, ETEC

Tabela 1) Tabela de surtos reportados na União Europeia entre os anos de 2008 e 2012

As bactérias estão entre os poluentes biológicos que mais afetam as águas de rios e córregos e podem fornecer informação de possível contaminação fecal nas águas de recreação. É importante, por tanto, o monitoramento constante das águas. Esse monitoramento é realizado através da utilização de microrganismos indicadores (Simpson *et al.*, 2002). Esses organismos indicadores são microrganismos que não são necessariamente patogênicos, porém sua presença na água pode indicar a presença de organismos que podem ser patogênicos e prejudiciais à saúde humana (Payment *et al.*, 2003).

1.2 Indicadores microbiológicos clássicos

O método mais comum para avaliar a probabilidade da presença de microrganismos patogênicos na água é através do uso dos indicadores microbiológicos fecais (FIB) como, por exemplo, Coliformes Totais (CT), Coliformes Fecais (CF), *Escherichia coli* (*E. coli*) e Enterococos Fecais (EF) (Martellini *et al.*, 2005; Simpson *et al.*, 2002). Os CT foram o primeiro grupo de bactérias utilizadas na avaliação da contaminação fecal existente e é formado por diversos gêneros: *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella*. Os CT habitam o intestino de mamíferos, incluindo o homem, por isso a detecção desse microrganismo em amostras de água não determina a fonte da contaminação (Cunha e Silva, 2006). Adicionalmente, o grupo é constituído por diversas espécies saprófitas, que se replicam no ambiente e não são de origem fecal. Os CT são bactérias gram-negativas, aeróbias facultativas, ou seja, sobrevivem tanto na presença de oxigênio como na ausência do mesmo, e não formam esporos. São capazes de fermentar lactose com produção de ácido e gás em 48 h a uma temperatura de 37°C. Os CT não são exclusivamente indicadores de contaminação fecal, mas podem ser indicadores da eficácia do tratamento e integridade do sistema de tratamento de água. Dos gêneros pertencentes ao grupo dos Coliformes, apenas *E. coli* tem como habitat primário o trato intestinal humano e de animais de sangue quente. Os outros – *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella* -, além de estarem presentes nas fezes, também se encontram em outros ambientes como a vegetação e o solo, onde persistem por mais tempo que as bactérias patogênicas de origem intestinal como a *Salmonella* e *Shigella* (Franco, 2003). Os CF têm as mesmas características que os CT, porém estão estritamente associados à matéria fecal. Nas fezes humanas, estima-se que 96,4% dos CT são fecais. Caracterizam-se pela sua capacidade de fermentar lactose com produção de ácido e gás em 48 h, a uma temperatura de 44°C. A espécie que melhor representa os CF é a *E. coli* (Figura 1), sendo esta a bactéria mais utilizada para análise e controle de águas (Cunha e Silva, 2006).

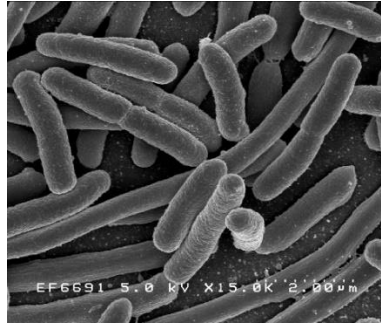


Figura 1) *Escherichia coli* em microscópio eletrônico de varredura (retirada de www3.niaid.nih.gov)

Os FIB têm sido utilizados ao longo dos anos para determinar a existência de uma potencial contaminação fecal, e, como tal, a possível presença de patógenos entéricos humanos (Simpson *et al.*, 2002; McMinn *et al.*, 2014).

Para que um microrganismo seja considerado como indicador deverá obedecer a diversos critérios. O indicador ideal deverá assemelhar-se aos microrganismos patogênicos que podem estar presentes na água, e para isso necessitam ter as mesmas características, como por exemplo: ter como habitat o trato intestinal de humanos e outros animais, não se multiplicar na água em condições naturais, ter características de sobrevivência semelhantes tanto no meio ambiente como a tratamentos de desinfecção e deverá, idealmente, não ser um microrganismo patogênico (McMinn *et al.*, 2014). Deverá encontrar-se em elevadas densidades populacionais no ambiente, em proporcionalidade direta (matéria fecal e águas contaminadas), e as técnicas laboratoriais utilizadas na sua detecção deverão ser simples, rápidas e não originar resultados duvidosos (Cunha e Silva, 2006). Contudo, até à data, nenhum indicador bacteriológico utilizado possui todos os critérios de avaliação estabelecidos para qualidade da água (Savichtcheva e Okabe, 2006).

As autoridades de saúde pública necessitam de indicadores de poluição fecal em águas para obviar a pesquisa de todos os patógenos que possam estar presentes nas águas, evitando assim, o consumo desnecessário de dinheiro e tempo (Edberg *et al.*, 2000), dado que a monitorização dos microrganismos patogênicos é de difícil execução devido à sua diversidade e à complexidade de metodologias específicas, tornando-se economicamente inviável e os resultados de difícil análise (Ferreira, 2003).

1.2.1 *Escherichia coli*

A bactéria *E. coli* foi descoberta pelo alemão-austriaco Theodor Escherich, em 1885. São bacilos pertencentes à família das *Enterobacteriaceae*. São aeróbias facultativas, são encontradas nas fezes de todos os mamíferos e não se multiplicam no ambiente em regiões não tropicais (Edberge *et al.*, 2000). *E. coli* cresce a 44-45°C, fermenta lactose e manitol, libertando ácido e gás e produz indol a partir do triptofano (Cunha e Silva, 2006). Na década de 1890, esta bactéria foi escolhida como indicador biológico para tratamentos de água por Theobald Smith, uma vez que esse microrganismo é

encontrado no intestino do homem e animais de sangue quente (Edberg *et al.*, 2000; Cunha e Silva, 2006).

Existe uma grande diversidade nas estirpes de *E. coli* comensais, e que pertencem a diferentes serótipos que podem ser isoladas das fezes de indivíduos saudáveis. Estas estirpes são eliminadas no ambiente e podem contaminar os alimentos, superfícies e águas, sem causar nenhum efeito adverso a saúde humana (Kuhnert *et al.*, 2000). A bactéria *E. coli* comensal do microbioma intestinal humano é um patógeno oportunista, sendo porém considerada inofensiva para o hospedeiro. Algumas estirpes são, no entanto, altamente patogênicas, como por exemplo, o serótipo de *E. coli* O157:H7, responsável por graves epidemias, em países industrializados, provocadas pelo consumo de alimentos contaminados, levando à morte de um elevado número de pessoas (Kuhnert *et al.*, 2000).

Até agora, países localizados em zonas temperadas têm utilizado, com sucesso, *E. coli* como indicador de poluição fecal. Entretanto, a adequação de CF como indicadores de poluição fecal em regiões tropicais e subtropicais não tem sido devidamente demonstrada. Vários estudos demonstraram que, dependendo do clima, as amostras podem variar quanto à densidade de CF, nomeadamente *E. coli*, e que não se correlaciona com o número de patógenos entéricos presentes na água, como por exemplo, *Salmonella* spp. (Chao *et al.*, 2003; Alonso *et al.*, 1999). É sugerido que a *E. coli*, em ambientes tropicais e subtropicais, tem a capacidade de replicação em solos contaminados, demonstrando que a sua utilização não poderá ser universal (Scott *et al.*, 2002).

1.2.2 Enterococos fecais

Os EF (Figura 2) estão presentes no trato intestinal de animais de sangue quente. São encontrados em altas concentrações nas fezes humanas, normalmente entre 10^4 e 10^6 bactéria por grama de peso húmido (Boehm e Sassoubre, 2014). O género *Enterococcus* é um subgrupo do antigo grupo de *Streptococcus* fecais (Blanch *et al.*, 2003). Membros desse género são diferenciados dos *Streptococcus* pela sua habilidade de crescer em 6,5% de cloreto de sódio, a pH 9,6, e 10 e 45°C. A proporção dos Enterococos para os *Streptococcus* nas fezes difere entre as espécies. (Scott *et al.*, 2002).

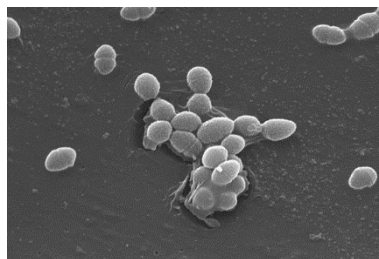


Figura 2) *Enterococcus faecalis* em Microscopia eletrônica de varredura. (retirada de http://www.cdc.gov/rabies/diagnosis/electron_microscopy.html)

Os EF são cocos gram positivos que muitas vezes aparecem em pares (diplococos) ou cadeias curtas, são aeróbios facultativos e embora não sejam capazes de formar esporos, são bastante tolerantes a condições ambientais adversas, como a temperatura e o pH (Boehm e Sassoubre, 2014). Isto deve-se ao fato de possuírem uma parede celular extremamente rica em peptidoglicano que os protege contra

agressões externas. As duas espécies mais encontradas nos intestinos humanos são *E. faecalis* (90-95%) e *E. faecium* (5-10%) (Scott *et al.*, 2002). Outras espécies pertencentes a esse grupo incluem *E. casseliflavus* e *E. gallinarium* e (Paradella *et al.*, 2007). Algumas espécies de *Enterococcus* podem ser patogênicas, podendo causar infecções no trato urinário, bacteremia, diverticulitis e meningite, que podem ser tratadas com antibióticos como ampicilina, penicilina e vancomicina (Blanch *et al.*, 2003). Os EF têm muitas vantagens como indicadores microbiológicos sobre os CT e *E. coli*. Os EF têm um tempo sobrevivência em água superior, e por isso foram propostos como indicadores de contaminação fecal complementar aos CF. Apesar de os EF serem menos numerosos do que os CF e *E. coli* em fezes humanas, são numerosos o suficiente para serem detectados em águas sem grande dificuldade (Boehm e Sassoubre, 2014; Blanch *et al.*, 2003).

No entanto, diversos estudos demonstraram que a utilização destes microrganismos (CT, fecais, *E. coli* e EF) não reflete a presença de vírus e protozoários patogênicos. Por exemplo, vírus entéricos foram encontrados em águas que cumpriam todos os requisitos legislativos em termos de números de indicadores bacteriológicos de contaminação fecal. Foram propostos, portanto, diversos indicadores alternativos.

1.3 Indicadores microbiológicos alternativos

As dificuldades relacionadas com os indicadores microbiológicos convencionais podem ser contornadas com outros métodos. Por isso é importante considerar outros indicadores na avaliação microbiológica das águas, ou seja, indicadores microbiológicos alternativos, que podem ser mais fiéis em relação à presença de patógenos na água. Um dos motivos para isso é a maior persistência desses indicadores no ambiente, mimetizando melhor o destino dos patógenos no ambiente e durante os tratamentos nas estações de tratamento de águas (Savichtcheva e Okabe, 2005; McMinn *et al.*, 2014). Os indicadores alternativos incluem bactérias anaeróbias fecais, que são consideradas uma alternativa aos coliformes, dado que a maioria das bactérias presentes no trato gastrointestinal de humanos é anaeróbia, podendo estar presentes em quantidades mil vezes superiores às encontradas para o grupo coliforme, o que torna esses organismos indicadores extremamente sensíveis para poluição fecal. Pelo fato de serem bactérias anaeróbicas, não existe a possibilidade de se multiplicarem no ambiente, mesmo em climas tropicais. Fazem parte dos indicadores anaeróbios fecais o gênero *Bacteroides* e *Bifidobacterium* (Bower *et al.*, 2005).

No entanto, a determinação de contaminação fecal pela análise bacteriológica não avalia de maneira eficiente a presença de vírus na água. Os vírus entéricos representam um elevado risco para a saúde pública (McMinn *et al.*, 2014) e outros microrganismos, como os bacteriófagos têm sido propostos como possíveis tipos de indicadores virais para avaliação da qualidade da água (Savichtcheva e Okabe, 2005; McMinn *et al.*, 2014). Os três grupos de bacteriófagos considerados como potenciais indicadores da presença de vírus são: colifagos somáticos, bacteriófagos F-RNA específicos e os fagos

que infetam as bactérias anaeróbias *Bacteroides fragilis* (Edbon *et al.*, 2007; Burbano-Rosero *et al.*, 2011).

Contudo, os indicadores microbiológicos, tanto os clássicos como os alternativos, possuem muitas falhas como ferramentas para avaliação de risco de contaminação das águas. E embora sejam úteis na prevenção da contaminação fecal na água, não conseguem fornecer informações importantes para a solução dos problemas associados à contaminação de aquíferos. É de extrema importância saber a fonte de contaminação, humana ou animal, pois é possível saber como e onde a água está a ser contaminada, permitindo adotar medidas de remediação. Nos últimos anos, têm se desenvolvido diversas técnicas para detecção da fonte de contaminação em vários tipos de águas. Estas técnicas são denominadas *Microbial Source Tracking*, e tem como objetivo principal a identificação específica do hospedeiro ou ambiente causador da contaminação fecal.

1.4 *Microbial Source Tracking* (MST)

Os CF e outros indicadores bacteriológicos de contaminação fecal, como já referido, têm sido utilizados por muitas autoridades para o controlo de qualidade de águas, como ferramentas para medir o nível de contaminação fecal de ambientes aquáticos (Griffin *et al.*, 2001). Essas medidas têm ajudado a melhorar a qualidade da água e como tal a proteger a saúde pública. Porém, existem várias desvantagens associadas ao uso destes indicadores que os torna pouco fiáveis na previsão da ocorrência de muitos agentes patogénicos e na identificação de fontes de contaminação fecal (Fong *et al.*, 2005). Os coliformes, como já descrito, podem ser encontrados nas fezes tanto de humanos como de animais de sangue quente pelo que não podem ser utilizados para obter informação da origem da contaminação fecal. Por outro lado o rastreamento e monitorização das fontes da contaminação são impossíveis sem a aplicação de técnicas específicas para o rastreamento de origem microbiana (Scott *et al.*, 2002). O microbismo intestinal humano é composto por microrganismos complexos, e é estimada a presença de 10^{11} a 10^{12} células microbianas/g de fezes contendo entre 300 a 500 espécies diferentes de bactérias (Guarner e Malagelada, 2003). Definir o hospedeiro específico desses microrganismos é praticamente impossível devido à sua ampla diversidade.

Os métodos para a determinação da fonte de contaminação fecal nas águas ambientais têm aumentado em número e evoluído substancialmente ao longo dos anos, e a lista de potenciais fontes de identificação de contaminação fecal e de estratégias para detecção também têm aumentando (Tabela 2) (Martellini *et al.*, 2005). As técnicas de MST podem ser classificadas como “*library dependent*” e “*library independent*” (Simpson *et al.*, 2002; Ballesté *et al.*, 2010). Podem ainda ser diferenciados entre *culture-dependent* e *culture-independent* (metodologias dependentes de cultura e independentes de cultura). Em alguns casos, além da identificação das fontes de contaminação fecal nas águas, as metodologias de MST também servem para quantificar as mesmas, através de métodos de cultura ou moleculares, como por exemplo, qPCR (Stoeckel e Harwood, 2007).

Library-dependent Source Tracking Methods reside na construção de uma coleção de diversas características (*fingerprints, patterns* ou *profiles*) obtidas de fontes de contaminação da qual se sabe a sua origem (humana ou animal), geralmente isolados de fezes e que serviram de comparação com os resultados obtidos nas amostras ambientais analisadas, geralmente denominadas por desconhecidos. Os métodos alternativos de MST que incluem bacteriófagos, vírus e pesquisa de DNA mitocondrial (mtDNA) encontram-se nas metodologias de *Library-independent Source Tracking Methods*. Estes métodos são baseados na detecção seletiva da fonte de contaminação, ser detetados através de técnicas de cultura (*culture-dependent*) ou da extração dos ácidos nucleicos dos alvos em questão (*culture-independent*) (Martellini *et al.*, 2005). Muitos LDM requerem a cultura de um grande número de estirpes bacterianas, são bastante demorados e requerem trabalho intensivo. Adicionalmente, as variações geográficas e temporais e a existência de falsos positivos podem representar um grave problema (Gourmelon *et al.*, 2007). Por isso, os métodos que não requerem a construção de uma coleção têm ganhado, nos últimos anos, relevância face aos métodos que requerem a coleção na detecção da fonte de contaminação fecal em vários tipos de águas.

Métodos	Vantagens	Desvantagens
Análise de resistência a antibióticos (ARA)	Baixo custo Fácil utilização	Estabilidade questionável dos marcadores de resistência a antibióticos e Variabilidade geográfica
Utilização de fonte de carbono (CSU)	Rápido Padronizado	Estabilidade temporária desconhecida
Análise de Éster metílico de ácido gordo (FAME)	Pode utilizar uma pequena biblioteca	Ainda está em testes para ser utilizado como MST
Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)	Muito sensível; Altamente discriminatório; Reprodutível	Necessita de uma <i>library</i> muito extensiva
Ribotipagem	Excelente reprodutibilidade Alta sensibilidade	Alto custo Requer trabalho intensivo Necessita de ribotipos diversos
Rep-PCR	Rentável; Menos exigente tecnicamente que outros métodos de genotipagem	Variabilidade geográfica e temporal
Análise de polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFLP)	Reprodutível; Robustez	Alto custo; Informação do método limitada
Análise de polimorfismo de DNA amplificada ao acaso (RAPD)	Eficiente; Fácil de realizar	Problemas de reprodutibilidade; Falta de padronização
Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE)	Community Fingerprinting	Exigente tecnicamente; Necessita de uma adequada seleção de genes-alvo
Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectroscopy (MALDI-TOF-MS)	Rápido	Falta de informação
Colifagos F-RNA específicos	Difere humanos de animais Seus subtipos têm características estáveis; Rápido e fácil procedimento; <i>Library-independent</i>	Requer cultivo dos colifagos; Seus subtipos não têm um hospedeiro específico; Baixa quantidade no ambiente
Gene específico ao PCR	Pode ser adaptada a quantificação das cópias do gene Genes de virulência podem ser alvos; fornecendo evidência direta que os organismos potencialmente prejudiciais estão presentes <i>Library-independent</i>	Requer enriquecimento do organismo visado Os genes alvo podem não estar em quantidade suficiente, requerendo grande quantidade de amostra Requer profissional treinado Os <i>primers</i> podem não estar disponíveis para todos os tipos de hospedeiros
PCR de hospedeiro específico	Não requer cultivo do organismo alvo Rápido e fácil de realizar <i>Library-independent</i>	Não se sabe muito sobre a sobrevivência em água e sua distribuição Os <i>primers</i> podem não estar disponíveis para todos os tipos de hospedeiros
PCR específico de vírus	Tem hospedeiro específico Fácil de realizar <i>Library-independent</i>	Requer uma grande quantidade de amostra, pois estão em baixo número Nem sempre estão presentes mesmo quando há humanos

Tabela 2) Comparação das vantagens e desvantagens de cada *Microbial Source Tracking* baseados em genotipagem e fenotipagem (adaptado de USEPA, 2005)

1.4.1 Bacteriófagos

Os bacteriófagos são um grupo de microrganismos que utilizam bactérias como hospedeiros para a sua replicação. São responsáveis pela infecção de células bacterianas podendo causar a sua lise (Sulakvelize *et al.*, 2001). Ernest Hankin, bacteriologista britânico, relatou em 1896 a presença de atividade antibacteriana contra *Vibrio cholerae* observada nas águas dos rios Ganges e Jumna na Índia, e sugeriu que uma substância não identificada seria responsável por esse fenômeno, ajudando na limitação da propagação de epidemias de cólera (Samsyгина e Boni, 1984). Dois anos mais tarde, o bacteriologista russo Gamaleya observou fenômeno semelhante ao trabalhar com *Bacillus subtilis*. Uma série de outros investigadores observaram e relataram fenômenos semelhantes aos descritos anteriormente (Van Helvoort, 1992). Porém, o assunto foi esquecido até que em 1915 o bacteriologista inglês Frederick Twort reintroduziu as discussões sobre este tema descrevendo resultados semelhantes e avançando com a hipótese de que o agente causador poderia ser, dentre outras possibilidades, outro microrganismo (Sulakvelize *et al.*, 2001). No entanto, foi apenas em 1917, que o microbiologista franco-canadiano Felix d’Herelle descobriu “oficialmente” os bacteriófagos (Sharp, 2001).

Os bacteriófagos infetam bactérias independentemente do habitat em que estas se encontram (Burbano-Rosero *et al.*, 2011). Os bacteriófagos são, de entre os microrganismos que necessitam de hospedeiro para se replicar, os mais abundantes e diversificados em termos de material genético, com uma ecologia complexa (Burbano-Rosero *et al.*, 2011).

A concentração de bacteriófagos em águas naturais não poluídas acreditava-se que de uma maneira geral fosse baixa (Bergh *et al.*, 1989). No entanto, é reconhecido que os bacteriófagos são extremamente abundantes em ambientes aquáticos e podem exceder a concentração de bactérias em 100 vezes, com o número total estimado de 10^{31} na biosfera (Burbano-Rosero *et al.*, 2011).

Por forma a culmar todos os problemas da utilização de indicadores bacteriológicos para aferir a qualidade da água no que se relaciona com a presença de vírus entéricos, três tipos de bacteriófagos foram propostos: Colifagos somáticos, fagos que infetam *Bacteroides* spp. e colifagos RNA F-específicos (F-RNA). De entre os três, os colifagos somáticos rapidamente se tornaram os mais utilizados, pelo fato de encontrarem em números superiores no ambiente e de serem detetados através de metodologias simples, baratas e rápidas (Burbano-Rosero *et al.*, 2011). A detecção de bacteriófagos de *Bacteroides* é substancialmente mais complicada que a de colifagos somáticos e de bacteriófagos RNA F-específicos pela natureza do próprio hospedeiro, que sendo uma bactéria anaeróbia necessita de requisitos que os hospedeiros dos restantes bacteriófagos não necessitam. Adicionalmente, e dado que o seu hospedeiro por ser anaeróbio não replica no ambiente, são os bacteriófagos que de entre os três se encontram geralmente em menor concentração dificultando, portanto a sua detecção.

Alguns estudos referem que os bacteriófagos são, geralmente, melhores indicadores da presença de vírus entéricos que os FIB devido a semelhanças estruturais (no que respeita a dimensões, forma e configuração genética) e nos comportamentos no meio ambiente (McMinn *et al.*, 2014). De entre os bacteriófagos, os que apresentam maior especificidade são bacteriófagos de *Bacteroides* spp.,

nomeadamente *B. fragilis* e *B. Thetaiotaomicron*. No entanto, os seus hospedeiros são limitados a determinadas áreas geográficas. Bacteriófagos que estirpes de *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. ruminicola*, e *B. ovatus* já foram encontrados em amostras fecais e de águas residuais (Jofre *et al.*, 2011). Todos os fagos que infetam as diferentes espécies de *Bacteroides* têm morfologia semelhante no sentido de que todos possuem uma cauda, e a grande maioria pertence à família *Siphoviridae* (Queralt *et al.*, 2003; Doñate, 2014).

Muitos tipos de bacteriófagos que infetam *Bacteroides* spp. tem uma gama estrita de hospedeiros. O mecanismo não é completamente compreendido, porém, uma potencial explicação reside no fato de que os fagos que infetam bactérias anaeróbias se tenham desenvolvido com os hospedeiros animais de uma maneira mais diferente da dos restantes hospedeiros (Jofre *et al.*, 2011). As estirpes de *Bacteroides* que servem como hospedeiras variam na sua habilidade de diferenciar os fagos provenientes de diferentes fontes, e, a deteção dos fagos por cada estirpe varia geograficamente. Existem diversas estirpes de *Bacteroides* que servem como hospedeiras para bacteriófagos, como por exemplo, RYC 2056, GA 17, VPI 3625, GB-124. A estirpe RYC 2056 não permite a distinção entre diferentes fontes de contaminação, enquanto GA 17, VPI 3625 e GB-124 são utilizadas na discriminação da origem da contaminação fecal e são mais eficazes na deteção de fagos em determinadas regiões do planeta (Payan *et al.*, 2005).

A estirpe de *Bacteroides* denominada de GB-124 foi isolada no Reino Unido e demonstrou ter uma elevada especificidade para a deteção de contaminação fecal humana. No entanto, mais estudos são necessários para perceber a distribuição geográfica dos bacteriófagos que infetam esta estirpe hospedeira tanto na Europa como no resto do mundo. Existe um estudo realizado na Califórnia, Estados Unidos, sobre a presença dos bacteriófagos de GB-124 (Harwood *et al.*, 2013). Neste estudo, ao contrário do que aconteceu no Reino Unido, os bacteriófagos de GB-124 foram encontrados não só em amostras de origem humana, mas também de origem animal, embora a grande predominância esteja nas amostras humanas.

É então necessário avaliar a especificidade dos fagos de GB-124 noutras localizações geográficas para que possa ser considerado um indicador de contaminação fecal mais amplo (McMinn *et al.*, 2014).

De entre os métodos baseados em cultura atualmente utilizados, os bacteriófagos que infetam estirpes de *B. fragilis* tem demonstrado ser promissores, uma vez que podem ser detetados de forma relativamente rápida e barata, sem que sejam utilizados equipamentos caros e operadores altamente especializados (Ebdon *et al.*, 2007; Diston *et al.*, 2012).

1.4.2 Colifagos somáticos

Os bacteriófagos que infetam *E. coli* e outros membros da família *Enterobacteriaceae* são denominados Colifagos (Jofre *et al.*, 2011), sendo excretados, com os hospedeiros, nas fezes humanas e de animais de sangue quente. Os colifagos somáticos (CS) que infetam *E. coli*, por via da parede celular, pertencem a quatro famílias distintas: *Myoviridae*; *Siphoviridae*; *Podoviridae* e *Microviridae*. A

utilização de colifagos como indicadores tem vantagens, dado que são de fácil e rápida enumeração. Além disso, as taxas de inativação dos colifagos são semelhantes às reportadas para muitos outros microrganismos patogénicos (Jonczy *et al.*, 2011). Os Colifagos somáticos são como indicadores de poluição fecal geral sendo poucas as informações sobre a sua diversidade em áreas com diferentes níveis de contaminação fecal (Grabow, 2001).

Os métodos de deteção dos colifagos em geral envolvem incubação da amostra a estudar o hospedeiro bacteriano em meio com nutrientes para análise da formação de halos de lise. Estes halos são marcados por zonas transparentes no meio de cultura, onde se deu a lise celular da bactéria. A quantidade de colifagos numa amostra é normalmente expressa como unidades formadoras de colónias (PFU) pelo volume dado da amostra (Jofre *et al.*, 2011).

1.4.3 Bacteriófagos F-RNA específicos

Os bacteriófagos RNA F-específicos, ou bacteriófagos “*Male-specific*” infetam seu hospedeiro através de receptores no F-pili, enquanto que os CS infetam seus hospedeiros pelos receptores celulares na parede celular (Jofre *et al.*, 2011). Os bacteriófagos RNA F-específicos são divididos em quatro subgrupos principais: grupo I, grupo II, grupo III e grupo IV (Scott *et al.*, 2002). Os bacteriófagos dos grupos II e III têm demonstrado forte associação com contaminação fecal humana e de esgotos domésticos, enquanto os grupos I e IV têm sido associados a contaminação animal não humana (Jofre *et al.*, 2011; Scott *et al.*, 2002).

1.4.4 Bacteriófagos de *Bacteroides fragilis*

Bacteroides fragilis (Figura 3) são bactérias anaeróbias obrigatórias, gram-negativas, não esporuladoras, encapsuladas, não-móveis e em forma de bacilos. Os fagos que infetam *Bacteroides fragilis* têm sido propostos como potenciais marcadores específicos para contaminação fecal humana em águas. A estirpe de *B. fragilis* HSP 40 foi encontrada apenas em amostras de origem humana comprovando as elevadas potencialidades deste microrganismo para aferição do tipo de poluição fecal (Savichtcheva e Okabe, 2006; Edbon *et al.*, 2007; Gantzer *et al.*, 1998). Os fagos de *B. fragilis* multiplicam-se apenas no trato intestinal humano, local único em que o seu hospedeiro se encontra em concentrações mais elevadas que a *E. coli* e se replica.

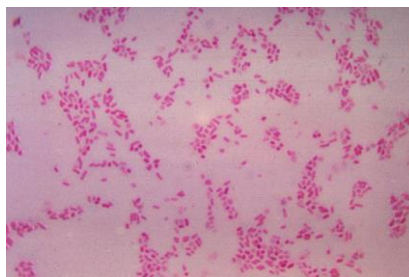


Figura 3) *Bacteroides fragilis* em microscópio cultivadas em meio agar sangue durante 48 horas. Mesmo sendo uma bactéria comensal que normalmente vive no sistema gastrointestinal humano, pode se tornar patogénica em

circunstâncias que envolvem perturbação na mucosa intestinal normal, como por exemplo traumas ou cirurgias (retirado de http://phil.cdc.gov/phil_images/20030203/6/PHIL_3084_lores.jpg)

A sobrevivência do fago de *B. fragilis* é equivalente ou superior à registrada para os vírus entéricos a 5°C e a 25°C em águas superficiais (Savichtcheva e Okabe, 2006).

Vários estudos têm demonstrado que a utilização dos bacteriófagos capazes de infectar *Bacteroides* spp. é extremamente importante para determinar ambientes aquáticos com baixos níveis de de poluição. Por exemplo, Pina *et al.* (1998) demonstrou que existe uma correlação entre a detecção de vírus humanos por PCR e os níveis de fagos de *Bacteroides fragilis* HSP 40 em águas do mar. Também foi concluído nesse estudo que os fagos de *B. fragilis* são mais resistentes a processos de tratamento de águas potáveis do que colifagos F-específicos. Ebdon *et al.* (2012) demonstrou pela primeira vez a correlação entre a presença do marcador MST específico de humano (fago de GB-124) e a presença de genomas de vírus patogênicos entéricos específicos de humanos em águas residuais municipais.

Recentemente, uma estirpe de *B. fragilis*, denominada GB-124, foi identificada como sendo susceptível a fagos de origem humana na Europa (McMinn *et al.*, 2014; Ebdon *et al.*, 2007). O nível de fagos presentes na água está relacionado com o grau de poluição e em certas situações poderá, no caso dos fagos de *B. Fragilis*, superar os níveis de vírus entéricos humanos. Fagos que infectam GB-124 (Figura 4) têm sido utilizados em alguns estudos na Europa para identificação de poluição fecal humana em águas (McMinn *et al.*, 2014).

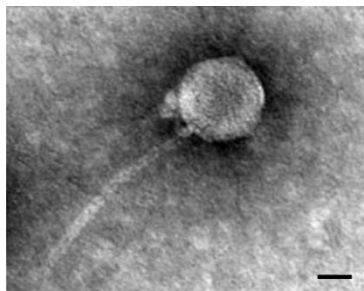


Figura 4) Estrutura física de Bacteriófagos de *Bacteroides fragilis* por microscopia eletrônica de transmissão. Demonstrando o capsídeo do fago composto por uma cabeça icosaédrica e cauda não contrátil (retirada de Olgvie *et al.*, 2012)

1.4.5 Bacteriófagos de *B. fragilis* em MST

Ebdon *et al.* (2007) utilizou a estirpe de *Bacteroides* GB-124 para detetar fontes humanas de poluição fecal em rios no sudeste de Inglaterra. De entre as amostras analisadas, provenientes de águas de rios e de animais, os fagos de *Bacteroides* GB-124 foram detetados em baixos níveis nas águas de rios a jusante de uma fazenda de gado, mesmo com níveis elevados de bactérias indicadoras e não foram de todo encontrados nas amostras provenientes de animais. Esses resultados sugerem que o GB-124 é específico de humanos e representa um método barato e efetivo de identificação da fonte de contaminação.

No estudo realizado por McMinn *et al.* (2014), nos Estados Unidos, foram testados os fagos de GB-124 como marcadores de poluição fecal humana. Nesse estudo foram selecionadas amostras retiradas

de estações de tratamentos de águas residuais distribuídas por todo o país. As amostras foram analisadas para fagos de GB-124, colifagos somáticos e colifagos RNA F-específicos através do método de cultura e adenovirus por qPCR. Os resultados obtidos nesse estudo são semelhantes a resultados obtidos na Europa, onde os fagos de GB-124 são encontrados em menor densidade que colifagos somáticos, colifagos RNA F-específicos e adenovirus. Também foi verificado se os fagos de GB-124 eram específicos para contaminação fecal antropogénica através da análise de amostras provenientes de animais, chegando-se à conclusão de que os fagos desta estirpe são específicos de humanos.

No entanto, todos os resultados publicados indicam que os fagos que infetam *Bacteroides* demonstram um elevado potencial como marcadores para a monitorização de tipo de contaminação existente num determinado aquífero.

1.4.6 Vírus entéricos

Mais de 100 tipos de vírus diferentes são encontrados em águas residuais humanas e em ambientes aquáticos contaminados, como águas marinhas costeiras, rios, mares e poços privados com potencial de serem transmitidos através da água (Jiang *et al.*, 2001; Chapron *et al.*, 2000; Fong *et al.*, 2005). Um grande número de vírus é excretado nas fezes humanas de indivíduos infetados, e mesmo em baixas densidades, como 1-10 unidades infecciosas, podem causar graves doenças quando ingeridos (Pina *et al.*, 1998; Fong *et al.*, 2005; McQuaig e Noble, 2011). Isto deve-se ao fato de muitos vírus entéricos apresentarem uma dose infecciosa relativamente menor à de bactérias patogénicas, como por exemplo, *Salmonella typhi*, em que a dose infecciosa estimada é entre 100 e 1×10^5 células (McQuaig e Noble, 2011). Estes vírus, coletivamente conhecidos como vírus entéricos, são transmitidos pela via fecal-oral, e infetam e replicam apenas no sistema gastrointestinal do hospedeiro (Fong *et al.*, 2005). Os vírus excretados entram nos sistemas de tratamento de águas residuais e o erro está em utilizar as bactérias clássicas como indicadores da presença destes microrganismos e em considerar que os processos de desinfecção atualmente utilizados permitem a completa inativação de vírus.

Estes vírus são mais resistentes a condições de *stress* ambiental e a processos de desinfecção de águas residuais, incluindo cloro e radiação U.V, quando comparados com a generalidade bactérias associadas à contaminação de água (Jiang *et al.*, 2001; Hijnem *et al.*, 2006). Estudos anteriores reportaram a presença de vírus, como Enterovírus e Adenovírus, em águas do mar (Ballester, 2005). Estudos realizados em laboratórios demonstraram que os Enterovírus conseguem sobreviver entre 02 e 130 dias em águas do mar, superando o tempo de sobrevivência relatado para bactérias coliformes em ambientes iguais (Jiang *et al.*, 2001). Portanto, o uso de indicadores bacteriológicos para determinar a qualidade virológica da água é muito questionável (Scott *et al.*, 2002; Hundesa *et al.*, 2006).

O facto de não existirem processos de desinfecção suficientemente adequados para a remoção total de todos os tipos de vírus causa graves problemas. Por um lado, os vírus são libertados no meio receptor

em números suficientemente elevados para causar graves problemas de saúde pública, mas em números baixos que dificulta a sua detecção.

Existem dois pontos críticos na detecção de vírus entéricos em amostras ambientais: os valores de concentração baixos em que se encontram e a detecção em si. A detecção de vírus em amostras ambientais inclui um passo de concentração de grandes volumes de água. Diversos métodos estão atualmente disponíveis para a concentração de vírus e incluem filtros eletropositivos, filtros e membranas eletronegativos e a utilização de *skimmed milk*. Para a detecção o método *standard* é a cultura em células animais. No entanto, diversos vírus não possuem um sistema de células e, portanto a sua detecção é feita através de técnicas moleculares. O desenvolvimento de técnicas moleculares baseadas na detecção de ácidos nucleicos tem facilitado a detecção de vírus que não replicam, ou, cuja replicação é bastante difícil e fraca utilizando culturas celulares. A amplificação de ácidos nucleicos virais por PCR é o método mais utilizado atualmente (Pina *et al.*, 1998). As técnicas de qPCR e RT-PCR são sensíveis, específicas e rápidas (Metcalf *et al.*, 1995), e têm sido bastante utilizadas para a determinação de contaminação fecal de amostras com vários tipos de vírus, como Adenovirus, Enterovirus e vírus da Hepatite A (Pina *et al.*, 1998; McQuaig *et al.*, 2012).

Vários surtos epidemiológicos ocorreram devido à presença de vírus em água. Os vírus mais prevalentes nos surtos incluem Adenovirus, Enterovírus, Norovirus e Polyomavirus humano (Tabela 3) (Gantzer *et al.*, 1998; Anderson *et al.*, 1987; McQuaig e Noble, 2011; Hundesa *et al.*, 2006). De uma maneira geral, os vírus entéricos são compostos de RNA sendo que os únicos cujo material genético é DNA são os Adenovirus (Jiang *et al.*, 2001).

Tipo de vírus	Concentração (GC/L)		Países
	Alta	Baixa	
Adenovirus	4,63x10 ⁵	36	Nova Zelândia, Japão, EUA
Norovirus	1,0x10 ⁹	4,9x10 ³	França, Japão
Enterovirus	1,8x10 ⁸	9	Nova Zelândia, Japão
Polyomavirus humano	4,7x10 ⁷	1,3x10 ⁷	EUA

Tabela 3) Concentração de vírus entéricos humanos em águas de mar não tratadas em cópias do gene/litro (GC/L) (adaptada de McQuaig e Noble, 2011)

1.4.7 Adenovirus

Em 1953, Rowe e os seus colaboradores, observaram a formação de efeito citopático com degeneração espontânea num sistema de cultura celular primária derivada do tecido humano adenoide. Em 1954, Werne e Hilleman, isolaram, nas secreções respiratórias de soldados, um agente capaz de induzir mudanças citopáticas em culturas celulares humanas. Em 1956, esse agente viral foi denominado Adenovirus, devido ao tecido em que foi descoberto (Enders *et al.*, 1956). O vírus é associado a

infecção aguda no trato respiratório, conjuntivite, meningoencefalite, cistite hemorrágica, diarreia em crianças e falência hepática (Cruz *et al.*, 1990; Yolken *et al.*, 1982; Fong *et al.*, 2005).

Os Adenovírus (Figura 5) pertencem à família *Adenoviridae*, a qual pode ser diferenciada em quatro gêneros: *Mastadenovirus*; *Siadenovirus*; *Aviadenovirus*; *Atadenovirus*. *Mastadenovirus* é o gênero formado por vírus que infetam mamíferos; *Siadenovirus*, formado por vírus que infetam aves e peixes; *Aviadenovirus*, formado por vírus que afetam somente aves e *Atadenovirus*, constituído por vírus que infetam ruminantes, aves e marsupiais (ICTV; Hundesa *et al.*, 2006).



Figura 5) Representação da estrutura de um adenovírus com suas proteínas (retirado de Silva, 2008)

Os Adenovírus são vírus que não contêm membrana, de estrutura icosaédrica e de com diâmetro aproximado de 70 a 90 nm. São formados por 11 proteínas polipeptídicas sendo que 07 formam a cápside viral (Greber *et al.*, 1997). Os Adenovírus humanos (HAdV) pertencem ao gênero *Mastadenovirus* que engloba mais de 60 serótipos conhecidos, distribuídos em sete espécies (A-G) (Hundesa *et al.*, 2006). Os HAdV são facilmente detectados em águas de mar e rios com contaminação fecal, e estudos já comprovaram que são mais resistentes à radiação U.V quando comparados com enterovírus e os indicadores bacteriológicos clássicos (Hundesa *et al.*, 2006; Pina *et al.*, 1998; Gerba *et al.*, 2002).

1.4.8 Adenovirus em MST

Em um estudo realizado por Ahmed *et al* (2010) foi incorporada a utilização de Adenovirus humano e de animais para avaliar a origem de contaminação em amostras de água. Além disso, o estudo também avaliou a presença e quantidade de agentes microbianos em condições secas e molhadas. Os resultados incluíram a observação de que os Adenovirus específicos de humanos e os específicos de bovinos não foram codetetados em todas as amostras. As amostras positivas para HAV não excederam as positivities das bactérias *E. coli* e EF, que foram encontradas em 160 UFC/100 mL e 390 UFC/100 mL, respectivamente. Em contraste, as amostras positivas por PCR para BAV tinham uma concentração média de bactérias fecais de 1,5596 UFC/100 mL. Além disso, as amostras positivas para BAV por PCR também foram positivas para pelo menos outro agente patogênico zoonótico. Este estudo também

demonstrou o poder analítico de indicadores virais para prever a presença de outros agentes patogénicos.

Um estudo realizado em 2007 nas praias de Doheny e Avalon na Califórnia (McQuaig *et al.*, 2009) foi avaliada a qualidade da água em todas as Sextas-feiras, Sábados e Domingos (dias de maior utilização das praias), em um período de 4 meses de duração no verão. As amostras foram analisadas quanto às concentrações de FIB (CT, CF e EF) e para a presença de quatro marcadores associados a humanos (Adenovirus, *Methanobrevibacter smithii*, *Bacteroidetes* associados a humanos e polimavirus humano). Os Adenovirus e polimavirus humano foram altamente correlacionados em locais onde ocorreu intervenção humana. Para, além disso, em áreas onde havia suspeita de falha dos sistemas sépticos, polimavirus humanos foram os marcadores mais prevalentes, sugerindo que esses vírus podem ser muito úteis em áreas suspeitas de contaminação devido a tanques sépticos defeituosos.

1.4.9 DNA mitocondrial

Com o avanço da biologia molecular e dos métodos de detecção e análise de DNA, surgiu a oportunidade de utilizar células epiteliais do intestino de animais e humanos para determinar fontes específicas de contaminação fecal. As células epiteliais em senescência nos intestinos são excretadas nas fezes dos animais e humanos. Este facto permite a detecção direta da fonte por oposição à pesquisa dos microrganismos existentes na flora intestinal dos animais e que é dependente de diversos fatores externos. Richard Villemur, biólogo molecular, juntamente com Pierre Payment e sua equipa, sugeriu numa primeira abordagem desta investigação, utilizar como alvo o gene 18S RNA através de sequenciação do. Porém o sucesso foi escasso. Resultados promissores foram então obtidos escolhendo como alvo um outro elemento genético com propriedades similares aos genes do RNA ribossomal: o genoma mitocondrial (Caldwell *et al.*, 2011).

As mitocôndrias (Figura 6) são encontradas em todas as células eucarióticas e cada mitocôndria possui material genético em múltiplas cópias com sequências específicas. O genoma mitocondrial varia em seu tamanho. As células animais possuem genomas mitocondriais pequenos, com aproximadamente 16,5 kb em mamíferos (Lewin, 2009). Nos humanos, o genoma mitocondrial possui 13 regiões que codificam para proteínas, 22 genes para tRNA, e 2 genes para codificação de rRNA (Figura 7). Estima-se que o epitélio dos intestinos contém 5×10^{10} células e que aproximadamente 10^{10} dessas células são expelidas diariamente (Kamra *et al.*, 2005). Assumindo que existem 10^4 cópias de mtDNA/célula, isto representaria aproximadamente 10^{11} mtDNA/g nas fezes, valores comparáveis ao nível de bactérias nas fezes (Belanche e Blanch, 2011). Essas características fazem do DNA mitocondrial (mtDNA) um excelente alvo em termos de especificidade para o hospedeiro em pesquisa e sensibilidade devido ao número de cópias em que se encontram (Caldwell *et al.*, 2011). Devido a variações no mtDNA entre espécies, a criação de *primers* específicos para detecção por PCR para determinada espécie é relativamente fácil. A técnica de PCR, quando aplicada para a detecção de mtDNA, permite a

identificação direta do animal que contamina os aquíferos, em vez das espécies microbianas que ele pode hospedar (Martellini *et al.*, 2005).

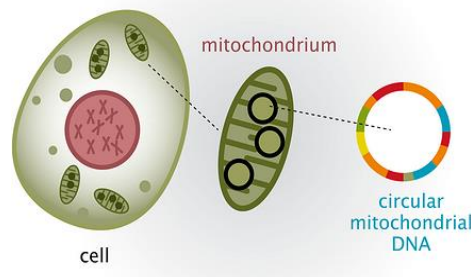


Figura 6) Localização da mitocôndria dentro da célula e demonstração do DNA mitocondrial humana em forma circular (retirado de <http://rachelkan95.wix.com/future-of-forensics#!mitochondrial-dna/ch11>)

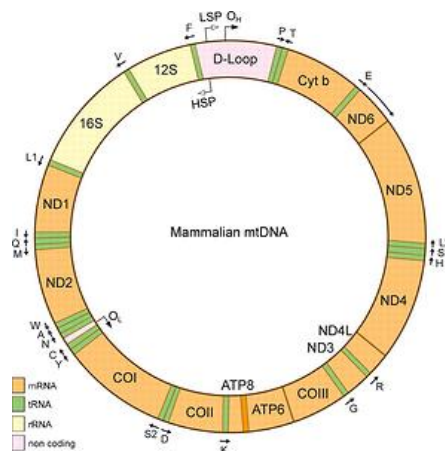


Figura 7) DNA mitocondrial humano, contendo 22 genes de tRNA, 2 genes de rRNA e 13 genes que codificam proteínas. O_H e O_L: Origens de replicação. Genes que codificam os RNAs ribossomais 12S e 16S, as subunidades de NADH-coenzima Q oxidoreductase (ND), citocroma-c oxidase (COX) citocroma-b (CYT B), e ATP sintase (A), e 22 tRNAs (retirado de <http://rachelkan95.wix.com/future-of-forensics#!mitochondrial-dna/ch11>)

1.4.10 DNA mitocondrial em MST

O primeiro estudo a aplicar a detecção de mtDNA para a discriminação de fontes de contaminação fecal foi realizado em 2005 (Martellini *et al.*, 2005). Os autores desenharam *primers* específicos para humanos, bovinos, ovelhas e porcos para a determinação por PCR. Este estudo demonstrou que a utilização de DNA mitocondrial era simples e permitia diferenciar entre rapidamente fontes de contaminação num aquífero.

Caldwell e Levine (2009) realizaram um estudo em águas residuais municipais, onde analisaram por qPCR a presença de mtDNA de humanos, bovinos, suínos, cães, gatos, gansos e veados. A maior prevalência foi de mtDNA de humanos e cães, que foram detetados em todas as amostras. mtDNA de bovinos e suínos foram detetados em menor quantidade que o mtDNA de humanos. mtDNA de gatos, ganso e veado foram detetados em apenas uma das 24 amostras testadas. Os resultados foram correlacionados com outras bactérias e compostos químicos. Os CF não demonstraram qualquer correlação com a concentração de mtDNA para nenhuma das espécies.

Embora diversos estudos tenham demonstrado elevado potencial para distinção de fontes de contaminação fecal através da detecção de DNA mitocondrial, mais estudos são necessários para criação de perfis de mtDNA de águas residenciais, fontes agrícolas e de animais selvagens. A combinação desses perfis com outros parâmetros moleculares, microbiológicos ou químicos permitirão aperfeiçoar a capacidade de distinguir e, portanto remediar as fontes de contaminação fecal nas águas de superfície ajudando a diminuir os riscos para a saúde pública.

1.5 Quantificação de Ácidos nucleicos por qPCR

Para a quantificação dos Adenovirus e DNAs mitocondriais, foi realizado o procedimento de PCR em tempo real (RT-qPCR). Esta é uma metodologia de PCR acoplada com um sistema de detecção de sinais fluorescentes. Por tanto obtém-se a detecção, quantificação e amplificação de DNA em uma única etapa, acelerando o processo para a obtenção de resultados. O objetivo do PCR é multiplicar um trecho específico do DNA utilizando desoxinucleotídeos como monômeros até o ponto em que sua concentração seja alta o suficiente para ser detectada. A multiplicação desses trechos específicos dá-se pela alternância de temperatura durante o ensaio entre:

- 1 – Desnaturação das cadeias do DNA genômico;
- 2 – Anelamento dos *primers* (sequências utilizadas para delimitar a sequência que se quer amplificar);
- 3 – Temperatura ótima específica da enzima;
- 4 – Reinício do ciclo.

O ponto que deteta o ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado *Cycle threshold* (C_i) (Figura 12). Este ponto permite que seja feita a quantificação exata baseado na fluorescência da reação.

1.6 Objetivo do Estágio

O objetivo do trabalho foi, a partir de amostras recolhidas nos diferentes pontos ao longo do rio Tejo, localizados em Belém, Marina do Parque das Nações (MPN), Vila Franca de Xira (VFX) e Alcântara (ALC), durante o período entre Fevereiro e Agosto, analisar o nível de poluição fecal, se existente, assim como a quantificação dos microrganismos envolvidos na contaminação. Isto, a partir da combinação de métodos *culture-dependent* e *culture-independent*, sendo a maioria destes, métodos moleculares, para fornecer uma nova abordagem prática, viável e integrável a partir da utilização das amostras ambientais.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Locais de colheita e colheita de amostras

Foi colhido um total de 73 amostras, em diversos pontos do Rio Tejo (Figura 8), nomeadamente em Vila Franca de Xira (VFX), na Marina do Parque das Nações (MPN), em Alcântara (ALC) e em Belém num período que decorreu de Fevereiro de 2015 a Agosto de 2015. Estes pontos foram escolhidos devido à proximidade dos pontos de descarga das ETAR's (Figura 9) e também pela zona envolvente que se caracteriza pela presença de diversas explorações de animais, incluindo criação de gado e aviários (Figura 11). As ETAR's se localizam em vários pontos espalhados pela cidade de Lisboa e arredores, abrangindo os concelhos de Lisboa, Vila Franca de Xira, Amadora, Odivelas e Loures (Figura 10).

No vale de ALC, está localizada a maior ETAR coberta do país (Figura 9), que beneficia 756 mil habitantes, numa área total de 37 km², e possui um caudal de 285.000m³/dia, permitindo o tratamento de todas as águas residuais provenientes de parte do município de Lisboa, incluindo a zona ribeirinha do Terreiro do Trigo, em Santa Apolónia, até Belém, e parte dos municípios de Amadora e Oeiras. Portanto, as colheitas realizadas nos pontos de Belém e Alcântara sofreram impacto desta ETAR. Em VFX está localizada a ETAR Vila Franca de Xira e Alverca (Figura 9), que se destina a tratar o efluente proveniente das localidades de Vila Franca de Xira, Alhandra, Castanheira do Ribatejo e S. João dos Montes, Calhandriz, Forte da Casa, Póvoa de Sta. Iria, Sobralinho e Vialonga. As duas servem em média de 235.383 habitantes. A ETAR de Vila Franca de Xira trata um caudal médio de 15.936 m³ diários e a ETAR de Alverca um caudal de 47.087m³/dia. Após os tratamentos os efluentes são descarregados no Rio Tejo. Esta descarga é feita próximo ao ponto de colheitas de Vila Franca de Xira.

A ETAR de Beirolas (Figura 9) possui um caudal de 54.500 m³, servindo cerca de 215.000 habitantes dos municípios de Loures e Lisboa. Esta ETAR está localizada nas proximidades das colheitas realizadas na MPN. A ETAR de Frielas (Figura 9), situada na freguesia de Frielas está envolvida no processo de recuperação do rio Trancão, tendo entrado em funcionamento em 1999. É responsável pelo tratamento dos esgotos de uma vastíssima área que se estende desde a Brandoa (Amadora) a Vila Franca de Xira, e recebe diariamente um caudal de 70.000m³ de água, equivalentes àqueles produzidos por 700.000 habitantes. Esta ETAR deságua no Parque Tejo. A ETAR de São João da Talha (Figura 9) possui uma capacidade para tratamento de água residual doméstico e industrial de 135.000 habitantes equivalentes, tendo um caudal de 15.999 m³ diários. Esta ETAR também descarrega as águas no Parque Tejo. A ETAR de Chelas, situada a Este de Lisboa (Figura 9), trata juntamente com as Estações de Beirolas (Norte) e Alcântara (Oeste), as águas residuais da cidade de Lisboa e arredores. A ETAR está dimensionada para tratar um caudal de 67.500 m³/dia.

Do número total amostras colhidas e analisadas, 17 eram provenientes de Vila Franca de Xira, 19 da Marina do Parque das Nações, 17 de Alcântara e 20 de Belém. As colheitas foram realizadas em garrações de 20 L, que no laboratório, foram divididas para a análise de diferentes parâmetros: 1 L de

amostra foi usado para deteção de *E. coli* e EF, 1 L para a deteção de Colifagos somáticos e Bacteriófagos de *B. fragilis*, 2 L de amostra foram utilizados para deteção de mtDNA de humanos, suínos, bovinos e aves e 10 L de cada amostra foram utilizados para a concentração de Adenovírus. As amostras foram colhidas sempre no mesmo local e na altura de maré alta. Os horários das marés altas foram obtidos no site <http://www.portodelisboa.pt>. Antes das colheitas, os garrafões eram lavados no laboratório e com água do rio de cada ponto, sendo esta água descartada. Para evitar contaminações com mtDNA de humanos, as amostras eram colhidas com luvas. Nos dias 12 e 26 de fevereiro foram feitas colheitas apenas nos pontos de MPN e Belém. A partir do dia 05 de março foi iniciada a colheita do ponto de VFX, e a partir do dia 19 de março foi iniciada a colheita em ALC, sendo em todos os outros dias de colheitas realizados os quatro pontos, com excessão do dia 17 de agosto, em que apenas foram realizados os pontos de Belém e ALC.

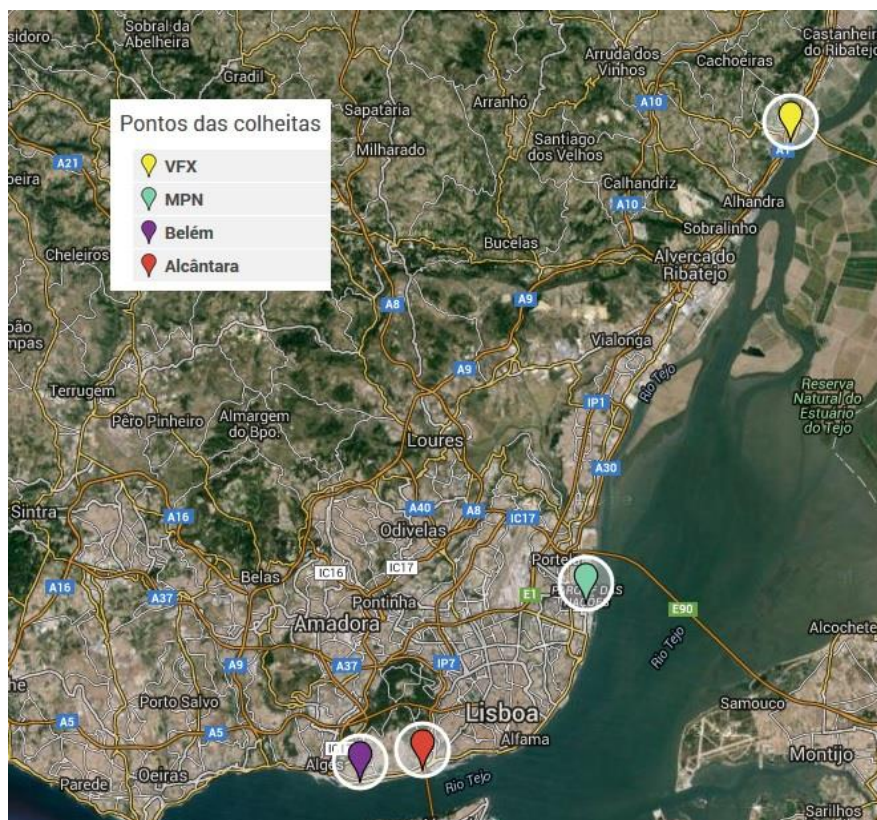


Figura 8) Pontos das colheitas realizadas ao longo do rio Tejo (retirado de <https://www.google.com/maps>)

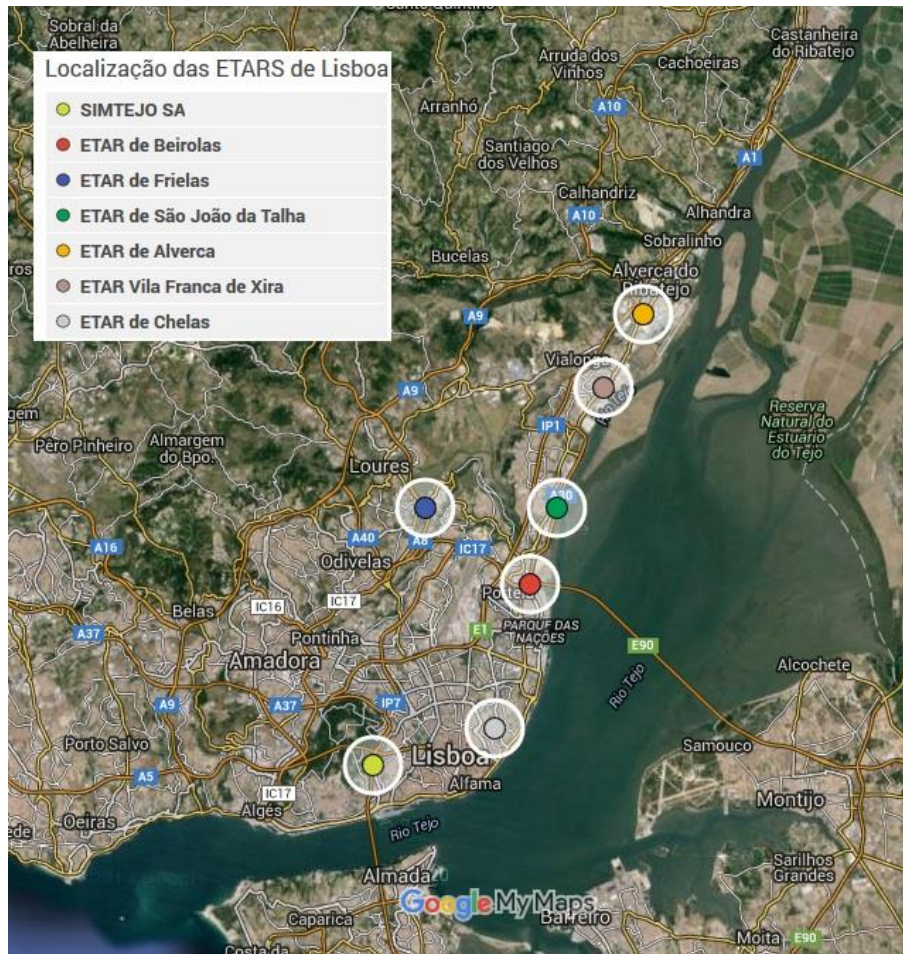


Figura 9) Localização das ETAR's na cidade de Lisboa (retirado de <http://www.google.com/maps>)



Figura 10) Concelhos abrangidos pelo Sistema Multimunicipal de Saneamento do Tejo e Trancão

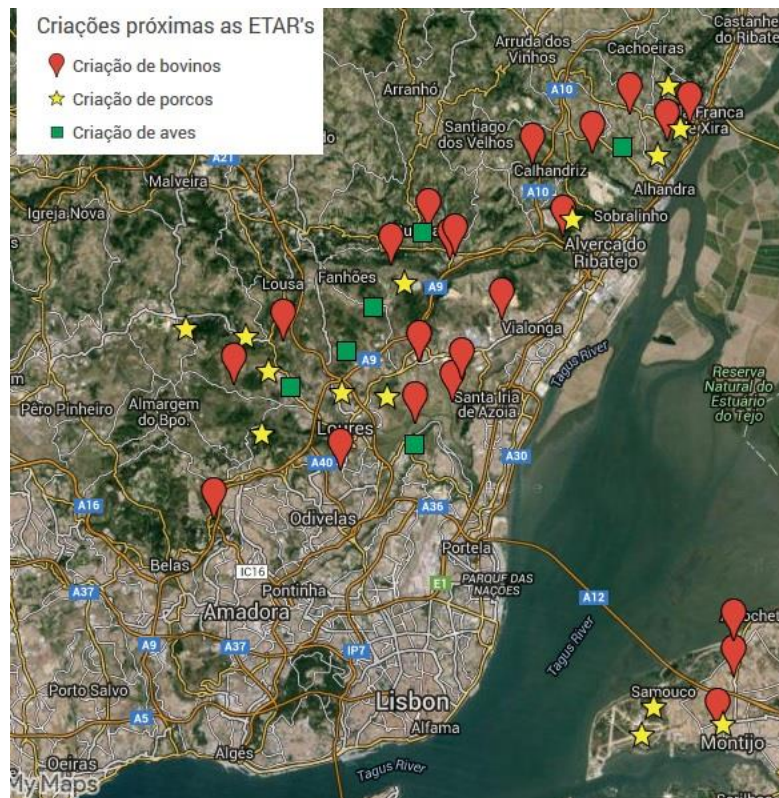


Figura 11) Criações de bovinos, suínos e aves de consumo humano nas proximidades das zonas abrangidas pelas ETAR's envolvidas neste trabalho

2.2 Quantificação do número de microrganismos indicadores em amostras de água

Materiais, equipamentos e reagentes

- Quanti-Tray (IDEXX);
- Substrato definido (IDEXX);
- Micro-placa Quanti- Tray (IDEXX);
- Selador (IDEXX);
- Água estéril;

A quantificação do número de bactérias indicadoras, *E. coli* e EF, foi efetuada utilizando Colilert-18 e Enterolert (IDEXX), que se baseia no Número Mais Provável (NMP). Este método consiste na degradação de compostos por ação de enzimas existentes nas duas bactérias. O grupo dos coliformes possuem a enzima β -D-galactosidase, que degrada o composto *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) presente no meio, dando origem a dois compostos diferentes, o β -D-galactopiranosídeo e o *o*-nitrofenol, que irá alterar a cor do meio de incolor para amarelo. (Novel e Novel 1976). Adicionalmente, a *E. coli* tem a capacidade de clivar o composto metilumbeliferil- β -glucuronídeo (MUG), através da ação da enzima β -glucuronidase, resultando na formação do produto fluorescente 4-metilumbeliferona, que é detetado por luz U.V após incubação a 37°C por 18h. Para a deteção de EF, o método baseia-se na atividade enzimática de β -D-glucosidase que metaboliza o composto 4-

metilumbeliferil- β -D-glucósídico produzindo a molécula 4-metilumbeliferona, gerando fluorescência quando incubado a 44°C por 24h (Eckner, 1998).

Procedimento experimental:

1. Adicionou-se o conteúdo de substrato definido indicado para os microrganismos em pesquisa (*E. coli* ou EF) a 100 mL de amostra (direta ou diluída). De uma maneira geral, foram utilizados 03 mL e 05 mL de amostras para *E. coli* e EF, respectivamente, ao qual se adicionou o volume de água necessário para perfazer 100 mL;
2. a mistura foi agitada até completa dissolução do substrato e foi de seguida colocada na microplaca Quanta-Tray e selada;
3. as microplacas contendo as amostras para detecção de *E. coli* foram incubadas a 37°C durante 24 horas e para a detecção de EF incubadas a 41°C por 24 horas.

Os resultados foram lidos utilizando luz U.V, contando os poços que emitiam fluorescência. A tabela no anexo E, ponto E. 1 e E.2 mostra como foram interpretados os resultados. O número de poços positivos (fluorescentes) foi cruzado com a tabela de NMP, que dá o Número Mais Provável de organismos.

2.3 Procedimento de isolamento e quantificação do número de Colifagos somáticos com amostras diretas

Materiais e equipamentos

- Meio MSA (em placas) (Anexo B ponto B.4);
- Meio ssMSA (Anexo B ponto B.5);
- Tubos de 15 mL (Falcon);
- Membranas de descontaminação de poro 0,2 μ m (Fischer Scientific);
- Seringas de 05 mL;
- Incubadora termostaticamente controlada a (36 \pm 2) °C;
- Incubadora termostaticamente controlada a (37 \pm 1) °C com agitação;
- Inóculo de *E. coli* (Anexo C ponto C.1).

Procedimento experimental:

1. O inóculo de *E. coli* foi preparado de acordo com o descrito no Anexo C;
2. o meio ssMSA foi liquefeito e colocado num banho a (45 \pm 1) °C. Após arrefecimento do meio, foram adicionados 600 μ L de uma solução de CaCl₂;
3. a cada tubo foram adicionados 2 mL de amostra descontaminada ;

4. ao tubo contendo amostra, foram adicionados 2 mL do inóculo de *E. coli*. A mistura foi então distribuída, em volumes de 2 mL por diferentes tubos (2 tubos de 15 mL contendo 2 mL cada, 1 mL de amostra e 1 mL de inóculo);
5. a cada tubo foi adicionado 2,5 mL de ssMSA e após agitação da mistura, esta foi colocada sobre placas contendo meio MSA, devidamente identificados;
6. após solidificação do meio, as placas foram incubadas a (37 ± 2) °C por (24 ± 2) h, em posição invertida.

Após o período de incubação, procedeu-se à contagem do número de halos de lise formados em cada placa.

2.3.1 Concentração, isolamento e quantificação do número de Colifagos Somáticos nas amostras de água

Para amostras que apresentavam baixos valores de colifagos, e que dificultavam a sua detecção, era efetuado um passo de concentração de amostras, através da filtração desta por uma membrana de 0,22 µm.

Materiais, equipamentos e reagentes para a concentração das amostras

- Filtros GSWP04700 (0,22 µm, 47 mm Ø, Millipore®);
- MgCl₂.6H₂O 4,14 M (Anexo D ponto D.1);
- Rampa de filtração;
- Câmara de ultra-sons (ELMA);
- Copos estéreis de urina;
- Eluente (Ponto D.2 do Anexo D);
- Tubos de centrifuga de 50 mL (Falcon).

Procedimento experimental:

1. A 100 mL de cada amostra era adicionado 15% de 4,14 M MgCl₂.6H₂O;
2. as amostras foram homogenizadas antes da filtração;
3. as amostras foram de seguida filtradas com filtro GSWP04700, utilizando uma rampa de filtração;
4. após filtração, a membrana foi cortada em 8 pedaços e colocada num tubo de centrifugação de 50 mL, onde tinham sido adicionados 5 mL de eluente de concentração de fagos;
5. os tubos de centrifugação contendo o eluente e a membrana foram eluídos numa câmara de ultrassons durante 5 minutos com uma frequência de 45 Hz.

Materiais e reagentes para a detecção e enumeração de Colifagos Somáticos

- Meio MSA (em placas) (Ponto B.4 do Anexo B);

- Meio ssMSA (Ponto B.5 do Anexo B);
- Tubos de centrífuga de 15 mL (Falcon);
- Filtros de descontaminação com porosidade de 0,2 µm (Fischer Scientific);
- Seringas de 5 mL;
- Incubadora termostaticamente controlada a (36±2) °C;
- Incubadora termostaticamente controlada a (37±1) °C com agitação;
- Banho de temperatura controlada a (45±1) °C;
- Inóculo de *E. coli* (Ponto C.1 do Anexo C).

Procedimento experimental:

1. O inóculo de *E. coli* foi preparado de acordo com o descrito no Anexo C;
2. o meio ssMSA foi liquefeito no microondas e colocado num banho a (45±1) °C. Após arrefecimento do meio, foram adicionados 600 µL de uma solução de CaCl₂;
3. os 5 mL correspondendo ao eluato das amostras concentradas foram filtradas para descontaminação de bactérias e fungos utilizando filtros de poro 0,2 µm;
4. foram adicionados 5 mL do inóculo de *E. coli* no tubo contendo a amostra filtrada e a mistura foi distribuída em réplicas de 2 mL por 4 tubos diferentes (5 tubos contendo 2 mL cada, 1 mL de amostra e 1 mL de inóculo);
5. a cada tubo foi adicionado 2,5 mL de ssMSA e após agitação, a mistura foi colocada sobre placas de petri contendo meio MSA pré-aquecido à temperatura ambiente, e devidamente identificadas;
6. após solidificação, as placas foram incubadas a (37 ± 2)°C por (24 ± 2) h, em posição invertida.

Após o período de incubação, procedeu-se à contagem do número de halos de lise formados em cada placa.

2.4 Isolamento e quantificação do número de Bacteriófagos de *B. fragilis* nas amostras de água

Materiais, equipamentos e reagentes para a concentração das amostras

- Filtros GSWP04700 (0,22 µm, 47 mm Ø, Millipore®);
- MgCl₂.6H₂O 4,14 M (Anexo D ponto D.1);
- Rampa de filtração;
- Eluente (Ponto D. 2 do Anexo D);
- Câmara de ultrassons (ELMA);
- Tubos de centrifugação de 50 mL (Falcon).

Procedimento experimental:

Foi seguido, para a filtração, o procedimento experimental anteriormente descrito para a concentração dos colifagos somáticos, com alteração no volume de amostra utilizado para a detecção destes bacteriófagos, sendo este de 1L.

Materiais e reagentes para a detecção e enumeração de Bacteriófagos de *B. fragilis*

- Meio BRPMA (em placas) (Anexo B ponto B.7);
- Meio ssBRPMA (Anexo B ponto B.8);
- Membranas de descontaminação de poro 0,2 µm (Fischer Scientific);
- Seringas de 05 mL;
- Jarros de anaerobiose;
- Saquetas de anaerobiose AnaeroGen™ 2.5 L (Oxoid);
- Incubadora termostaticamente controlada a (36 ± 2) °C;
- Banho de água de temperatura controlada a (45 ± 1) °C;
- Inóculo de GB 124 (Ponto C.2 do Anexo C).

Procedimento experimental:

1. O inóculo foi preparado como descrito em Anexo C;
2. o meio ssBRPMA foi liquefeito e mantido num banho de água a 45°C até sua utilização;
3. os 5 mL das amostras filtrados foram descontaminados através de filtros com porosidade 0,2 µm;
4. a cada amostra, foram adicionados 5 mL do inóculo GB 124. A mistura foi igualmente distribuída em réplicas de 2 mL (5 tubos de 15 mL contendo 2 mL cada, 1 mL de amostra e 1 mL de inóculo);
5. a cada tubo foram adicionados 2,5 mL de ssBRPMA e a mistura foi colocada cuidadosamente sobre as placas contendo meio BRPMA, devidamente identificadas;
6. após solidificação do meio, as placas foram colocadas em jarros de anaerobiose, juntamente com saquetas de anaerobiose e incubadas a (37 ± 2) °C por (24 ± 2) h, em posição invertida.

2.5 Concentração de amostras para detecção de DNA mitocondrial

Materiais e equipamentos

- Centrifuga 5804 (Eppendorf);
- Tubos de 15 mL e 50 mL (Falcon)
- Congelador a (-80 ± 10) °C.

Procedimento experimental:

1. 2 L de cada amostra foram concentrados por centrifugação a 9000 xg durante 15 minutos;

2. após a última centrifugação, o sedimento foi eluído com 10 mL da própria amostra;
3. depois de eluída, a amostra, devidamente identificada, foi colocada num congelador a (-80±10) °C até a extração do DNA mitocondrial (2.7).

Devido à possibilidade de contaminação das amostras com DNA mitocondrial humano como consequência do seu manuseamento, era adicionado um controlo de processo, para evitar gerar falsos-positivos. Este controlo consistia na utilização de água destilada estéril que seguia todo o processo, desde a concentração à quantificação por PCR.

2.6 Concentração de amostras para deteção de adenovirus

Materiais, reagentes e equipamentos

- Centrifuga (Sigma 3-18K);
- Leite em pó magro (*Skimmed milk*) (Anexo A ponto A.1);
- 0,2 M Tampão fosfato (Anexo A ponto A.2);
- Agitador magnético (IKA®- WERKE Big-squid);
- Medidor de pH (Hanna Instruments);
- Tubos de 15 mL (Falcon);
- HCl 37%.

Procedimento experimental:

1. Uma solução de 1% (p/v) de leite em pó magro pré-floculada foi previamente preparada e o pH ajustado a 3.5;
2. a amostra foi cuidadosamente acidificada a pH 3.5;
3. a solução de leite em pó magro foi adicionada às amostras, até à concentração final de 0,01% (p/v);
4. as amostras foram colocadas em agitação durante 8 h;
5. após o período de agitação, as amostras ficaram 8 h em repouso, para permitir a sedimentação dos materiais em suspensão;
6. o sobrenadante foi descartado até se ficar com aproximadamente 500 mL de amostra;
7. as amostras foram centrifugadas a 5500 rpm durante 45 minutos a 12°C;
8. depois de centrifugadas, o sobrenadante foi removido e os sedimentos foram ressuspendidos em 8 mL de 0,2 M tampão fosfato;
9. a amostra foi transferida para um tubo de 15 mL e o volume foi ajustado com 0,2 M *Phosphate Buffer* até 10 mL;
10. as amostras foram armazenadas a - 80°C até a realização da extração viral.

2.7 Extração de ácidos nucleicos

A extração de ácidos nucleicos foi efetuada utilizando um kit disponível comercialmente, QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN), de acordo com o manual do fabricante.

De uma maneira sucinta:

1. Foram pipetados 560 µl do preparado *Buffer* AVL contendo o *carrier* RNA em *ependorfs* de 1.5 mL;
2. foi adicionado 140 µl da amostra ao *Buffer* AVL-carrier RNA nos *ependorfs* e misturados com auxílio do vórtex por 15 segundos;
3. as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 10 min;
4. os tubos foram brevemente centrifugados para remover gotas que possam ter ficado na tampa;
5. 560 µl de etanol 96% foram adicionados a amostra, e misturados por vórtex por 15 segundos. Após o vortex, as amostras foram brevemente centrifugadas para remover gotas que possam ter ficado na tampa;
6. cuidadosamente foi aplicado 630 µl da solução do passo 5 no *QIAamp Mini Spin column* (fornecida no kit), colocado num tubo de 2 mL. A tampa foi fechada e os tubos centrifugados a 6000 xg (8000 rpm) por 1 min. O *QIAamp Mini spin column* foi colocado em outro tubo de 2 mL e o tubo contendo o filtrado foi descartado;
7. o passo 6 foi repetido;
8. o QIAamp foi aberto cuidadosamente e adicionados 500 µl do *Buffer* AW1. A tampa foi fechada e os tubos centrifugados a 6000 x g (8000 rpm) por 1 min. O *QIAamp Mini spin column* foi colocado em outro tubo de 2 mL e o tubo contendo o filtrado foi descartado;
9. foram adicionados 500 µl de *Buffer* AW2 a cada *QIAamp Mini spin column* e centrifugados a 20000 x g (14000 rpm) durante 3 minutos;
10. o *QIAamp Mini spin column* foi colocado em um *ependorf* de 1,5 mL com tampa cortada e o tubo de 2 mL com o filtrado foi descartado. 06 µl de *Buffer* AVE (a temperatura ambiente) foram adicionados ao *QIAamp Mini spin column* e incubados a temperatura ambiente por 1 min. Os tubos foram centrifugados a 6000 x g (8000 rpm) por 1 minuto;
11. O filtrado foi passado para *ependorfs* de 1,5 mL estéreis e devidamente identificados e armazenados a -20°C até a realização do PCR.

2.8 Quantificação de ácidos nucleicos por qPCR

Materiais, reagentes e equipamentos

- Equipamento de PCR 7300 *Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems*)

A amplificação enzimática foi realizada num volume final de 25µL e que continha: 12,5 µL de *2xTaqMan® Environmental Master Mix 2.0* (ThermoScientific), 7,1 µL de água estéril DNA- e RNA-*free*, 0,8 µM de cada um dos *primerse* 0,2 µM de sonda (*probe*) (Tabela 4) e 5 µL de amostra. Para a

deteção de todos os serótipos de HAdV foram utilizadas duas sondas com a mesma concentração (Tabela 4).

A quantificação de resultados requer a utilização de uma reta de calibração (Figura 12). As retas de cada um dos parâmetros analisados por qPCR foram obtidas a partir de diluições seriadas de DNA quantificado.

Por forma a lidar com a possível existência de compostos que causam a inibição da reação de qPCR, dando origem a falsos-negativos, as amostras foram analisadas diretamente e diluídas (1:10; 1:100).

Procedimento experimental:

- 1- Preencher toda a informação necessária no *software* que irá proceder à análise dos resultados, incluindo qual o alvo, a posição das amostras na placa de 96 poços onde ocorrerá a mistura reacional, os poços correspondentes à reta de calibração e o correspondente ao branco de PCR.
- 2- 20 µL da mistura reacional previamente descrita foram distribuídos por cada poço da microplaca a ser utilizado;
- 3- Foram então adicionados, nos respetivos poços, 05 µL de cada um dos pontos da reta de calibração, de amostra, do controlo de processo e de água DNA e RNA-*free* (branco de reação).
- 4- Os resultados foram visualizados no software do equipamento de forma a garantir que todos os controlos passavam no controlo de qualidade.

Para aferir da qualidade dos resultados, foram adicionados à corrida de PCR amostras de diversos pontos críticos:

- branco de reação (N);
- controlo de processo de concentração e extração;
- recta de calibração, cujo coeficiente de correlação (R^2) deverá ser sempre superior a 0,980;
- duplicado por corrida.

Todas as curvas de amplificação foram verificadas para a identificação de falsos-positivos, isto é, reações com valores de Ct atribuídos, mas que não estão associados com amplificação exponencial, e que podem ser causados por ruídos de fundo elevados ou imperfeitos. Adicionalmente, todas as curvas de fluorescência real foram verificadas para garantir que o valor de Ct gerado pelo *software* corresponde efetivamente à fase exponencial da amplificação, ou seja, que não é distorcido por ruídos de fundo elevados ou imperfeitos. Nos casos em que se verificasse este fato, os valores corretos de Ct deveriam ser apontados e utilizados.

Uma corrida de qPCR só era validada como sendo apropriada após a visualização das curvas de amplificação e de se verificar que todos os controlos se encontravam dentro do espectável. O branco da corrida de qPCR e o controlo de processo/extração tinham que ser negativos e era necessário assegurar que a reta de calibração apresentava um coeficiente de correlação superior a 0,980. Caso alguma destas condições não se verificasse, o qPCR teve que ser repetido ou as amostras extraídas novamente.

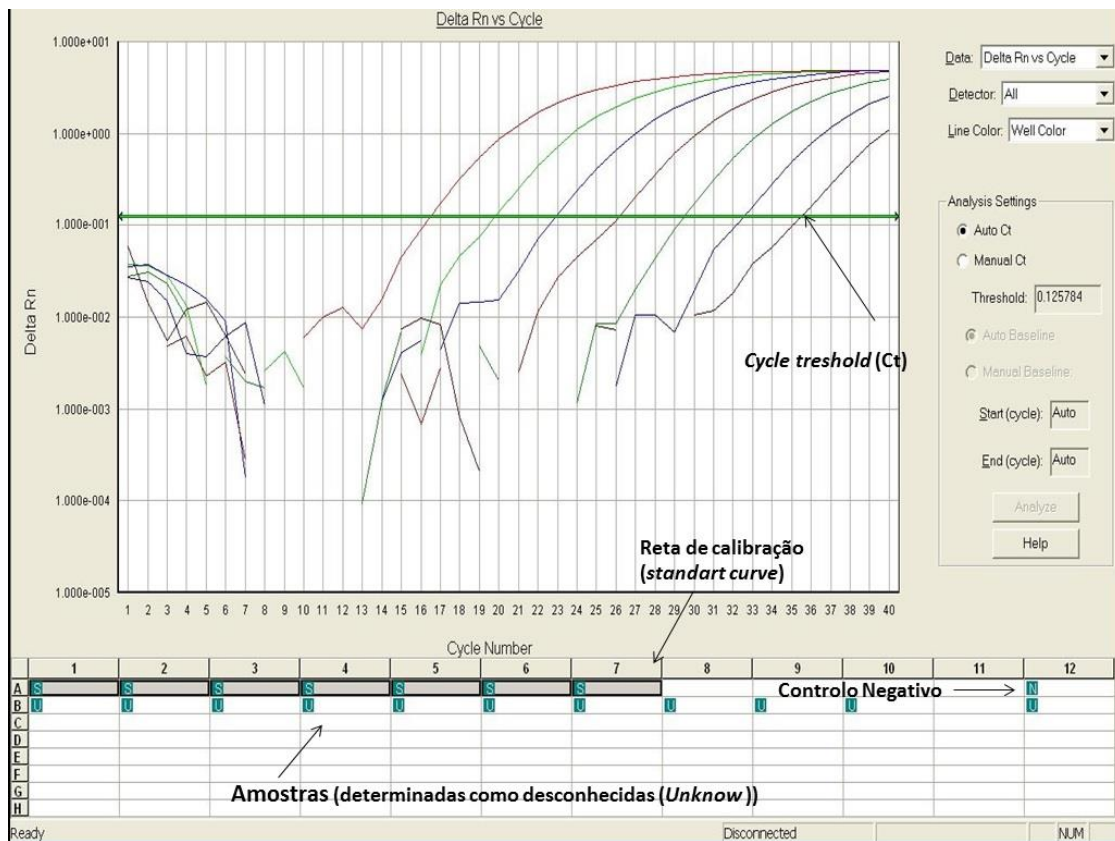


Figura 12) Curva de amplificação da reta de calibração de humanos obtida por PCR em tempo real. Pela seta de cima está demonstrado o Ct, que é onde o ciclo de cada amostra cruza com o treshold (ponto de deteção da fluorescência). Também está representado o controlo negativo (N), que foi utilizado em todos os ensaios realizados, e as amostras (U) (figura da autora)

	Primer ou sonda	Sequência Nucleotídica	Localização alvo	Tamanho (pb)	Número de catalogo (Accession number)	Referência
HAdV	HAdV_F	CWT ACA TGC ACA TCK CSG G	18373-18441	68		Hernroth <i>et al</i> , 2002
	HAdV_R	CRC GGG CRA AYT GCA CCA G				
	Ad:ACDEF	(6FAM)-CCG GGC TCA GGT ACT CCG AGG CGT CCT- (BHQ1)				
	Ad:B	(6FAM)-CCG GAC TCA GGT ACT CCG AAG CAT CCT- (BHQ1)				
Hum	Hum_F	AGT CCC ACC CTC ACA CGA TTC TTT	15257-15280	180	KP635241.1	Schill e Mathes, 2008
	Hum_R	AGT AAG CCG AGG GCG TCT TTG ATT	15441-15418			
	Hum_P	(FAM)-ACC CTT CAT TAT TGC AGC CCT AGC AGC ACT-(BHQ1)	15299-15328			
Cow	Cow-F	AAT GCA TTC ATC GAC CTT CCA GCC	14560-14583	172	KT033901.1	Schill e Mathes, 2008
	Cow-R	ACG TCT CGG CAG ATA TGG GTA ACA	14732-14709			
	Cow-P	(JOE)- TCG GTT CCC TCC TGG GAA TCT GCC T- (BHQ1)	14612-14636			

Pig	Pig-F	CGA CAA AGC AAC CCT CAC ACG ATT	15969-15992	115	KM101042.1	Schill e Mathes, 2008
	Pig-R	TAG GGT TGT TGG ATC CGG TTT CGT	16084-16061			
	Pig-P	(TAMRA)-ATC CTG CCA TTC ATC ATT ACC GCC CT- (BHQ2)	16009-16034			
Poultry	Poultry-F	TAG CCA TGC ACT ACA CAG CAG ACA	15058-15081	102	KP742951.1	Schill e Mathes, 2008
	Poultry-R	TTT GCG TGG AGA TTC CGG ATG AGT	15160-15137			
	Poultry-P	(FAM)-ACT TGC CGG AAC GTA CAA TAC GGC-(BHQ)	15111-15134			

Tabela 4) *Primers* e sondas utilizados para a detecção de HAdV, mtDNA de Humanos, mtDNA de Bovinos, mtDNA de Suínos, mtDNA de Aves, respectivamente

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação quantitativa dos indicadores microbiológicos clássicos e dos marcadores MST

Neste estudo foram efetuadas colheitas num total de 73 amostras em quatro pontos diferentes ao longo do Rio Tejo (Figura 8). As colheitas ocorreram no período compreendido entre 12 de Fevereiro e 20 de Agosto. Do total das 73 amostras recolhidas, 19 são provenientes da MPN, 17 de VFX, 20 de Belém e 17 de ALC. A Figura 13 resume a percentagem de positividade dos diferentes microrganismos analisados e inclui todos os pontos de todos os dias de colheitas. A partir dos valores obtidos conclui-se que tanto *E. coli* como EF e CS foram encontrados em praticamente todas as amostras de todos os dias de colheitas.

Os Bacteriófagos de *B. fragilis* estirpe GB-124 foram encontrados em quantidades mínimas. Este resultado foi contrário ao esperado pelo fato de que esta estirpe foi utilizada em diversos estudos que comprovaram sua eficácia na deteção de diferentes tipos de bacteriófagos em diferentes localidades no mundo (McMinn *et al.*, 2014; Ebdon *et al.*, 2007). Porém, também foi descrito em outros estudos que os bacteriófagos de *Bacteroides* são muito específicos, sendo que uma estirpe de *Bacteroides* isolada numa determinada parte do mundo pode não ser específica o suficiente para funcionar em outro local (Payan *et al.*, 2005; Puig *et al.*, 1999). Portanto, esse baixo nível de fagos encontrado neste estudo pode ser justificado pelo fato de que a estirpe de *B. fragilis* GB-124 utilizada foi isolada na Inglaterra, e, como já referido, a deteção de um dado fago por uma estirpe específica pode variar geograficamente (Jofre *et al.*, 2011). O clima, alimentação e flora intestinal humana da Inglaterra e de Portugal diferem muito, podendo este ser o motivo para tal resultado. Portanto pode-se concluir com isto que esta estirpe hospedeira não é eficiente na deteção de bacteriófagos.

Os Adenovirus foram detetados e quantificados em 40% das amostras colhidas, através do método de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) específico para a deteção de Adenovirus humanos. Trata-se de uma percentagem considerável dado que as amostras são provenientes de rio. Como os marcadores moleculares utilizados detetam apenas Adenovirus humanos, podemos concluir que as amostras que se encontram positivas possuem contaminação de origem humana. Deve-se levar em consideração que os vírus são naturalmente mais difíceis de serem encontrados do que as bactérias em amostras ambientais, principalmente em águas, pois estão em menor número, e isso exige um maior volume de amostra. Também, e apesar de os vírus serem mais resistentes no ambiente que as bactérias em geral, eles não se multiplicam sem um hospedeiro, e, portanto, quando são constantemente detetados, isso significa que estão constantemente a ser excretados para o ambiente.

Foram encontradas altas densidades de mtDNA de humanos (90%) e bovinos (92%), e menores densidades de mtDNA de suínos (58%) e aves (37%). Isto se deve ao fato de Lisboa ser uma zona urbana densamente povoada, mas que também contém nos seus arredores explorações agrícolas, com criação de animais, principalmente de gado bovino e suíno, e também alguma criação de aves. Em Portugal, estima-se que existam cerca de 1.029.905 cabeças de gado bovino, 458.806 cabeças de gado suíno e 403.047 de aves (INE, 2011), e a quantidade total de efluentes produzidos pelo setor pecuário

(explorações de bovinos, suínos e aves) é de cerca de 20 a 25 milhões de toneladas por ano, sendo que as explorações de gado bovino contribuem para quase 25% do total (Pereira, 2005). Com isto, é normal que haja uma maior percentagem de mtDNA de humanos (mtDNA *Human*) e mtDNA de bovinos (mtDNA *Cow*) encontrados nas águas do Rio Tejo, comparativamente com mtDNA suíno (mtDNA *Pig*) e mtDNA de aves (mtDNA *Poultry*), considerando que muitas destas explorações descarregam os seus efluentes no rio Tejo (direta (através das próprias ETAR's ou de forma ilegal sem tratamento) ou através de ETAR's municipais).

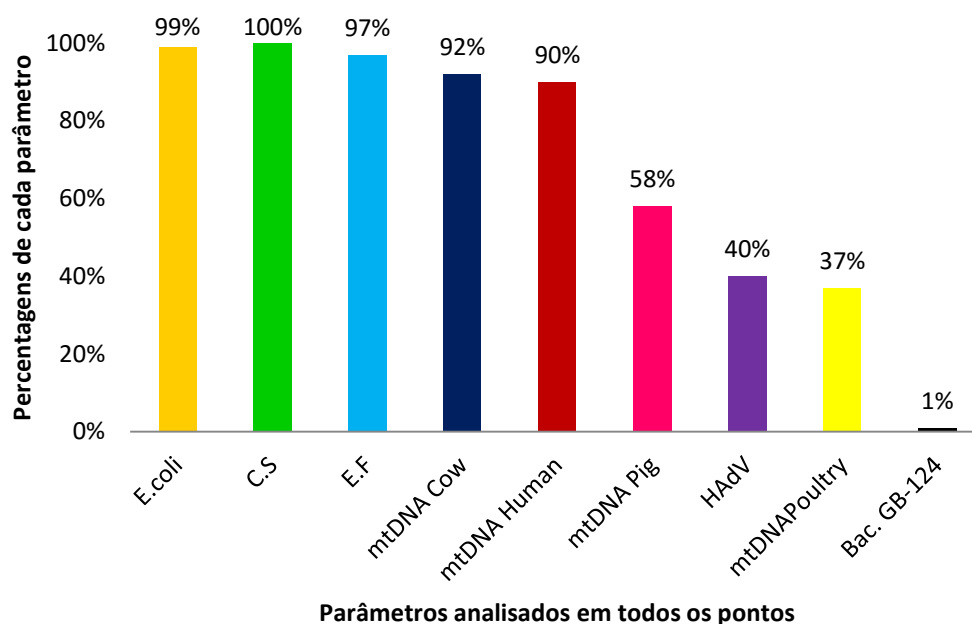


Figura 13) Percentagem de positividade de todos os dias e todas as amostras

Estudos anteriores demonstraram que existe um aumento da contaminação fecal em águas superficiais e balneares após um período de chuvas (Ackerman e Weisberg, 2003; Noble *et al.*, 2003; Jiang e Chu, 2004). Este fato foi também comprovado durante o decorrer deste estudo, pois se verificou a ocorrência de precipitações em alguns dias que precediam dias de colheitas e inclusive durante os próprios dias de colheitas. Observou-se, portanto que durante períodos de chuva houve alterações no número dos microrganismos indicadores bacteriológicos (*E. coli* e EF), dos Colifagos somáticos e dos marcadores moleculares (HAdV e mtDNA's).

3.2 Avaliação dos indicadores

Os resultados de todos os marcadores analisados com as respetivas datas de realização das colheitas, obtidos nos pontos de recolha (VFX (A), MPN (B), ALC (C) e Belém (D)) estão representados na Figura 14. As percentagens de deteção de todos os marcadores analisados estão representadas na Figura 15.

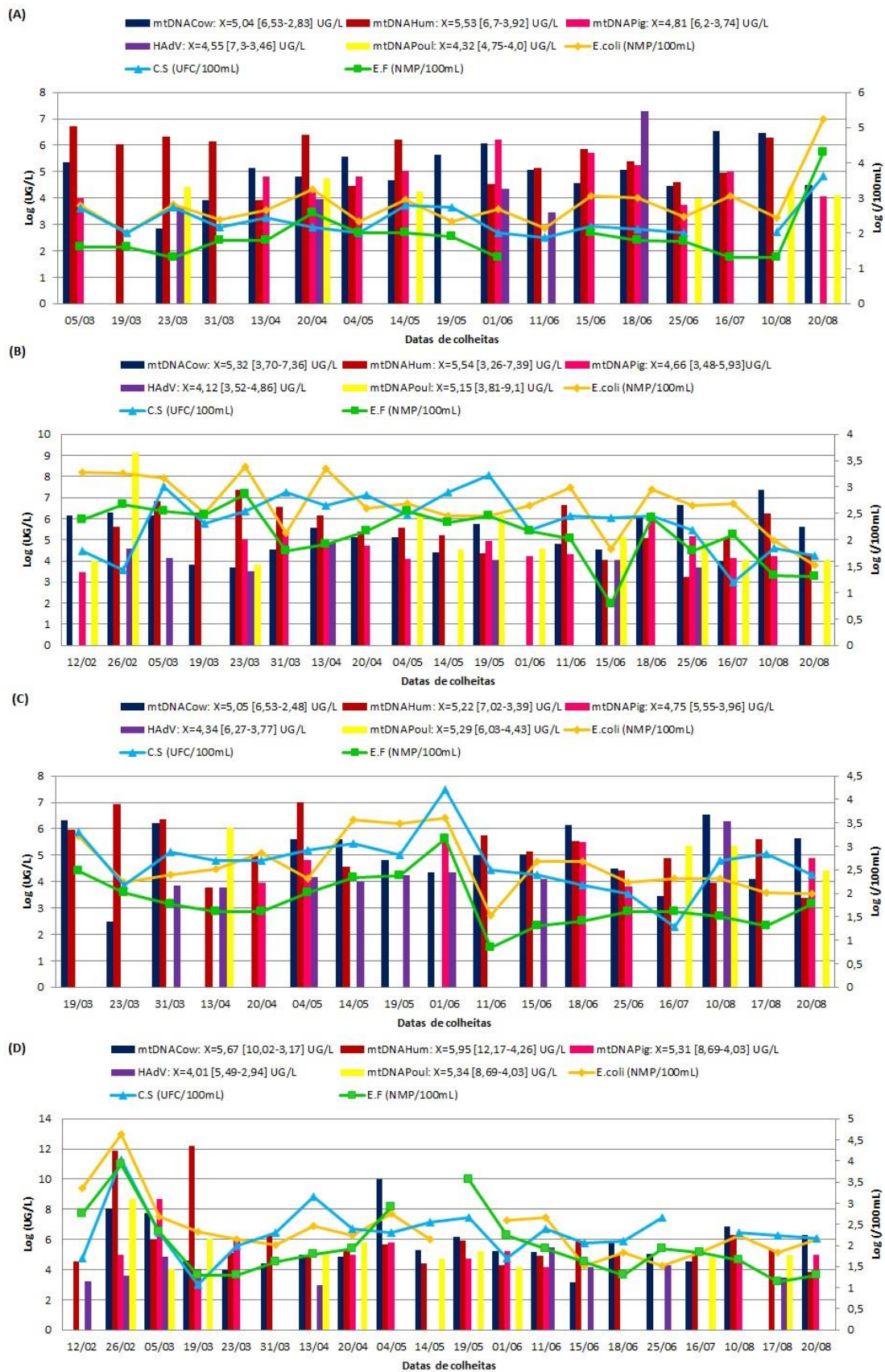


Figura 14 Resultados obtidos para os marcadores analisados no estudo (*E. coli*; EF) (NMP Log₁₀/100 mL); (CS; Bacteriófagos de GB-124) (PFU Log₁₀/100 mL); (HAdV; mtDNA humano, mtDNA bovino; mtDNA suíno; mtDNA aves) (Ug Log₁₀/L) para os diferentes locais de amostragem (VFX (A); MPN (B); ALC (C) Belém(D))

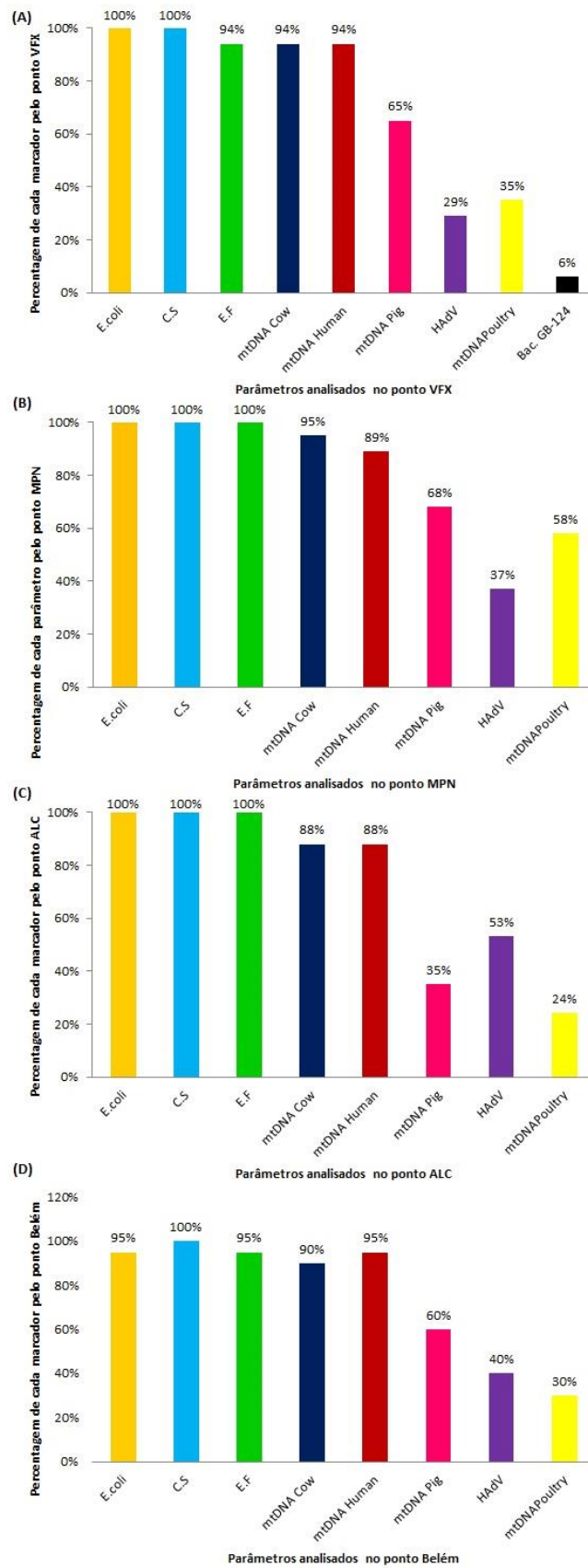


Figura 15) Percentagens de todos os marcadores analisados durante o período de colheitas nos pontos de (A) VFX; (B) MPN; (C) ALC e (D) Belém

A Figura 14 (A) representa as concentrações em que foram encontrados todos os parâmetros analisados para o ponto VFX. Os valores para os indicadores bacteriológicos clássicos encontram-se entre 2,01 Log₁₀ e 5,24 Log₁₀ NMP/100 mL para *E. coli* e 1,3 Log₁₀ e 4,28 Log₁₀ NMP/100 mL para EF. A média de valores para estes microrganismos neste ponto foi de 2,78 Log₁₀ NMP/100 mL e 1,90 Log₁₀ NMP/100 mL para *E. coli* e EF, respetivamente. O valor da média não entra em conta com o valor do dia 20/08, considerado como sendo um ponto *outlier*, com o valor de 5,24 Log₁₀ NMP/100 mL para *E. coli* e 4,29 Log₁₀ NMP/100 mL para EF, sendo que os restantes valores se encontraram estáveis durante o período de amostragem. Os valores para os CS, considerados como potenciais indicadores de vírus entéricos em águas encontraram-se entre 1,88 Log₁₀ a 2,77 Log₁₀ PFU/100 mL, sendo que a média dos seus valores foi de 2,36 Log₁₀ PFU/100 mL. Novamente, este valor não entra em consideração com o último dia de colheita em que se verificou um aumento acentuado nos valores deste microrganismo. Este incremento será explicado nos pontos 3.3.1, 3.3.2 e 3.3.3. Os HAdV foram encontrados em 29% das amostras analisadas para este ponto, correspondendo a um total de 5 amostras positivas. A média para este parâmetro foi 3,99 Log₁₀ UG/L encontrando-se os valores entre 3,45 Log₁₀ UG/L e 7,29 Log₁₀ UG/L com a média. Para o cálculo da média, não foi tido em consideração o dia 18/06, dado que se tratava de um *outlier*. VFX foi um dos locais de amostragem com maior número de positivities para DNA mitocondrial humano e de bovino, com valores percentuais de 94% (Figura 15 (A)) para ambos. A média dos valores de mtDNA humano foi de 6,05 Log₁₀ UG/L sendo que os valores variaram entre 3,92 Log₁₀ e 6,70 Log₁₀ UG/L. Os valores para o DNA mitocondrial de bovinos encontravam-se entre 2,83 Log₁₀ e 6,53 Log₁₀ UG/L sendo que a média se situou em 5,75 Log₁₀ UG/L. O DNA mitocondrial que deteta contaminação fecal de origem suína foi encontrado em 65% das amostras analisadas e os seus valores variaram entre 3,73 Log₁₀ e 6,19 Log₁₀ UG/L e a média resultante de 5,38 Log₁₀ UG/L. O mtDNA de aves para consumo humano (galinha, frango, peru, pato) foi, a par dos HAdV, um dos marcadores encontrados em menor prevalência neste ponto, com uma percentagem de positivities a rondar os 35% (Figura 15 (A)). Este parâmetro foi encontrado em valores compreendidos entre 3,99 Log₁₀ e 4,74 Log₁₀ UG/L, mantendo-se os resultados praticamente invariáveis entre os pontos positivos, com a média igual a 4,39 Log₁₀ UG/L. O parâmetro bacteriófagos de *Bacteroides* GB-124 foi positivo num único dia de amostragem (18/06), tendo sido encontrada apenas uma placa de lise por litro. De notar, que este microrganismo foi positivo apenas neste ponto para esta data.

Na Figura 14 (B) estão representados todos os marcadores (gerais e específicos de contaminação fecal) do ponto de colheitas localizado na MPN. Os valores para os indicadores bacteriológicos clássicos encontram-se entre 1,51 e 3,39 Log₁₀ NMP/100 mL para *E. coli* e 0,77 e 2,86 Log₁₀ NMP/100 mL para EF. A média de valores para estes microrganismos neste ponto foi de 8,02 Log₁₀ NMP/100 mL e 2,08 Log₁₀ NMP/100 mL para *E. coli* e EF, respetivamente. O valor da média não entra em conta com o valor do dia 15/06, que é considerado um ponto *outlier*, sendo 0,77 Log₁₀ NMP/100 mL para EF e 1,83 Log₁₀ NMP/100 mL para *E. coli*, sendo que os restantes valores se encontraram estáveis durante o

período de amostragem. Este decréscimo será explicado nos pontos 3.3.1 e 3.3.2. Os valores para os colifagos somáticos tiveram variações entre 1,43 Log₁₀ a 3,23 Log₁₀ PFU/100 mL, sendo que a média dos seus valores foi de 2,60 Log₁₀ PFU/100 mL. Os HAdV tiveram uma percentagem de 37% (Figura 15(B)), com um total de 07 amostras positivas. Os valores encontrados foram entre 3,52 e 4,57 Log₁₀ UG/L. A média para este marcador foi de 4,33 Log₁₀ UG/L.

MPN teve uma positividade de 89% para mtDNA humano. A média dos valores para esse parâmetro foi de 5,53 Log₁₀UG/L, com os valores variando entre 3,25 e 7,38 Log₁₀ UG/L. Para DNA mitocondrial de bovinos houve uma variação entre 3,70 e 7,35 Log₁₀ UG/L, com uma média de 5,31 Log₁₀ UG/L, e possui uma prevalência de 95%. O mtDNA de suínos foi encontrado em 68% (Figura 15(B)) das amostras, com seus valores a variar entre 3,48 Log₁₀ UG/L e 5,93 Log₁₀ UG/L, com uma média de 4,66 Log₁₀ UG/L. O DNA mitocondrial de aves para consumo humano foi encontrado em 58% das amostras, com uma média de 4,82 Log₁₀ UG/L, e uma variação de seus valores entre 3,81 e 6,29 Log₁₀ UG/L. O valor da média não entra em conta com o valor do dia 26/02, considerado como sendo um ponto *outlier*, com o valor de 9,10 Log₁₀ UG/L. Este elevado valor será explicado no ponto 3.3.8.

A Figura 14 (C) representa todos os marcadores do ponto de realização das colheitas localizado em ALC. Os valores para os indicadores bacteriológicos clássicos encontram-se entre 1,51 e 3,56 Log₁₀ NMP/100 mL para *E. coli* e entre 0,84 e 3,15 Log₁₀ NMP/100 mL para EF. A média de valores para estes microrganismos neste ponto foi de 2,58 Log₁₀ NMP/100 mL e 1,80 Log₁₀ NMP/100 ml para *E. coli* e EF, respectivamente. Os valores para os CS tiveram variações entre 1,27 e 3,30 Log₁₀ PFU/100 mL, sendo que a média dos seus valores foi de 2,64 Log₁₀ PFU/100 mL. No dia 11/06 pode se perceber, pelo gráfico, uma queda abrupta nos valores desses três parâmetros que será explicada nos pontos 3.3.1; 3.3.2 e 3.3.3.

ALC obteve a maior prevalência para HAdV dentre todos os pontos, que foram encontrados em 53% (Figura 15 (C)) das amostras analisadas para este ponto, correspondendo a um total de 09 amostras positivas. Os valores encontrados foram entre 3,77 e 6,27 Log₁₀ UG/L, com uma média 4,31 Log₁₀ UG/L. Neste ponto obtiveram-se os parâmetros de mtDNA humano e bovino, com valores percentuais de 88% para ambos. A média dos valores de mtDNA humano foi de 5,22 Log₁₀ UG/L sendo que os valores variaram entre 3,77 Log₁₀ e 7,01 Log₁₀ UG/L. Os valores para o mtDNA de bovinos encontravam-se entre 2,47 Log₁₀ e 6,31 Log₁₀ UG/L sendo que a média se situou em 5,05 Log₁₀ UG/L. Os valores para mtDNA de suínos e mtDNA de aves de consumo humano foram, neste ponto, os de menor prevalência dentre todos os pontos. O mtDNA de suínos foi encontrado em 35% das amostras, com seus valores a variar entre 3,79 e 5,55 Log₁₀ UG/L, com uma média de 4,74 Log₁₀ UG/L. O mtDNA de aves para consumo humano foi encontrado em 24% das amostras, com uma média de 5,28 Log₁₀ UG/L, e uma variação de seus valores entre 4,42 e 6,02 Log₁₀ UG/L.

A Figura 14 (D) representa todos os marcadores do ponto de realização das colheitas localizado em Belém. Os valores para os indicadores bacteriológicos clássicos encontram-se entre 1,51 e 4,63 Log₁₀

NMP/100 mL para *E. coli* e 1,30 e 3,91 Log₁₀ NMP/100 mL para EF. A média de valores para estes microrganismos neste ponto foi de 2,36 Log₁₀ NMP/100 mL e 2,01 Log₁₀ NMP/100 mL para *E. coli* e EF, respectivamente. Os valores para os CS tiveram variações entre 1,07 e 4,01 Log₁₀ PFU/100 mL, sendo que a média dos seus valores foi de 2,31 Log₁₀ PFU/100 mL. Belém possui uma prevalência de 40% para o parâmetro HAdV, tendo este sido encontrado em 08 dias de colheitas. Os valores encontrados foram entre 2,94 Log₁₀ UG/L e 5,49 Log₁₀ UG/L, com uma média de 4,00 Log₁₀ UG/L. Belém teve uma positividade de 95% (Figura 15 (D)) para mtDNA humano. A média dos valores para esse parâmetro foi de 5,22 Log₁₀UG/L, com os valores variando entre 3,84 e 6,31 Log₁₀ UG/L. Nesses valores não entram em conta com os valores dos dias 26/02 e 19/03, considerados como pontos *outlier*, com o valor de 11,90 Log₁₀ UG/L e 12,17 Log₁₀ UG/L, respetivamente, sendo que os restantes valores se encontraram estáveis durante o período de amostragem. Estes elevados valores serão explicados no ponto 3.3.5. Para mtDNA bovino houve uma variação entre 3,17 e 10,02 Log₁₀ UG/L, com uma média de 5,67 Log₁₀ UG/L, e possui uma prevalência de 90%. O mtDNA suíno foi encontrado em 60% das amostras, com variação nos valores de 4,03 a 8,68 Log₁₀ UG/L, com uma média de 5,30 Log₁₀ UG/L. O mtDNA de aves para consumo humano teve uma variação entre 3,64 e 5,55 Log₁₀ UG/L, com uma média de 4,55 Log₁₀ UG/L.

3.3 Parâmetros por ponto

3.3.1 *Escherichia coli*

Os valores obtidos para *E. coli* durante o período de amostragem estão representados na Figura 16. De uma maneira geral, os valores de *E. coli* mantiveram-se relativamente constantes durante o período de amostragem. Da análise mais detalhada do gráfico da Figura 16 verifica-se que o período em que os números de *E. coli* apresentam maior decréscimo compreende os meses de férias. Nesta altura a população encontra-se fora da cidade de Lisboa, diminuindo os caudais de entrada de afluentes nas ETAR's e como consequência, os caudais de saída dos efluentes, influenciando os níveis deste microrganismo.

Percebe-se pelo gráfico que no dia 26/02 em Belém houve um aumento nas concentrações deste parâmetro, com um valor de 4,63 Log₁₀ NMP/100 mL. Uma possível explicação para tal resultado é que as ETAR's têm caudais muito variáveis de acordo com a altura do dia. Este fato tem um impacto direto nos valores obtidos dos diferentes parâmetros estudados. As descargas podem variar de acordo com o caudal de entrada, com o tratamento ativo no momento e com o maior ou menor índice de descargas não tratadas. Também, no dia 20 de agosto verificou-se um aumento acentuado dos valores deste microrganismo para o ponto de colheita, VFX, chegando a valores superiores a 5,0 Log NMP/100 mL. Este dia correspondeu ao dia em que a água apresentava pior aspeto visual (presença de sólidos em suspensão e turbidez). Estudos prévios demonstraram que existe certa correlação dos níveis de turbidez e os níveis das bactérias indicadoras (Money *et al.*, 2009). Este pode ser um dos fatores que influenciaram os valores de *E. coli* neste dia específico de colheitas. No dia 19 de maio e 11 de

junho, em Belém e em ALC, respectivamente, este microrganismo foi detetado em quantidades muito baixas (<30 NMP/100 mL) e (1,51 Log₁₀ NMP/100 mL), respectivamente. Uma possível explicação poderá ser a queda acentuada de temperatura, com uma variação de aproximadamente 13°C em ambos os dias. Embora seja comumente aceite que a *E. coli* não se multiplica no ambiente, este fato acaba por não ser completamente verdade, dado que estudos comprovam a multiplicação deste microrganismo no ambiente a quando da presença de nutrientes. A velocidade de replicação de *E. coli* no ambiente é função da temperatura, entre outros fatores. Temperaturas mais elevadas potenciam uma maior velocidade. Um decréscimo acentuado da temperatura vai provocar um decréscimo na taxa de multiplicação destes microrganismos no ambiente. Como a presença de um organismo acaba por ser a relação entre a morte e a multiplicação do mesmo, uma menor taxa de multiplicação tem um efeito direto no número final destes organismos. Outra explicação poderá ser a de a água do rio Tejo não apresentar turbidez e sem material em suspensão, encontrando-se limpida (Anexo H – Tabela 24), isto deverá ser tido em consideração para a explicação destes resultados. Com a diminuição de turbidez, a penetração de radiação U.V (grande causadora de morte nos microrganismos) nas águas é mais eficiente e aumentando, portanto a probabilidade de inativação destes microrganismos. Muitos contaminantes são transportados em sedimentos e, para, além disso, uma água turva indica que pode ter havido uma fonte de poluição. Embora tenham ocorrido essas variações nos microrganismos indicadores, estes foram detetados em todas as amostras colhidas neste ponto de acordo com o esperado.

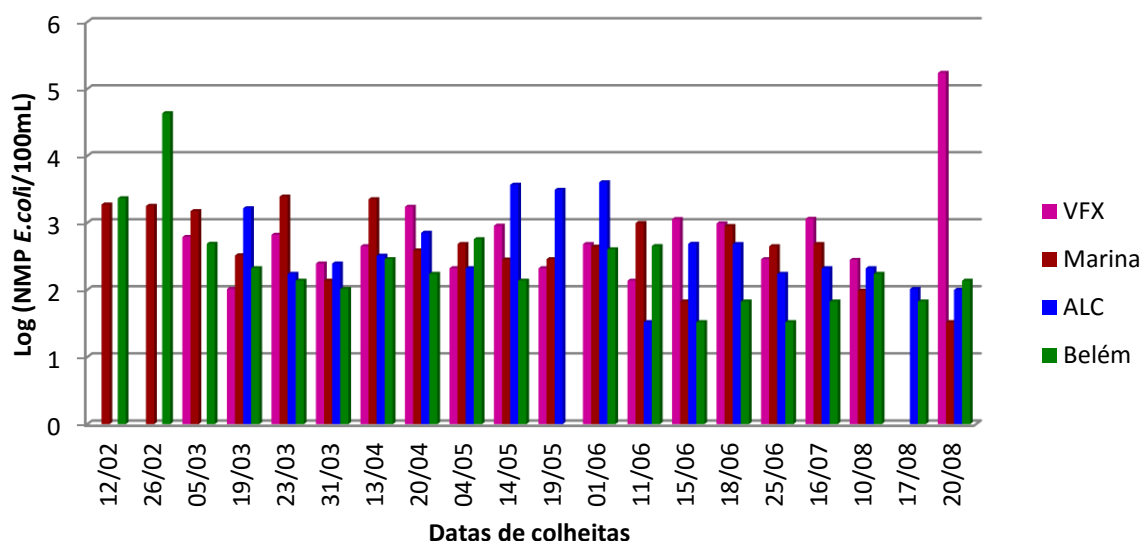


Figura 16) Concentração de *E. coli* nos diferentes pontos de colheita durante todo o período estudado

3.3.2 Enterococos Fecais

Os valores obtidos para EF durante o período de amostragem estão representados na Figura 17. De uma maneira geral, os valores de EF mantiveram-se relativamente constantes durante o período de amostragem. Da análise mais detalhada do gráfico da Figura 17 verifica-se que o período em que os

números de EF apresentam maior decréscimo compreende os meses de férias. Nesta altura a população encontra-se fora da cidade de Lisboa, diminuindo os caudais de entrada de afluentes nas ETAR's e conseqüentemente, os caudais de saída dos efluentes, influenciando os níveis deste microrganismo.

Percebe-se pelo gráfico que no dia 26/02 em Belém houve um aumento nas concentrações deste parâmetro, com um valor de 3,91 Log₁₀ NMP/100 mL. Também para este parâmetro uma possível explicação para tal resultado é que as ETAR's têm caudais muito variáveis de acordo com a altura do dia. Este fato tem um impacto direto nos valores obtidos dos diferentes parâmetros estudados. As descargas podem variar de acordo com o caudal de entrada, com o tratamento ativo no momento e com o maior ou menor índice de descargas não tratadas. Também, no dia 20 de agosto verificou-se um aumento acentuado dos valores deste microrganismo para o ponto de colheita, VFX, chegando a valores superiores a 4 Log₁₀ NMP/100 mL. Este dia correspondeu ao dia em que a água apresentava pior aspeto visual (presença de sólidos em suspensão e turbidez) (Anexo H – Tabela 24). Estudos prévios demonstraram que existe certa correlação dos níveis de turbidez e os níveis das bactérias indicadoras (Money *et al.*, 2009). Este pode ser um dos fatores que influenciaram os valores de EF neste dia específico de colheitas. No dia 14 de maio e 11 de junho, em Belém e em VFX, respetivamente, este microrganismo foi detetado em quantidades muito baixas (<20 NMP/100 mL). Uma possível explicação poderá ser a queda acentuada de temperatura, com uma variação de aproximadamente 9°C e 13°C, respetivamente. Embora seja comunmente aceite que os EF não se multiplicam no ambiente, este fato acaba por não ser completamente verdade, dado que estudos comprovam a multiplicação deste microrganismo no ambiente a quando da presença de nutrientes. A velocidade de replicação de EF no ambiente é função da temperatura, entre outros fatores. Temperaturas mais elevadas potenciam uma maior velocidade. Um decréscimo acentuado da temperatura vai provocar um decréscimo na taxa de multiplicação destes microrganismos no ambiente. Como a presença de um organismo acaba por ser a relação entre a morte e a multiplicação do mesmo, uma menor taxa de multiplicação tem um efeito direto no número final destes organismos. Outra explicação poderá ser a de a água do rio Tejo não apresentar turbidez e sem material em suspensão neste dia, encontrando-se limpa (Anexo H – Tabela 24), isto deverá ser tido em consideração para a explicação destes resultados. Com a diminuição de turbidez, a penetração de radiação U.V (grande causadora de morte nos microrganismos) nas águas é mais eficiente e aumentando, portanto a probabilidade de inativação destes microrganismos. Muitos contaminantes são transportados em sedimentos e, para, além disso, uma água turva indica que pode ter havido uma fonte de poluição. Embora tenham ocorrido essas variações nos microrganismos indicadores, estes foram detetados em todas as amostras colhidas neste ponto de acordo com o esperado.

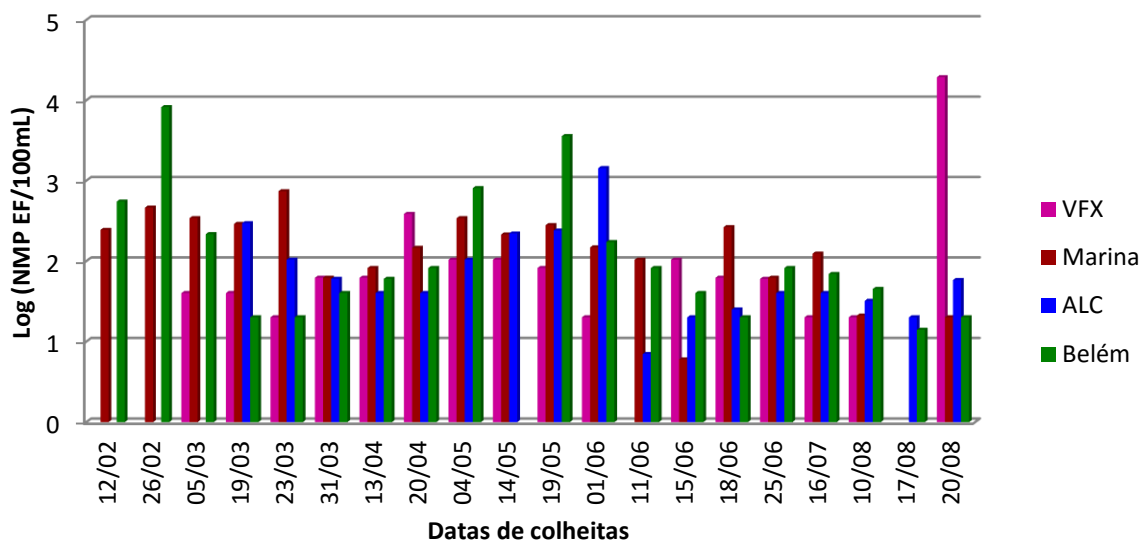


Figura 17) Concentração de EF nos diferentes pontos de colheira durante todo o período estudado

3.3.3 Colifagos somáticos

Os valores obtidos para CS durante o período de amostragem estão representados na Figura 18. De uma maneira geral, os valores de CS mantiveram-se relativamente constantes durante o período de amostragem. Da análise mais detalhada do gráfico da Figura 18 verifica-se que o período em que os números de CS apresentam maior decréscimo compreende os meses de férias. Nesta altura, como já foi referido, grande parte da população encontra-se fora da cidade de Lisboa, diminuindo os caudais de entrada de afluentes nas ETAR's e como consequência, os caudais de saída dos efluentes, influenciando os níveis deste microrganismo.

Percebe-se pelo gráfico que no dia 26/02 em Belém houve um aumento nas concentrações deste parâmetro, com um valor de 4,01 Log_{10} NMP/100 mL. Este fato poderá ser justificado da mesma forma que justificado anteriormente para *E. coli* e Enterococos. Também, no dia 20 de agosto verificou-se um aumento acentuado dos valores deste microrganismo para o ponto de colheita, VFX, chegando ao valor de 3,62 Log_{10} NMP/100 mL. Este dia correspondeu ao dia em que a água apresentava pior aspeto visual (presença de sólidos em suspensão e turbidez) (Anexo H – Tabela 24).

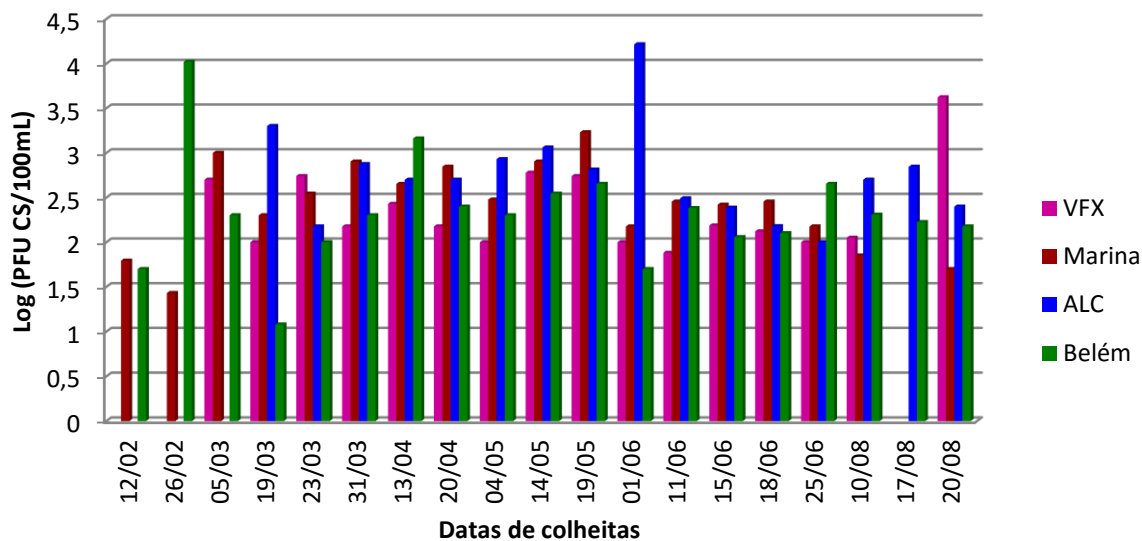


Figura 18) Concentração de Colifagos somáticos nos diferentes pontos de colheira durante todo o período estudado

3.3.4 Adenovirus

A Figura 19 apresenta as concentrações dos valores de HAdV encontradas nos pontos de colheitas durante a fase de recolha das amostras. Percebe-se pela análise do gráfico da Figura 19 que não houve muita variação nos valores durante o período de amostragem. Além disso, percebe-se que não houve muita discrepância nos valores obtidos nas diferentes estações do ano, já que os Adenovirus, ao contrário de outros vírus, não possuem sazonalidade, como por exemplo, os Enterovirus que possuem uma maior frequência no verão e no outono, e os Norovirus que tem uma maior predominância no inverno, portanto, os adenovirus costumam manter-se estáveis durante todo o ano (Jiang e Chu, 2004).

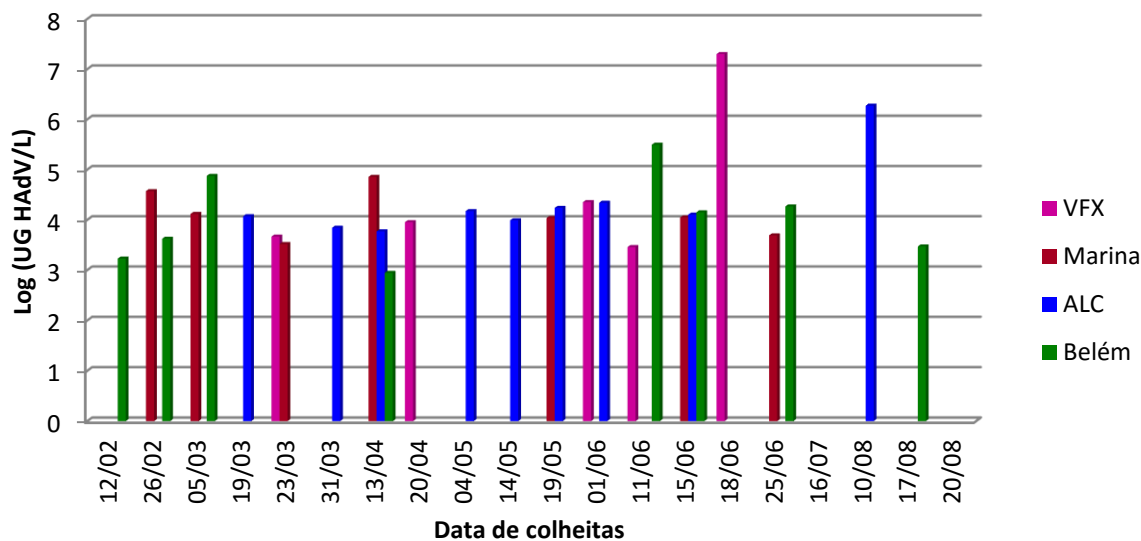


Figura 19) Concentração de Adenovirus humanos nos diferentes pontos de colheira durante todo o período estudado

Percebe-se pelo gráfico da Figura 19 que nos dias 18/06 e 10/8, em VFX e ALC respetivamente houve um aumento nas concentrações deste parâmetro, com um valor de 7,29 e de 6,27 Log₁₀ Ug/L. Este fato pode ser explicado por fatores externos a este estudo como picos infecciosos nas populações ou tratamento mais deficitário por parte da estação de tratamento de águas residuais.

3.3.5 DNA mitocondrial Humano

Os valores obtidos para mtDNA humano durante o período de amostragem estão representados na Figura 20. Percebe-se, de uma maneira geral, que os valores neste parâmetro mantiveram-se estáveis durante o período de colheitas das amostras. Verifica-se no gráfico da Figura 20 que no dia 26/02 e 19/03 em Belém houve um aumento nas concentrações deste marcador, com um valor de 11,9 e 12,17 Log₁₀ UG/L, respetivamente. Uma possível explicação para tal resultado é que as ETAR's têm caudais muito variáveis de acordo com a altura do dia. Este fato tem um impacto direto nos valores obtidos dos diferentes paramtros estudados. As descargas podem variar de acordo com o caudal de entrada, com o tratamento ativo no momento e com o maior ou menor índice de descargas não tratadas.

Verifica-se que o período em que os números de mtDNA humano apresentam maior decréscimo corresponde aos meses de férias. Nesta altura a população encontra-se fora da cidade de Lisboa, diminuindo os caudais de entrada de afluentes nas ETAR's e consequentemente, os caudais de saída dos efluentes, influenciando os níveis deste marcador.

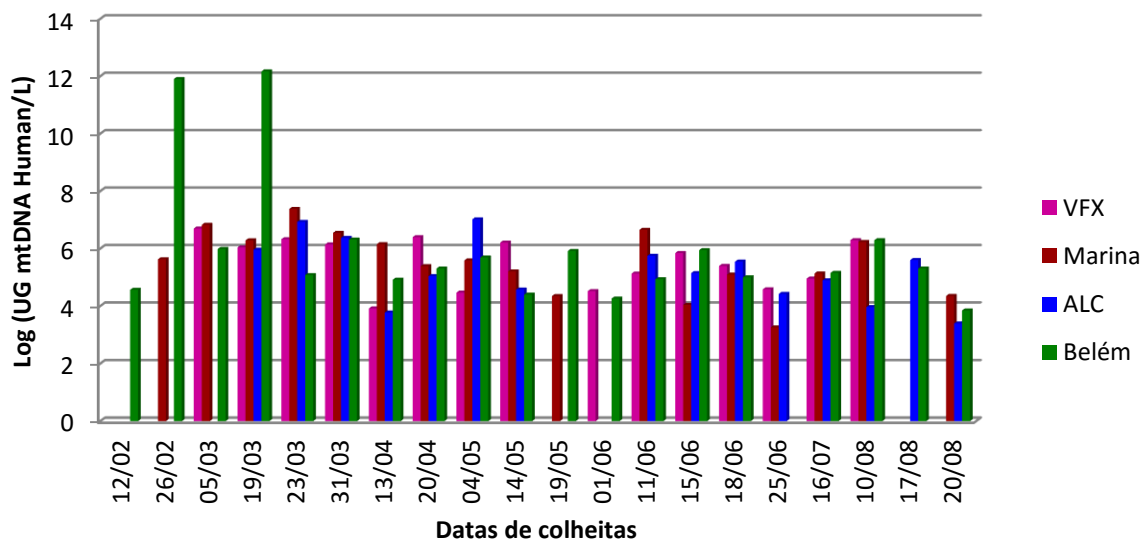


Figura 20) Concentração de DNA mitocondrial humano nos diferentes pontos de colheita durante todo o período estudado

3.3.6 DNA mitocondrial de Bovinos

Os valores obtidos para mtDNA bovino durante o período de amostragem estão representados na Figura 21. Este marcador foi o de maior prevalência comparativamente aos outros marcadores de mtDNA. Como demonstrado na Figura 11, Lisboa possui uma grande quantidade de locais de criação de gado bovino, mais do que dos outros animais analisados, portanto este resultado está dentro do que seria espetável. Verificam-se também pelo gráfico que os valores não sofreram grandes variações nas concentrações durante o período de amostragem.

As maiores prevalências deste parâmetro foram encontradas nos pontos de MPN e VFX, com 95% e 94% de positividade, respetivamente. Este resultado se deve pelo fato de que as ETAR's de Vila Franca de Xira, Alverca, Frielas, Beirolas e São João da Talha, que são as ETAR's que influenciam diretamente nesses pontos de colheitas, estão localizadas em zonas que abrangem uma grande quantidade explorações de gado bovino (Figura 11). Vale ressaltar que as águas do Rio Tejo próximas a esses locais de colheitas, maioritariamente MPN, também recebem influência dos descarregamentos realizados na margem sul, nomeadamente na zona de Alcochete e Montijo, que, como pode ser observado na Figura 11, também possuem uma grande quantidade de criação de animais, dentre estes, bovinos. Estas explorações poderão estar conectadas à rede de saneamento urbano, outras terão ETAR's próprias que lidam com os afluentes e muitas não se encontram sequer ligadas a qualquer sistema de tratamento de águas residuais pelo que descarregam os seus afluentes diretamente na bacia hidrográfica do Rio Tejo. Em VFX existem vários eventos que envolvem animais, como por exemplo, touradas, que contribui para o aumento deste marcador neste ponto.

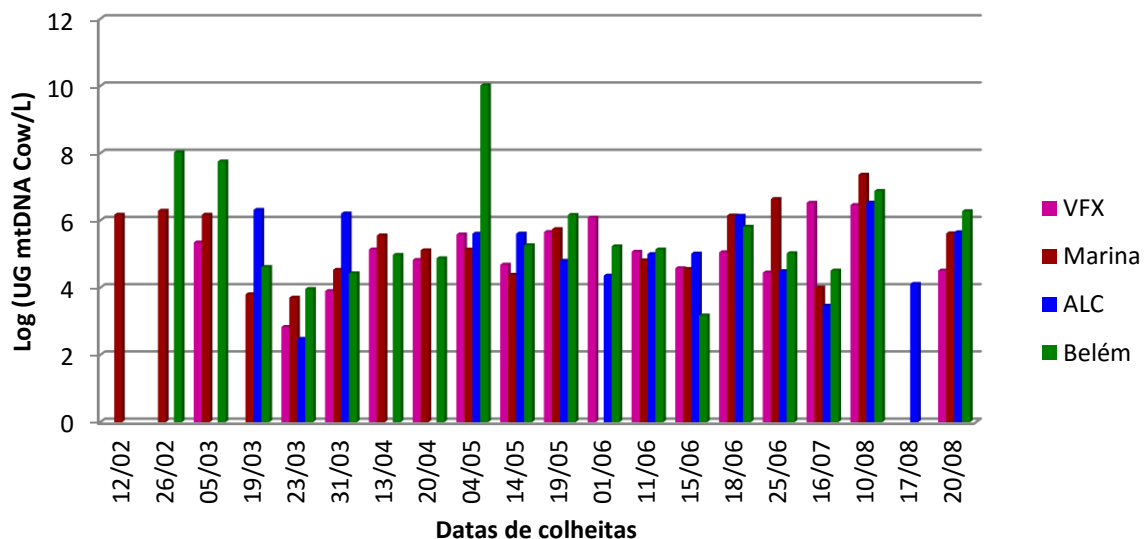


Figura 21) Concentração de DNA mitocondrial bovino nos diferentes pontos de colheita durante todo o período estudado

3.3.7 DNA mitocondrial de Suínos

Os valores obtidos para mtDNA suíno durante o período de amostragem estão representados na Figura 22. De uma maneira geral, Belém é o ponto em que as concentrações se encontram mais elevadas nos dias de positividade deste marcador, e este teve uma positividade de 60%. Sabe-se que a ETAR que deságua próximo aos locais de colheita de Belém abrange grande parte de Lisboa, e, como observado na Figura 11 existe vários criadores de porcos na zona que rodeia a ETAR de ALC. No dia 05/03 percebe-se um valor *outlier* no ponto de Belém, onde a concentração foi de 8,68 Log₁₀ UG/L. Uma possível explicação para tal resultado é que, como mencionado anteriormente, as ETAR's não possuem horários fixos para as descargas, podendo variar conforme o dia e até a hora da recolha. VFX e MPN apresentaram prevalências semelhantes, com 65 e 68% respetivamente. É de considerar que em VFX e Alverca existem diversas suiniculturas (Figura 11), que são abrangidos pelas ETAR's de Vila Franca de Xira e Alverca, que são as ETAR's de maior influência sobre o ponto de colheitas em VFX. A zona da MPN, devido à sua localização, recebe muita influência das águas do Rio Tejo proveniente da margem sul, onde existe uma grande quantidade de criação de porcos (Figura 11). Isto, associado aos horários incertos das descargas das ETAR's e as horas variáveis de colheitas das amostras pode justificar as diferenças nos níveis de concentração deste marcador molecular.

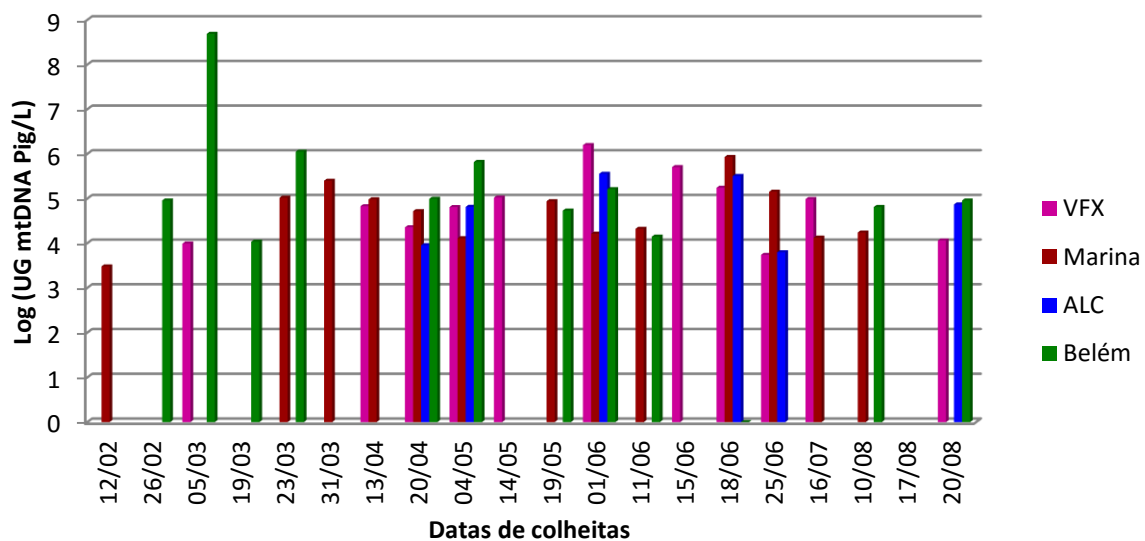


Figura 22) Concentração de DNA mitocondrial suíno nos diferentes pontos de colheita durante todo o período

3.3.8 DNA mitocondrial de Aves de consumo humano

A Figura 23 apresenta as concentrações dos valores de mtDNA de aves encontradas nos pontos de colheitas durante a fase de recolha das amostras. Este indicador foi o de menor prevalência comparativamente aos outros marcadores de mtDNA. Dado que em Portugal existe uma menor criação de aves do que dos outros animais analisados, este resultado é dentro do esperado. O valor máximo de concentração deste indicador foi no ponto MPN, com o valor de 9,10 Log UG/L no dia 26 de fevereiro. O ponto da MPN teve a maior prevalência e as maiores concentrações deste marcador de

todos os pontos de colheitas. Isto se deve pelo fato de que as zonas abrangidas pelas ETAR's de Frielas, Chelas, São João da Talha e Beirolas (Figura 9), que têm ligação próxima com este ponto de colheita, são as zonas em Lisboa que têm a maior concentração de criação de aves (Figura 11). Além disso, neste ponto de recolha é um local de convergência de patos selvagens que se possuem sequencias de DNA alvo para a deteção por este marcador. Pode-se perceber pela análise do gráfico que, no geral, os valores do parâmetro que mede a concentração de mtDNA de aves são constantes e sem grandes variações durante todo o período de amostragem. ALC, Belém e VFX foram os pontos de colheitas em que se encontrou menor prevalência deste marcador, sendo nos valores de 24, 30 e 35%, respetivamente. Estas percentagens estão dentro do esperado pelo fato de que as zonas abrangidas pela ETAR de Alcântara e ETAR de Vila Franca de Xira, são as que possuem uma menor quantidade de aviários (Figura 11).

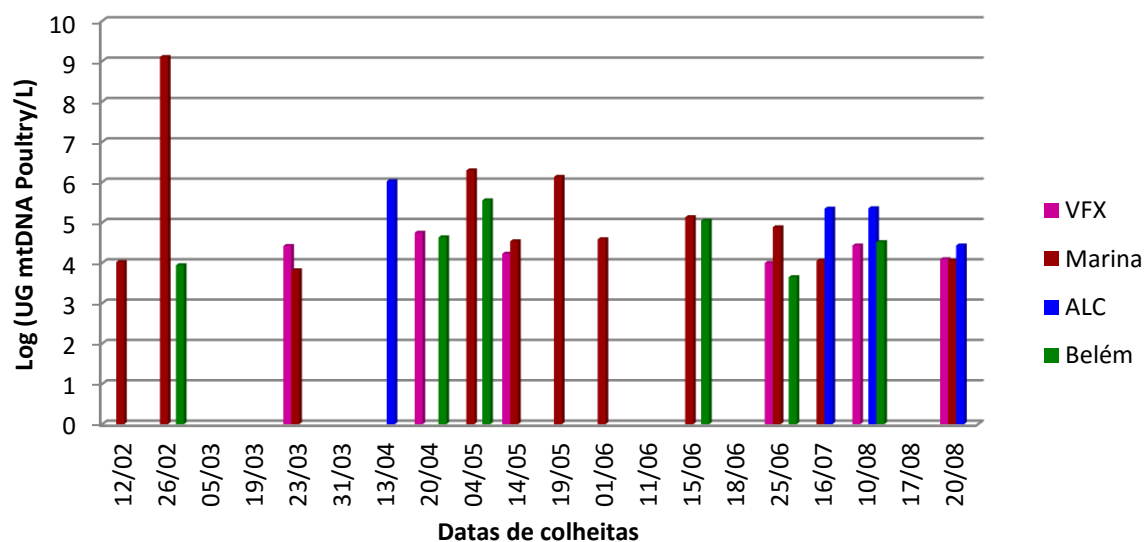


Figura 23) Concentração de DNA mitocondrial de aves nos diferentes pontos de colheita durante todo o período estudado

3.4 Correlações entre os indicadores microbiológicos clássicos e Colifagos somáticos

Nas Figuras 24, 25, 26 e 27 estão representadas as correlações entre os marcadores microbiológicos clássicos, *E. coli*, EF, e os CS. A melhor correlação em todos os pontos de colheita ocorre para os indicadores bacteriológicos clássicos, *E. coli* e EF (Figura 24 (A); Figura 25 (A); Figura 26 (A); Figura 27 (A)). As melhores correlações entre estes dois microrganismos ocorreram nos pontos de ALC, com $R^2= 0,62$ (Figura 27 (A)); Belém, com $R^2= 0,73$ (Figura 25 (A)) e VFX com $R^2=0,69$ (Figura 26 (A)). MPN foi o ponto em que a correlação foi menor, porém foi uma correlação significativa, com o $R^2=0,55$ (Figura 24 (A)).

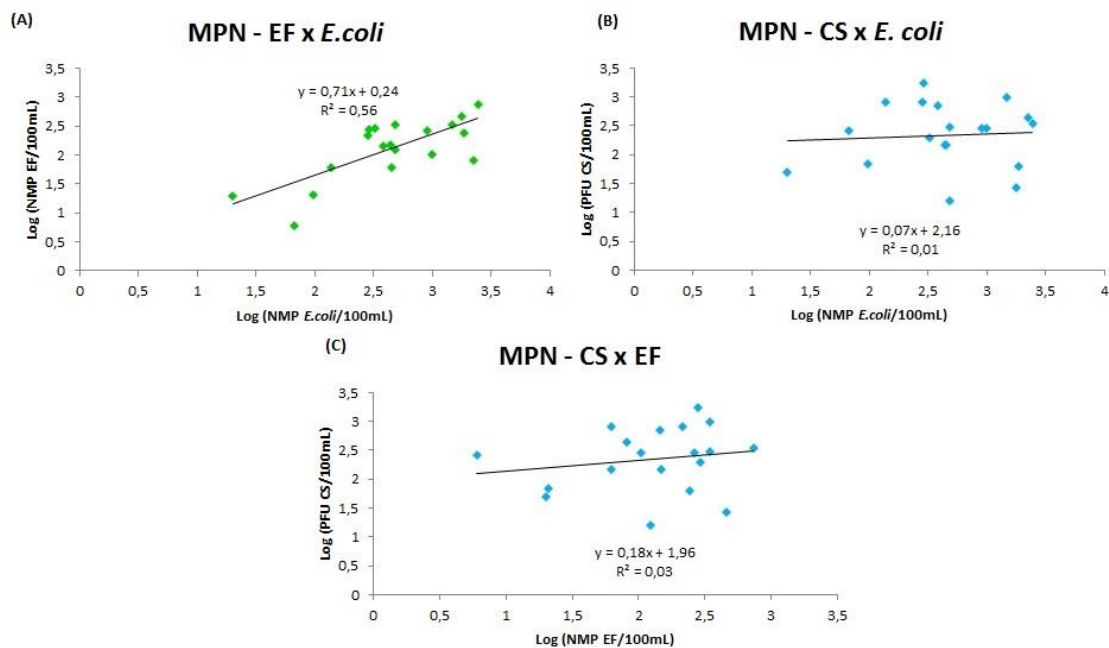


Figura 24 Correlação de (A) EF e *E. coli*, (B) CS e *E. coli* (C) CS e EF no ponto MPN

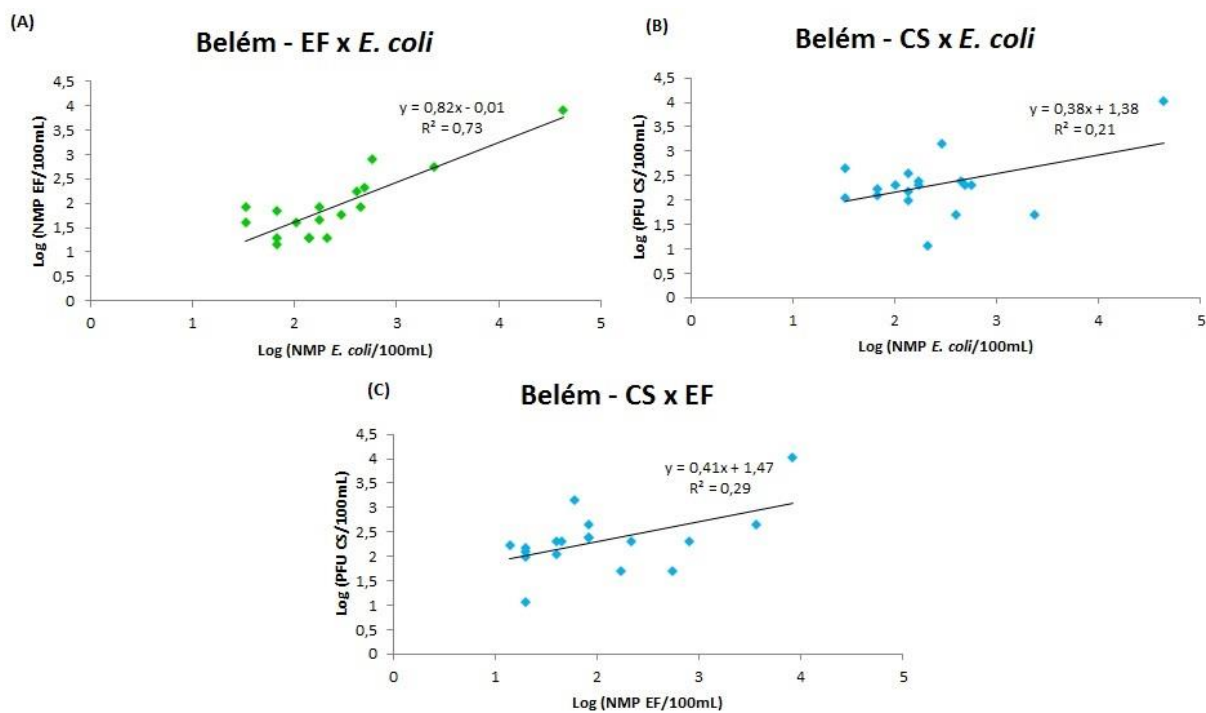


Figura 25 Correlação de (A) EF e *E. coli*, (B) CS e *E. coli* (C) CS e ES no ponto de Belém

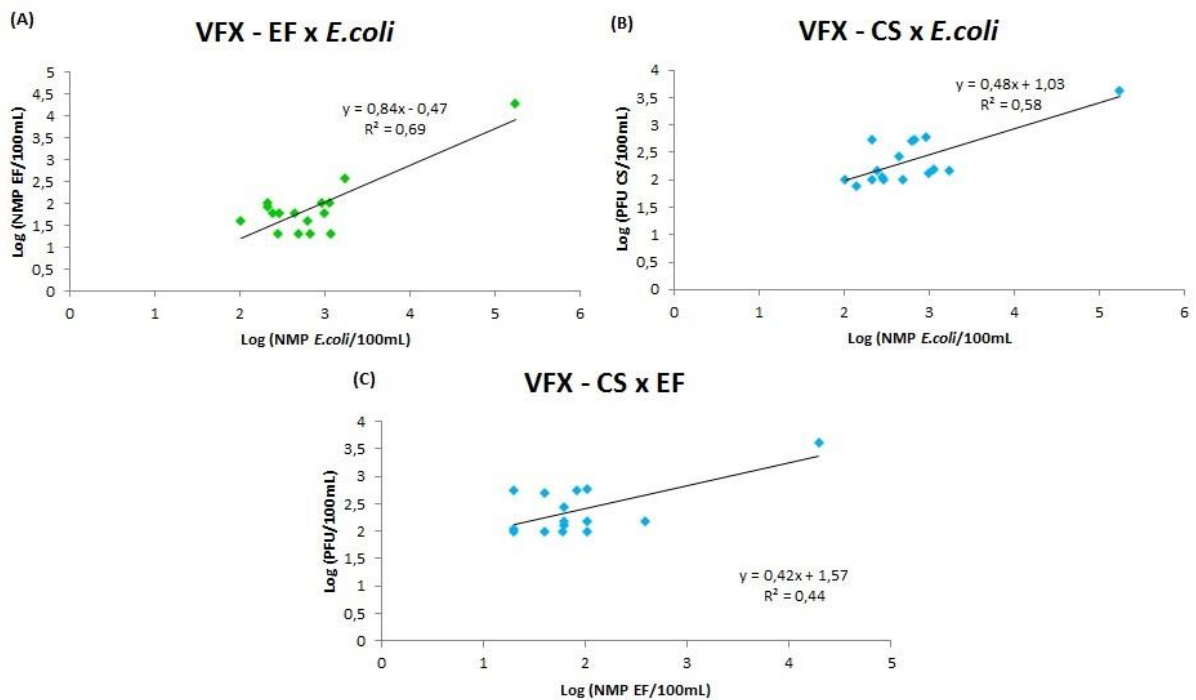


Figura 26) Correlação de (A) ES e *E. coli*, (B) CS e *E. coli* (C) CS e EF no ponto de VFX

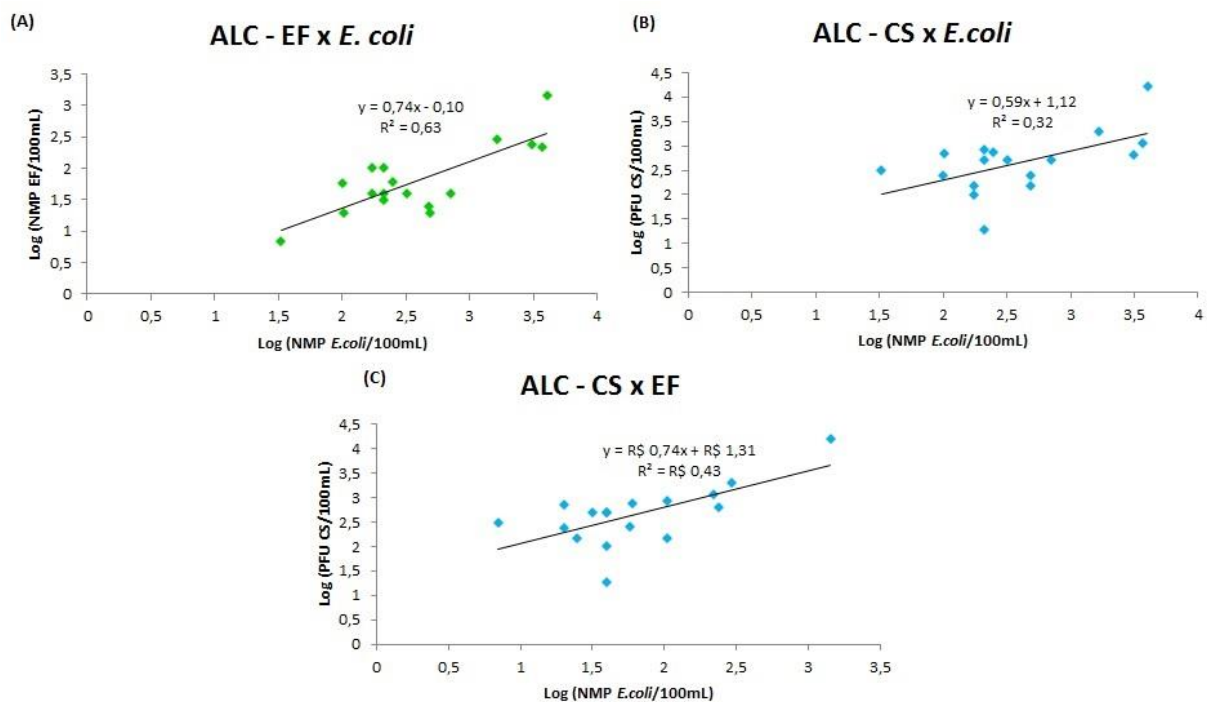


Figura 27) Correlação de (A) EF e *E. coli*, (B) CS e *E. coli* (C) CS e EF no ponto de ALC

As correlações entre *E. coli*/EF e os CS seguiram tendências diferentes para dois pares diferentes de pontos (VFX/ALC e MPN/Belém). Para o par VFX/ALC, as correlações entre os dois indicadores bacteriológicos e os CS foram relativamente boas, com correlações de 0,58 e 0,31 para *E. coli*/CS respectivamente em VFX e ALC e de 0,44 e 0,43 para EF/CS para VFX e ALC, respectivamente. Para o

par MPN/Belém, as correlações encontradas foram substancialmente mais fracas. Na MPN, a correlação entre *E. coli* e CS foi de $5,10 \times 10^{-3}$ e para Belém de 0,20. No caso dos EF e os CS, as correlações não foram tão fracas como as encontradas para *E. coli*, com valores de $3,10 \times 10^{-2}$ e 0,28. Correlações mais fracas poderão significar que os bacteriófagos fornecem indicações diferentes das fornecidas pelos indicadores bacteriológicos. Isto pode ser o resultado de diferenças no que se respeita a estabilidade dos diferentes microrganismos no ambiente. Dos gráficos da Figura 14 (B) e (C), observa-se também que para valores de indicadores bacteriológicos mais baixos, as concentrações de CS são mais altas. Diversos artigos publicados anteriormente descrevem situações semelhantes. Por exemplo, estudos efetuados em águas balneares britânicas, com diferentes níveis de contaminação por esgotos (O'Keefe e Green, 1989) e em águas balneares da costa Atlântica e Mediterrânica (Contreras-Coll *et al*, 2002). A maior resistência dos bacteriófagos aos tratamentos efetuados nas ETAR's bem como a stresses ambientais como radiação U.V e alterações de temperatura (Gironés *et al*, 1989; Chung e Sobsey, 1993; Hill e Sobsey, 1998; Sinton *et al*, 1999; Ibarluzea *et al*, 2007) poderá ajudar a justificar as diferenças na presença dos bacteriófagos e entre estes e os indicadores bacteriológicos estudados.

3.5 Correlações entre os indicadores microbiológicos e marcadores moleculares

Nas Figuras 28 a 39 estão representados os gráficos com as correlações dos indicadores microbiológicos *E. coli*, EFe e dos CS, com os diferentes marcadores moleculares realizados em todos os pontos durante todo o tempo de duração de amostragem neste estudo (HAdV, mtDNA humano, mtDNA bovino, mtDNA suíno, mtDNA de aves). De uma maneira geral, verificou-se que todas as correlações variavam de fracas a moderada.

Nas Figuras 28 a 39 (A) representando as correlações dos microrganismos *E. coli*, EF e CS com o marcador HAdV, todas as correlações foram muito baixas. Este resultado já era esperado, dado que vários estudos já relataram que os marcadores clássicos e CS não tem relação com a quantidade de vírus presente na água (Pina *et al.*, 1998; Jiang *et al.*, 2001).

Nas Figuras 28 a 39 (B), que correlacionam os valores de *E. coli* e mtDNA de humano em todos os pontos, é observado que as melhores correlações foram encontradas nos pontos MPN ($R^2=0,23$) e Belém ($R^2=0,22$). Ainda assim, estes valores de correlações são fracos, pelo que se pode concluir que a *E. coli* não possui correlação com mtDNA humano. Kapoor *et al.*, (2013) evidenciou resultados semelhantes tendo encontrado uma fraca correlação entre *E. coli* e mtDNA de humanos. Isto é explicado pelo fato de a *E. coli* poder ser encontrada em várias espécies de animais de sangue quente e os marcadores moleculares estudados serem específicos de uma determinada espécie.

Nas Figuras 28 a 39 (C) encontram-se as correlações entre os diferentes indicadores bacteriológicos e mtDNA bovino. As melhores correlações para o ponto de Belém foram obtidas exactamente entre estes microrganismos (*E. coli* (Figura 31 (C)), EF (Figura 32 (C)) e CS (Figura 33 (C)) e mtDNA de bovinos. Os valores de correlação entre os microrganismos e o mtDNA bovino encontram-se entre

0,11 (CS vs mtDNA bovino) e 0,37 (EF vs mtDNA bovino). O fato de a presença de EF poder indicar uma maior tendência para a existência de contaminação fecal por animais, ajuda a justificar que a correlação entre estes e o DNA mitocondrial bovino seja ligeiramente superior às restantes. No entanto, as três correlações são consideradas fracas.

Em ALC a melhor correlação foi obtida para o par *E. coli* e mtDNA de aves (Figura 37 (E)), com o $R^2= 0,99$. No entanto, como se pode observar no gráfico, poucos dias de amostragem foram positivos para este marcador, pelo que esta correlação poderá ser apenas um artifício, sendo necessários mais pontos para ter uma correlação signitivamente forte. A segunda melhor correlação neste ponto foi encontrada para EF e mtDNA de aves, no ponto de ALC, com um valor de 0,47 (Figura 38 (E)), sendo esta considerada uma correlação moderada. Para os restantes parâmetros, as correlações foram extremamente baixas, variando de $1,3 \times 10^{-3}$ a 0,245 para as correlações entre EF e mtDNA bovino e CS e mtDNA suíno, respectivamente.

Os valores obtidos para as diferentes correlações indicam que a informação fornecida pelos microrganismos bacteriológicos e CS é diferente das informações obtidas pelos indicadores moleculares.

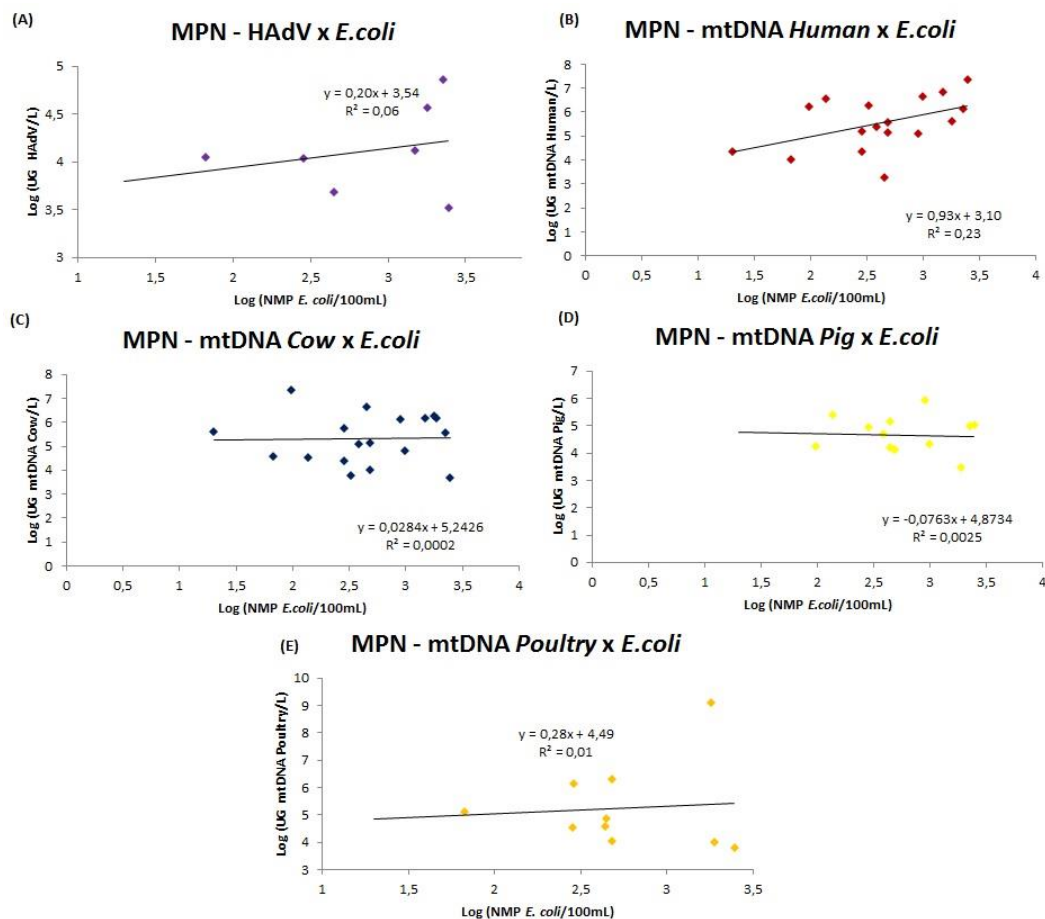


Figura 28) Correlação da bactéria *E. coli* com os marcadores moleculares (A) HAdV, (B) DNA mitocondrial de humano, (C) DNA mitocondrial de bovinos, (D) DNA mitocondrial de suínos e (E) DNA mitocondrial de aves do ponto de colheitas localizado na MPN

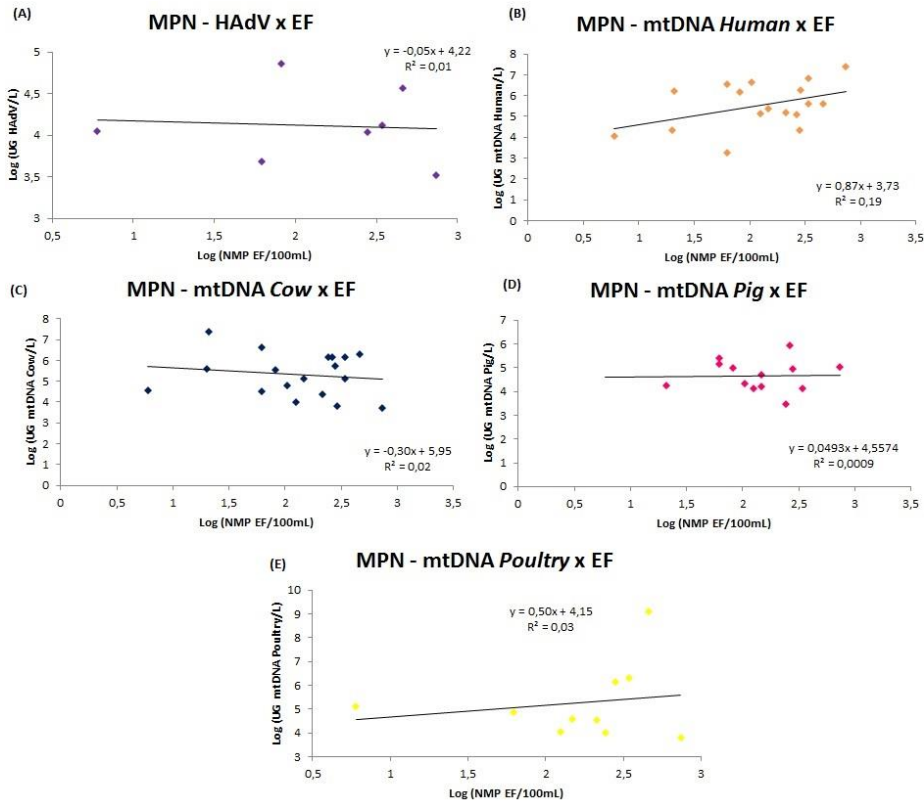


Figura 29 Correlação do marcador EF com os marcadores moleculares (A) HAdV, (B) DNA mitocondrial de humano, (C) DNA mitocondrial de bovinos, (D) DNA mitocondrial de suínos e (E) DNA mitocondrial de aves do ponto localizado na MPN

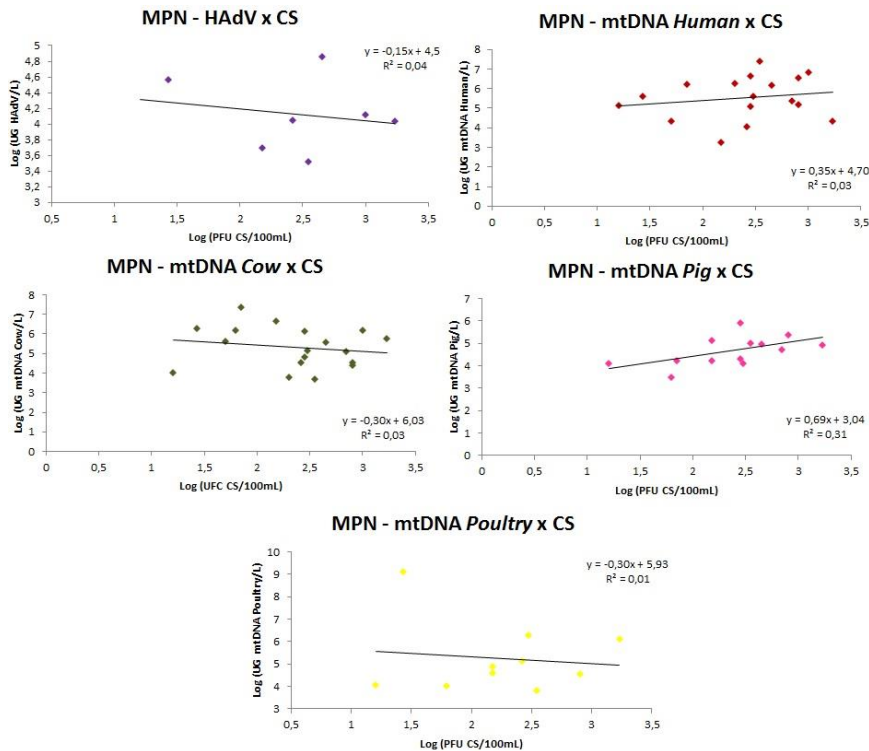


Figura 30 Correlação de CS com os marcadores moleculares (A) HAdV, (B) DNA mitocondrial de humano, (C) DNA mitocondrial de bovinos, (D) DNA mitocondrial de suínos e (E) DNA mitocondrial de aves do ponto localizado na MPN

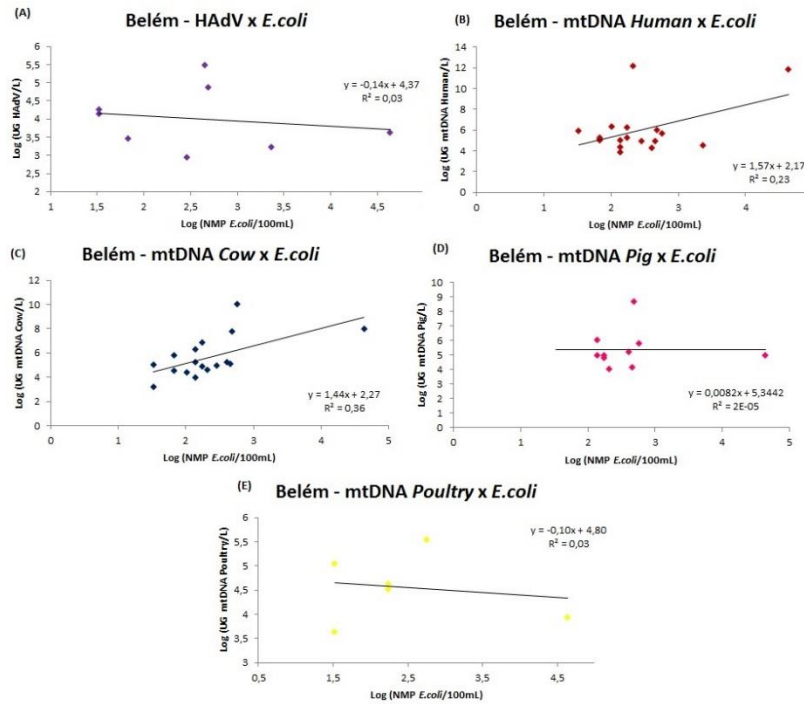


Figura 31 Correlação do marcador *E. coli* com os marcadores moleculares (A) HAdV, (B) DNA mitocondrial de humano, (C) DNA mitocondrial de bovinos, (D) DNA mitocondrial de suínos e (E) DNA mitocondrial de aves do ponto de Belém

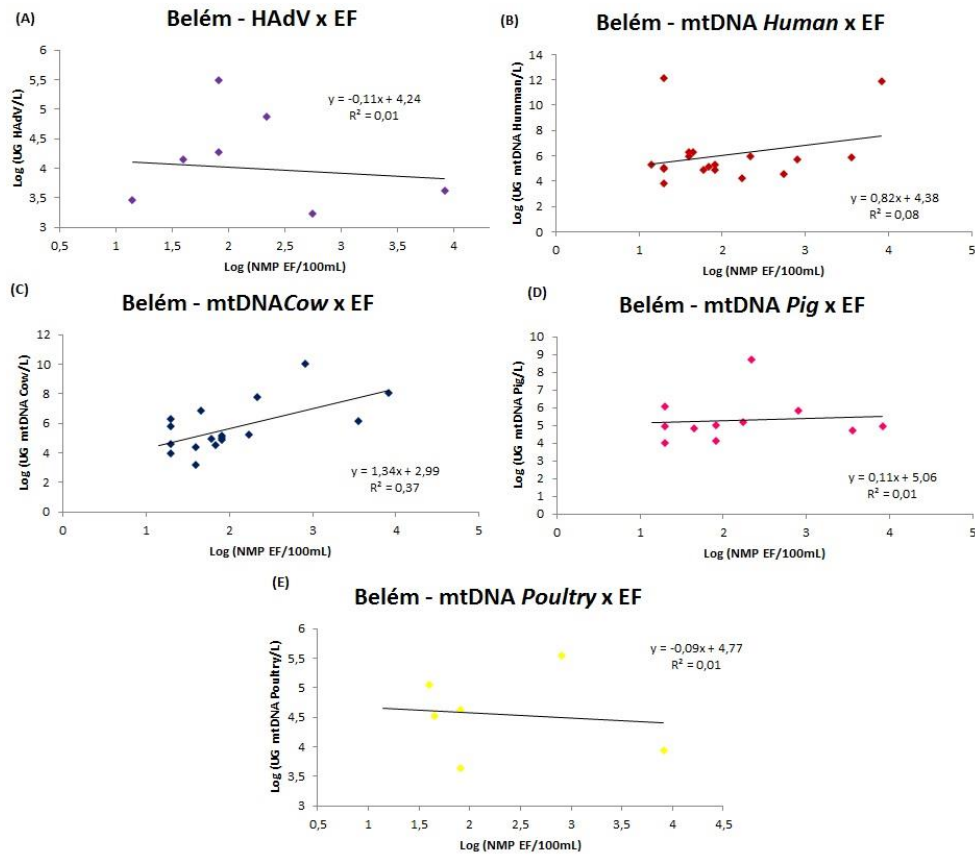


Figura 32 Correlação do marcador EF com os marcadores moleculares (A) HAdV, (B) DNA mitocondrial de humano, (C) DNA mitocondrial de bovinos, (D) DNA mitocondrial de suínos e (E) DNA mitocondrial de aves do ponto de Belém

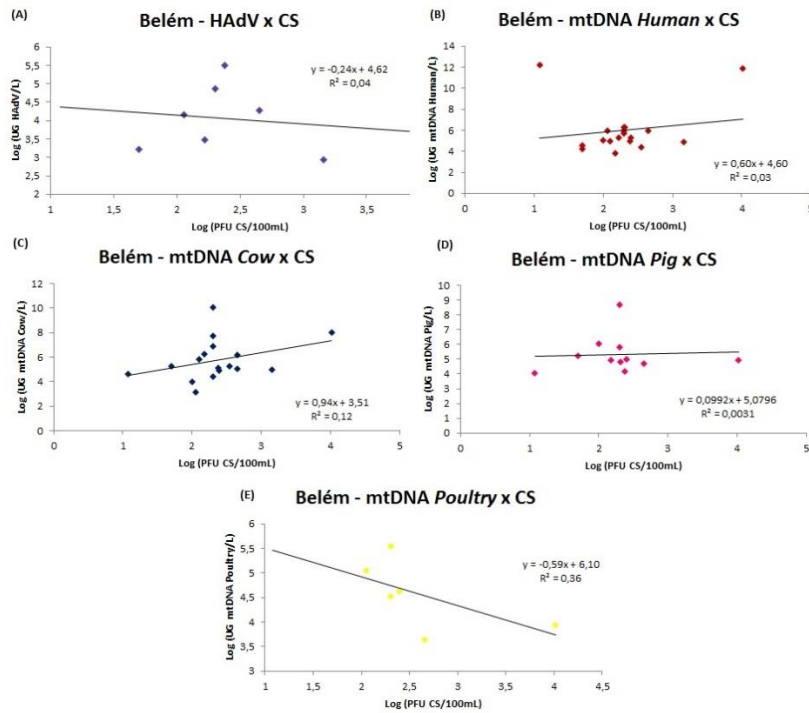


Figura 33 Correlação de CS com os marcadores moleculares (A) Adenovirus humano, (B) DNA mitocondrial de humano, (C) DNA mitocondrial de bovinos, (D) DNA mitocondrial de suínos e (E) DNA mitocondrial de aves do ponto localizado em Belém

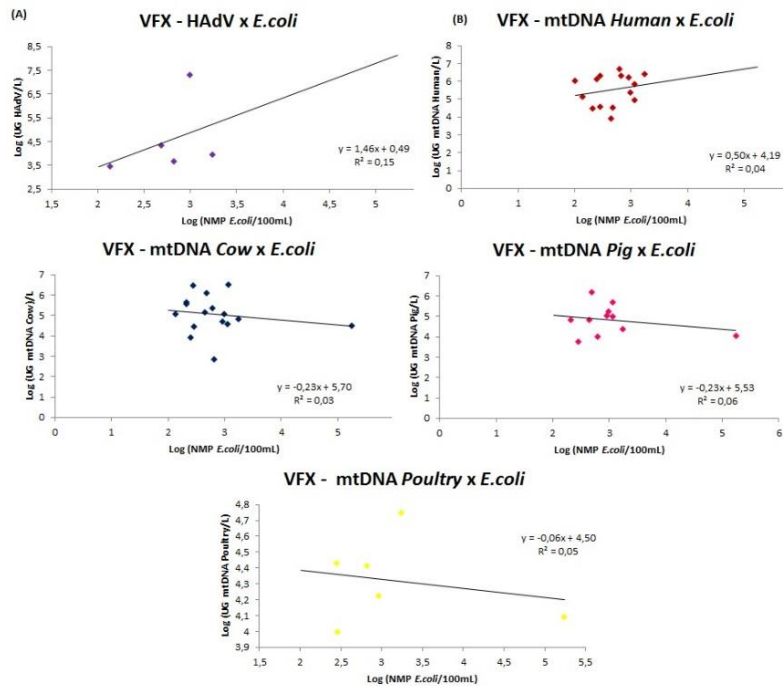


Figura 34 Correlação de *E. coli* com os marcadores moleculares (A) HAdV, (B) DNA mitocondrial de humano, (C) DNA mitocondrial de bovinos, (D) DNA mitocondrial de suínos e (E) DNA mitocondrial de aves do ponto localizado em VFX

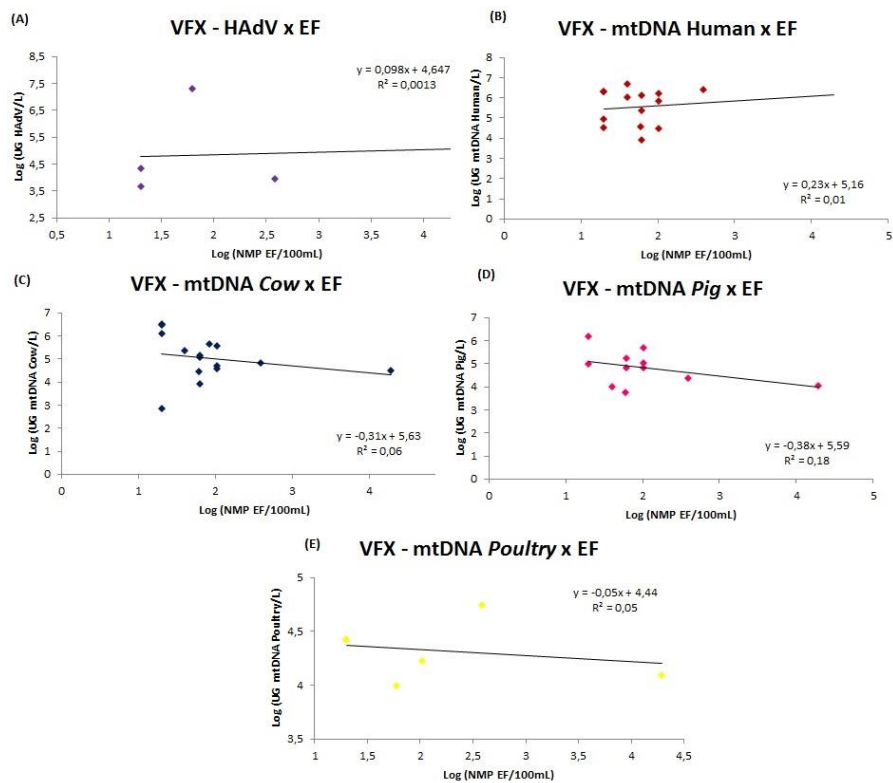


Figura 35) Correlação de EF com os marcadores moleculares (A) HAdV, (B) DNA mitocondrial de humano, (C) DNA mitocondrial de bovinos, (D) DNA mitocondrial de suínos e (E) DNA mitocondrial de aves do ponto localizado em VFX

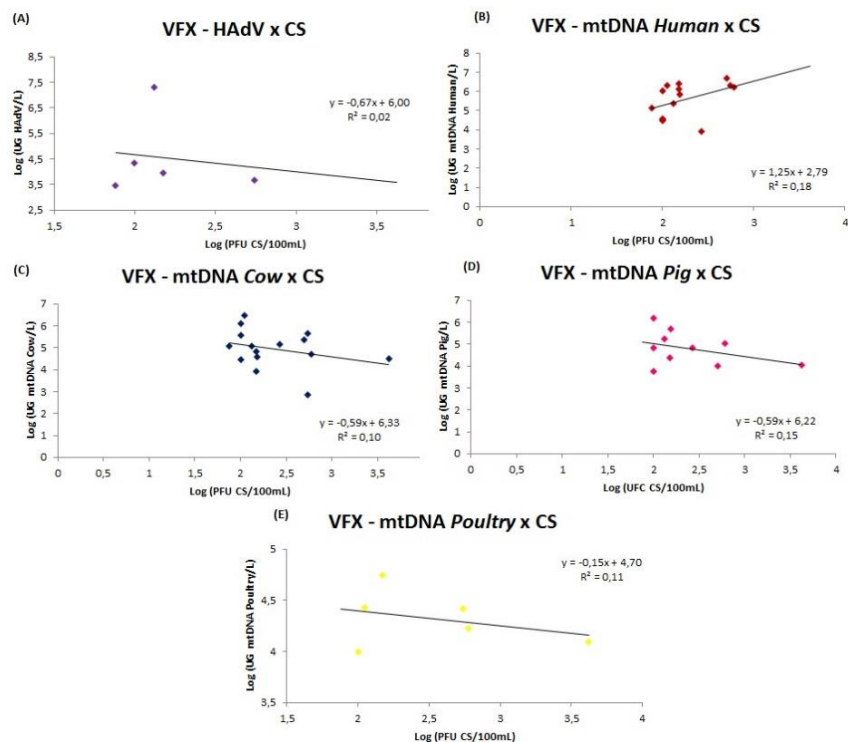


Figura 36) Correlação de CS com os marcadores moleculares (A) HAdV, (B) DNA mitocondrial de humano, (C) DNA mitocondrial de bovinos, (D) DNA mitocondrial de suínos e (E) DNA mitocondrial de aves do ponto localizado em VFX

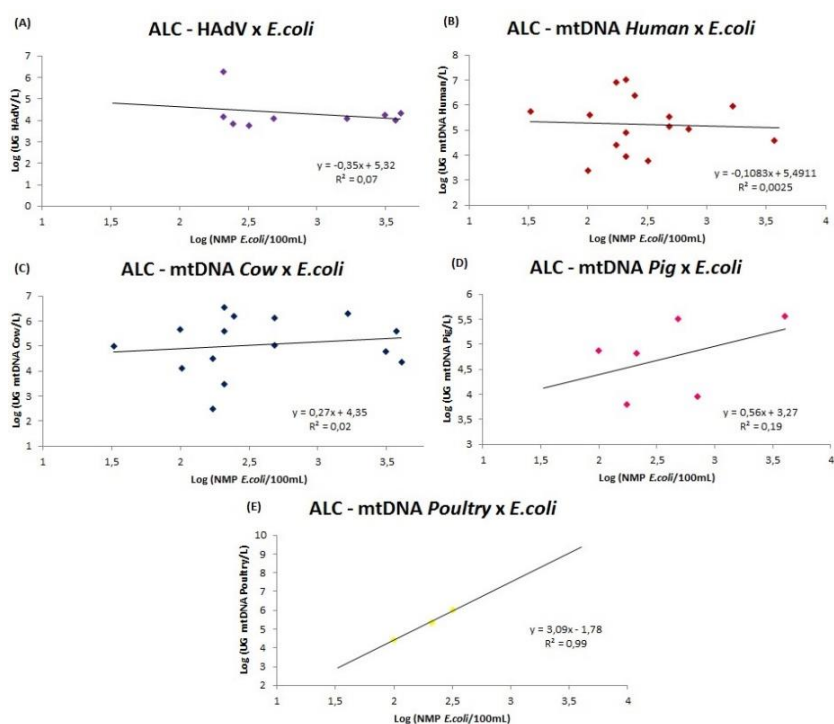


Figura 37) Correlação de *E. coli* com os marcadores moleculares (A) HAdV, (B) DNA mitocondrial de humano, (C) DNA mitocondrial de bovinos, (D) DNA mitocondrial de suínos e (E) DNA mitocondrial de aves do ponto localizado em ALC

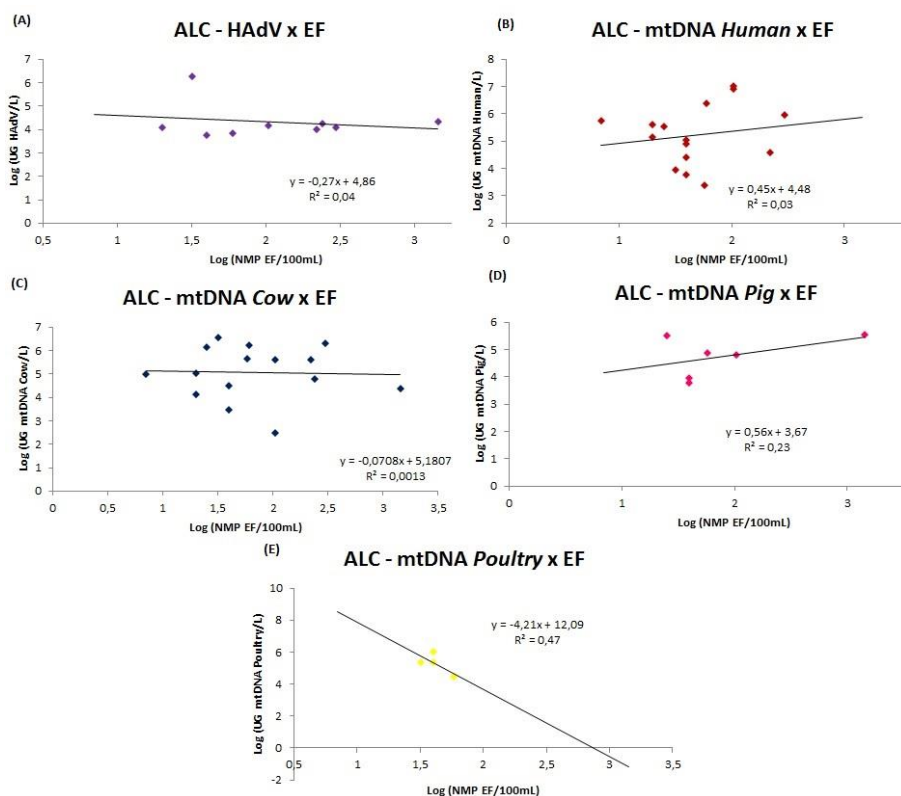


Figura 38) Correlação de EF com os marcadores moleculares (A) HAdV, (B) DNA mitocondrial de humano, (C) DNA mitocondrial de bovinos, (D) DNA mitocondrial de suínos e (E) DNA mitocondrial de aves do ponto localizado em ALC

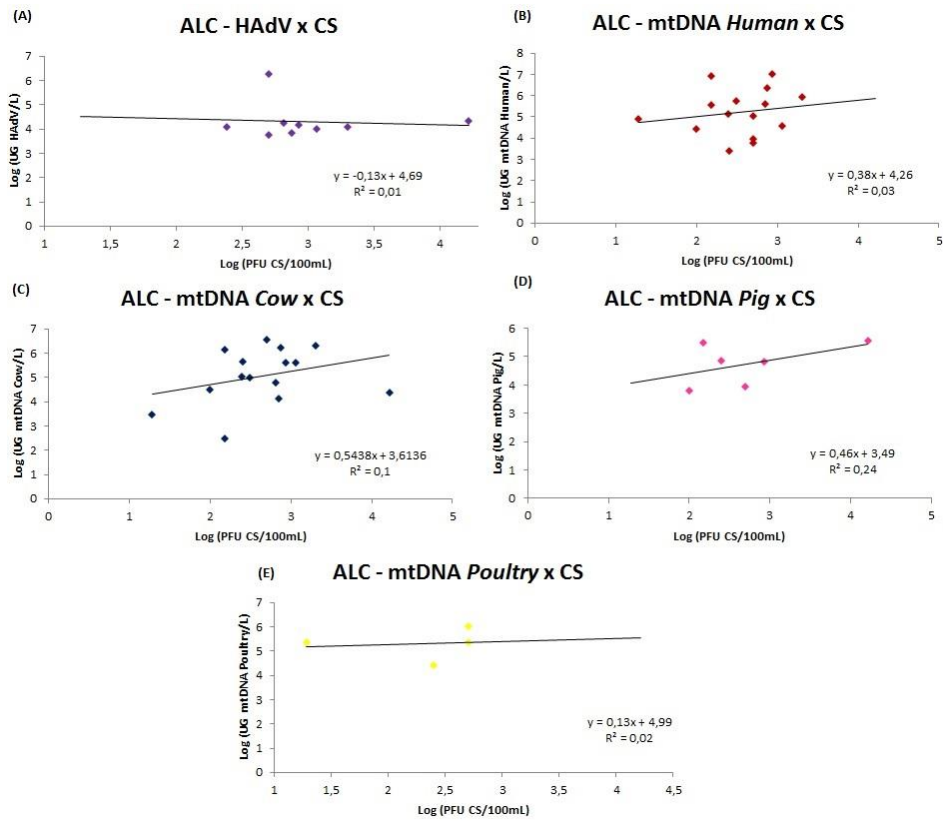


Figura 39) Correlação de EF com os marcadores moleculares (A) HAdV, (B) DNA mitocondrial de humano, (C) DNA mitocondrial de bovinos, (D) DNA mitocondrial de suínos e (E) DNA mitocondrial de aves do ponto localizado em ALC

4 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

A determinação das fontes de contaminação de um aquífero é de extrema relevância. É importante perceber se a contaminação encontrada através da deteção dos indicadores bacteriológicos é de origem antropogénica ou não, e sendo de origem animal, qual o responsável. O conhecimento deste tipo de dados permite a aplicação de medidas de remediação mais acertivas por forma a melhorar a qualidade da água diminuindo os riscos para a saúde pública.

Com este trabalho conclui-se que os indicadores microbiológicos clássicos, bem como os CS, são úteis e conseguem determinar um nível geral de contaminação fecal de um ambiente. De acordo com os resultados obtidos, será importante incluir os CS nos indicadores gerais de contaminação, dado que estes fornecem informações diferentes das fornecidas pelos indicadores bacteriológicos. No entanto, e tendo em conta os valores de correlação obtidos entre os indicadores clássicos e CS e os marcadores de contaminação fecal específicos verifica-se que os primeiros não podem ser utilizados para aferir o tipo de contaminação existente num aquífero. Contudo, os indicadores bacteriológicos e os CS não deverão ser menosprezados e deverão sempre ser incluídos nos estudos de MST porque nos dão informação qualitativa e quantitativa do estado do aquífero. Diversos estudos focavam-se apenas na utilização de um marcador específico para um determinado tipo de contaminação. No entanto, estes estudos não espelham a realidade dos aquíferos uma vez que geralmente existe mais que um tipo de *input* de contaminação. É necessário, portanto utilizar diferentes ferramentas nos estudos de MST, chamada de *Toolbox approach*. A utilização de marcadores mitocondriais obvia a procura de microrganismos que se encontram presentes na flora intestinal dos diferentes animais, dado que se pesquisa o animal em si. A deteção de DNA mitocondrial é bastante sensível e específica. O trabalho com DNA mitocondrial humano tem que ser efetuado de forma extremamente meticulosa e diversos controlos deverão ser incluídos de forma a garantir que os resultados obtidos se devem efectivamente a contaminação da própria amostra e não se deve a contaminação por manuseamento.

De uma maneira geral, os marcadores mitocondriais de humanos e bovinos são os que se encontram com maior número de positivities. Isto justifica-se pelo fato de as colheitas se realizarem em ambiente urbano, com as ETAR's a receberem esgotos humanos e a libertarem para o aquífero contaminação de origem humana e também pelo fato de existirem diversas explorações bovinas nas zonas limitrofes de Lisboa (VFX e a margem sul do rio Tejo). O DNA mitocondrial de suínos foi encontrado em cerca de 60% das amostras e o de aves em cerca de 40%. As positivities para estes marcadores são inferiores devido à existência de um número inferior de explorações relacionadas com estas origens. Os Adenovirus humanos foram encontrados em 40% das amostras testadas. O número baixo de amostras em que estes microrganismos foram encontrados pode ser justificado pelas dificuldades associadas aos métodos de concentração. De uma forma geral, os vírus encontram-se em números baixos no meio ambiente e é necessária a concentração de elevados volumes de água, muitas vezes volumes superiores a 100 L. No entanto, em águas de rio que apresentam muitas vezes elevada turbidez e sedimentos, a concentração de volumes tão elevados não é aconselhável devido à

concentração de substâncias que irão inibir as reações de PCR potenciando o aparecimento de falsos-negativos. A utilização de volumes mais baixos diminui a probabilidade de aparecimento destes falsos-negativos, mas diminui também a sensibilidade do método.

Todos os marcadores específicos encontravam-se de uma forma geral com valores bastante elevados, comprovando que o Rio Tejo se encontra altamente poluído. Certamente que grande parte desta contaminação se deve aos efluentes libertados pelas ETAR's, que embora cumpram com os valores da Legislação de descarga de efluentes deveriam utilizar tratamentos de desinfecção mais adequados antes das descargas para permitir a diminuição dos níveis de poluição fecal do rio. Contudo, as contaminações potenciadas pelas ETAR's são contaminações pontuais, em que se sabe qual a sua origem física. No entanto, existem ainda diversas descargas ilegais, consideradas como contaminações difusas pelo fato de não estarem legalizadas, e que são muito mais difíceis de encontrar e debelar. A utilização de marcadores genéticos como os utilizados neste estudo poderão ajudar a discriminar os locais físicos destas fontes de poluição difusa.

A distribuição de marcadores genéticos de hospedeiros específicos, incluindo humanos, não tem sido extensivamente investigada ainda, deixando um grande espaço para pesquisas futuras adicionais para identificar a fonte de contaminação de diferentes tipos de ambientes, maioritariamente aquáticos.

De notar que alguns dos valores verificados no estudo se encontram altamente dependentes das descargas pontuais por parte das ETARs. Estas descargas variam dependendo de diferentes fatores, tais como os caudais de entrada e a qualidade do afluente de entrada, do estado da população em termos alimentares e epidemiológicos bem como da passagem ou não de afluentes não tratados.

Os desafios que se colocam atualmente, nomeadamente as alterações climáticas e a escassez de recursos hídricos, obrigam a um controlo mais apertado da água disponível. Este controlo tem de ser efetuado não só a nível do tratamento das águas mas também ao nível da prevenção e remediação dos aquíferos e zonas envolventes. Esta mudança e melhoramento da qualidade deverá utilizar as melhores ferramentas disponíveis atualmente. Neste caso, para a determinação das origens da poluição deverá ser utilizada uma abordagem multiparamétrica para melhor um melhor conhecimento e melhoramento do meio ambiente.

5 BIBLIOGRAFIA

- Ackerman, D., Weisberg, S. B. 2003. Relationship between rainfall and beach bacterial concentrations on Santa Monica Bay Beaches. *J. Water Health* 1, 85-89.
- Ahmed, W., Goonetilleke, A., Powell, D., Chauhan, K. Gardner, T. 2010. Comparison of molecular markers to detect fresh sewage in environmental waters. *Water Res.* 43, 4908-4917.
- Alonso, J. L., Soriano, A., Carbajo, O., Amoros, I., Garelick, H. 1999. Comparison and recovery of *Escherichia coli* and thermotolerant coliforms in water with a chromogenic medium incubated at 41 and 44.5°C. *Applied and environmental microbiology.* v.65. n. 8. P. 3746-3749.
- Anderson, Y., and A. Stenström. 1987. Waterborne outbreaks in Sweden. Causes and etiology. *Water Sci. Technol.* 19:575-580.
- Ballester, N. A., Fontaine, J. H., and Margolin, A. B. 2005. Occurrence and correlations between coliphages and anthropogenic viruses in the Massachusetts Bay using enrichment and ICC-nPCR. *J. Water Health* 3:59-68.
- Belanche, L. A., Blanch, A. R. 2011. Statistical Approaches for modeling in microbial source tracking. *Microbial Source Tracking: Methods, Applications, and Case Studies* (Hagedorn, C., Blanch A. R., Harwood, V. J.). p. 207-250, Springer, USA.
- Bergh, O., Borsheim, K. Y., Bratbak, G., and Hedal, M. 1989. High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature* 340:467-468.
- Blanch, A. R., Caplin, J. L., Iversen, A., Kühn, I., Manero, A., Taylor, H. D., Vilanova, X. 2003. Comparison of enterococcal populations related to urban and hospital wastewater in various climatic and geographic European regions. *Journal of applied microbiology*, 94, 994-1002.
- Boehm, A. B., Sassoubre, L. M. 2014. Enterococci as indicators of environmental fecal contamination. *Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection.* Massachusetts Eye and Ear Infirmary.
- Bosch, A., Lucena, F., Diez, J. M., Gajardo, R., Blasi, M. and Jofre, J. 1991. Waterborne viruses associated with hepatitis outbreak. *Res. Technol. Manag.* 3:80-83.
- Bower, P. A., Scopel, C. O., Jensen, E. T., Depas, M. M., McLellan, S. L. 2005. Detection of genetic markers of fecal indicator bacteria in lake michigan and determination of their relationship to *Escherichia coli* densities using standart microbiological methods. *Appl. Environm. Microbiol.* V. 71, No. 12. p. 8305-8313.
- Burbano-Rosero, E. M., Ueda-Ito, M., Kisielius, J. J., Nagasse-Sugahara, T. K., Almeida, B. C., Souza, C. P., Markman, C., Martins, G. G., Albertini, L. and Rivera, I. N. G. 2011. Diversity of Somatic Coliphages in coastal regions with different levels of anthropogenic activity in São Paulo state, Brazil. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 77, No. 12. P. 4208-4216.

Caldwell, J. M., Levine, J. F. 2009. Domestic wastewater influent profiling using mitochondrial real-time PCR for source tracking animal contamination. *Journal of Microbiologia Methods*. 77. 17-22.

Caldwell, J., Payment, P., Villemur, R. 2011. Mitochondrial DNA as source tracking markers of fecal contamination. *Microbial Source Tracking: Methods, Applications, and Case Studies* (Hagedorn, C., Blanch A. R., Harwood, V. J.). pp 229-250, Springer, USA.

Center for Disease Control and Prevention. Versão 24 de Julho de 2015.
http://phil.cdc.gov/phil_images/20030203/6/PHIL_3084_lores.jpg

Centers for Disease Control and Prevention. Versão 24 de Julho de 2015.
http://www.cdc.gov/diagnosis/electron_microscopy.html

Chao, K. K., Chao, C. C., Chao, W. L. 2003. Suitability of the traditional microbial indicators and their enumerating methods in the assessment of fecal pollution of subtropical freshwater environments. *J Microbiol Immunol Infect*. 36: 288-293.

Chapron, C. D., Ballester, N. A., Fontaine, J. H., Frades, C. N., Margolin, A. B. 2000. Detection of Astroviruses, Enteroviruses and Adenovirus types 40 and 41 in surface waters collected and evaluated by the information collection rule and an integrated cell culture-nested PCR procedure. *Appl. Environm. Microbiol*. V. 66, No. 6. p. 2520-2525.

Chung, H., Sobsey, M. D. 1993. Comparative Survival of Indicator Viruses and Enteric Viruses in Seawater and Sediment. *Wat Sci Technolo*. 27: 425-428.

Contreras-Coll, N., Lucena, F., Mooijman, K., Havelaar, A., Pierzo, V., Boque, M., Gawler, A., Holler, C., Lambiri, M., Mirlo, G. 2002. Occurrence and levels of indicator bacteriophages in bathing waters throughout Europe. *Water Res*. 36, 4963-4974.

Cruz, J. R., Cáceres, P., Cano, F., Flores, J., Bartlett, A., Torún, B. 1990. Adenovirus type 40 and 41 and rotaviruses associated with diarrhea in children from Guatemala. *Journal of Clinical Microbiology*. V. 28, No. 8. p. 1780-1784.

Cunha, H. F. A., Lima, D. C. I., Brito, P. N. de F., Cunha, A. C. da., Silveira Junior, A. M. da., Brito, D. C. 2012. Qualidade físico-química e microbiológica de água mineral e padrões da legislação. *Ambi-Agua, Taubaté*. V. 7, No. 3, P. 155-165.

Cunha, M. A., Silva, M. R. 2006. Métodos de detecção de microrganismos indicadores. *Saúde & Ambiente em Revista, Duque de Caxias*, v.1. n.1. p.09-13.

Diston, D., Ebdon, J. E., Taylor, H. D. 2012. The effect of UV-C radiation (254 nm) on candidate microbial source tracking phages infecting a human-specific strain of *Bacteroides fragilis* (GB-124). *Journal of water and health*. 10.2. p 262-270.

Doñate, M. G. 2014. Identificación del origen de la contaminación fecal en aguas con *Bifidobacterium* spp. y/o *Bacteroides* spp. específicas de huéspedes. Universitat de Barcelona.

Ebdon, J. E., Sellwood, J., Shore, J., Taylor, H. D. 2012. Use of phages of *Bacteroides* (GB-124) as a novel tool for viral waterborne disease control? *Environmental Science and Technology*. 46(2):1163-9.

Ebdon, J., Muniesa, M. and Taylor, H., 2007. The application of a recently isolated strain of *Bacteroides* (GB-124) to identify human sources of faecal pollution in a temperate river catchment. *Water research*. 41, 3683-3690.

Eckner, K. F. 1998. Comparison of membrane filtration and multiple-tube fermentation by the colilert and enterolert methods for detection of waterborne coliform bacteria, *Escherichia coli*, and Enterococci used in drinking and bathing water quality monitoring in southern Sweden. *Appl. Environm. Microbiol.* p. 3079-3083.

Edberg, S. C., Rice, E. W., Karlin, R. J., Allen, M. J. 2000. *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. *J. Appl. Microbiol.* 88, 106S-116S.

Enders, J. F., Bell, J. A., Dingle, J. H., Francis, T. Jr. Hillerman, M. R. Huebner, R. J., Payne, A. M. 1956. Adenoviruses: group name proposed for new respiratory-tract viruses. *Science*. 124: 119-20.

Ferreira, A. P. 2003. Microbiological surveillance for water quality environmental evaluation. *Rev. Bras. Farm.*, 84(2): 61-63.

Fong, T. T., Griffin, D. W., Lipp, E. K. 2005. Molecular assays for targeting human and bovine enteric viruses in coastal waters and their application for library-independent source tracking. *App. Environm. Microbiol.* P. 2070-2078.

Franco, B. D. G. M. 2003. *Microbiologia dos alimentos*, 2ª edição. São Paulo: Editora Atheneu.

Future of Forensics. Versão 02 de Agosto de 2015. <http://rachelkan95.wix.com/future-of-forensics#!mitochondrial-dna/ch11>

Gantzer, C., Maul, A., Audic, J. M., and Schwartzbrod, L. 1998. Le Pecq, França. Detection of infectious enteroviruses, enterovirus genomes, somatic coliphages and *Bacteroides fragilis* phages in treated wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.* P. 4307-4312.

Gerba, C. P., Gramos, D. M., Nwachuku, N. 2002. Comparative inactivation of enteroviruses and adenovirus 2 by UV light. *Appl. Environm. Microbiol.* 68:5167-5169.

Giffin, D. W., Lipp, E. K., McLaughlin, M. R., Rose, J. B. 2001. Marine recreation and public health microbiology: quest for the ideal indicator. *BioScience* 51:817-825.

Gironés, R., Jofre, J., Bosch, A. 1989. Natural inactivation of enteric viruses in seawater. *J. Environ. Qual.* 18:34-39.

Google maps. Versão 20 de Setembro de 2015. <https://www.google.com/maps>

Gourmelon, M., Caprais, M. P., Ségura, R., Menec, C. L., Lozach, S., Piriou, J. Y., Rincé, A. 2007. Evaluation of two library-independent microbial source tracking methods to identify sources of fecal contamination in french estuaries. *Appl. Environm. Microbiol.* V. 73, No. 15 p. 4857-4866.

Grabow, W. O. K. 2001. Bacteriophages: update on application as models for viruses in water. *Water SA.* 27: 251- 268.

Greber, U. F., Soumalainen, M., Stidwill, R. P., Boucke, K., Ebersold, M. W., Helenius, A. 1997. The role of the nuclear pore complex in adenovirus DNA entry. *EMBO journal.* V. 16, No. 19. p. 5998-6007.

Guarner, F., Malagelada, J. R. 2003. Gut flora in health and disease. *The Lancet.* V. 361, No. 9356. p. 512-519.

Harwood, V. J., Boehm A. B., Sassoubre, L. M., Vijayavel, K., Stewart, J. R., Fong, T. T., Caprais, M. P., Converse, R. R., Diston, D., Ebdon, J., Fuhrman, J. A., Gourmelon, M., Gentry-Shields, J., Griffith, J. F., Kashian, D. R., Noble, R. T., Taylor, H., Wicki, M. 2013. Performance of viruses and bacteriophages for fecal source determination in a multi-laboratory, comparative study. *Water research.* 47, 6929-6943.

Hernroth, B. E., Conden-Hansson, A. C., Rehnstam-Holm, A. S., Gironés, R., Allard, A. K. 2002. Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in the blue mussel, *Mytilus edulis*: the first Scandinavian report. *Appl Environ Microbiol.* 68 (9): 4523-33.

Hijnen, W. A., Beerendonk, E. F., Medema, G. J. 2006. Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: a review. *Water Res* 40, 3-22.

Hill, V. R., Sobsey, M. D. 1998. Microbial indicator reductions in alternative treatments systems for swine wastewater. *Wat Sci Techol.* 38: 119-122.

Hundesa, A., Motes, C.M, Bofill-Mas, S., Albinana-Gimenez, N. and Girones, R., 2006. Identification of human and animal adenoviruses and polyomaviruses for determination of sources of fecal contamination in the enviroment. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 72, No. 12. P. 7886-7893.

Hunter, P. R., and Syed, Q. 2001. Community surveys of self-reported diarrhoea can dramatically overestimate the size of outbreaks of waterborne cryptosporidiosis. *Water science and technology.* 43 (12), 27-30.

Ibarluzea, J. M., Santa, M. L., Moreno, B., Serrano, E., Larburu, K., Maiztegi, M. J., Yarzabal, A. 2007. Somatic coliphages and bacterial indicators of bathing water quality in the beaches of Gipuzkoa, Spain. *J. Water Health.* 5 (3): 417-26.

INE. 2011. Recenseamento Geral da Agricultura 2009. Principais resultados. Instituto Nacional de Estatística (INE), Portugal.

Instituto Português do mar e da atmosfera. Versão 16 de Julho de 2015. <https://www.ipma.pt/>

International Committee on Taxonomy of Viruses. Adenoviruses. Versão 29 de Agosto de 2015. <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>

- Jiang, S. C., Chu, W. 2004. PCR detection of pathogenic viruses in southern California urban rivers. *J. Appl. Microbiol.* 97, 17-28.
- Jiang, S., Noble, R., Chu, W. 2001. Human adenoviruses and coliphages in urban runoff-impacted coastal waters of southern California. *Appl. Environm. Microbiol.* V. 67, No. 1. p. 179-184.
- Jofre, J., Durá, A. E., Muniesa, M., Méndez, X., Valero, F., Lucena, F. 2002. Removal and inactivation of indicator bacteriophages in freshwaters. *J. Appl. Microbiol.* 92, 338-347.
- Jofre, J., Stewart, J. R., Grabow, W. 2011. Phage Methods. *Microbial Source Tracking: Methods, Applications, and Case Studies* (Hagedorn, C., Blanch A. R., Harwood, V. J.). p. 137-156, Springer, USA.
- Jonczy, E., Klak, M., Miedzybrodzki, R., Gorski, A. 2011. The influence of external factors on bacteriophages- review. *Folia Microbiol.* 56:191-200.
- Kamra, A., Kessie, G., Chen, J. H., Kalavapudi, S., Shores, R., McElroy, I., Gireesh, T., Sudhakaran, P. R., Dutta, S. K., Nair, P. P. 2005. Exfoliated colonic epithelial cells: surrogate targets for evaluation of bioactive food components in cancer prevention. *Amer. Soc. Nutric.* 0022-3166.
- Kuhnert, P., Boerlin, P., Frey, J. 2000. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. *FEMS Microbiology Reviews* 24 (2000). 107-117.
- Lee, S. H., Levy, D. A., Craun, G. F., Beach, M. J., Calderon, R. L. 2002. Surveillance for waterborne-disease outbreaks-United States, 1999-2000. *MMWR Surveill Summ* 51 (8), 1-47.
- Lewin, B. 2009. *Genes IX*. 9ª edição. Artmed, Porto Alegre.
- Martellini, A., Payment, P., Villemur, R. 2005. Use of eukaryotic mitochondrial DNA to differentiate human, bovine, porcine and ovine sources in fecally contaminated surface water. *Water research.* 39 541-548.
- McMinn, B. R., Korajkic, A., and Ashbolt, N. J. 2014. Evaluation of *Bacteroides fragilis* GB-124 bacteriophages as novel human-associated faecal indicators in the United States. *Letters in Applied Microbiology.* 59, 115-121.
- McQuaic, S. M., Scott, T. M., Harwood V. J., Farrah, S. R., Lukasik, J. O. 2009. Quantification of human polyomaviruses JC Virus and BK Virus by TaqMan quantitative PCR and comparison to other water quality indicators in water and fecal samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 3379-3388.
- McQuaig, S. M., Noble, R. T. 2011. Viruses as tracers of fecal contamination. *Microbial Source Tracking: Methods, Applications, and Case Studies* (Hagedorn, C., Blanch A. R., Harwood, V. J.). p. 113-135, Springer, USA.
- Metcalf, T. G., Melnick, J. L., Estes, M. K. 1995. Environment virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology, a trip of 50 years. *Annu. Rev. Microbiol.* 49:461-487.

Money, E. S., Carter, G. P., Serre, M. L. 2009. Modern space/time geostatistics using river distances: data integration of turbidity and E. coli measurements to assess fecal contamination along the raritan river in New Jersey. 43 (10): 3736-3742.

National Institute of Allergy and Infectious Diseases. Versão 18 de Setembro de 2015. www3.niaid.nih.gov

Noble, R. T., Weisberg, S. B., Leecaster, M. K., McGee, C. D., Dorsey, J. H., Vainik, P. M., Orozco-Bon, V. 2003. Storm effects on regional beach water quality along southern California shoreline. J. Water Health 1, 23-31.

Novel, M., and G. Novel. 1976. Regulation of b-D-glucuronidase synthesis in Escherichia coli K-12: constitutive mutants specifically derepressed for uidA expression. J. Appl. Bacteriol. 127: 406–417.

O'Keefe, B., Green, J. 1989. Coliphages as indicators of fecal pollution at three recreational beaches on the firth and forth. Water Res. 23: 1027-1030.

Ogilvie, L. A., Caplin, J., Dedi, C., Diston, D., Cheek, E., Bowler, L., Taylor, H., Ebdon, J., Jones, B. V. 2012. Comparative (Meta)genomic analysis and ecological profiling of human gut-specific bacteriophage ϕ B-124-14. Plos ONE. V. 7, Issue. 4. e35053.

Paradella, T. C., Koga-Ito., Jorge, A. O. C. 2007. Enterococcus faecalis: considerações clínicas e microbiológicas. 1807-2577.

Payan, A., Ebdon, J., Taylor, H., Gantzer, C., Ottson, J., Papageorgiou, G.T., Blanch, A.R., Lucena, F., Jofre, J. and Muniesa, M., 2005. Method for isolation of Bacteroides bacteriophage hot strains suitable for tracking sources of fecal pollution in water. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 71, No. 9. P. 5659-5662.

Payan, A., Ebdon, J., Taylor, H., Gantzer C., Ottoson, J., Papageorgiou, G. T., Blanch, A., R., Lucena, F., Jofre, J., Muniesa, M. 2005. Method of isolation of Bacteroides Bacteriophage host strains suitable for Tracking Sources of Fecal pollution in water. Appl. Environm. Microbiol. V. 71, No.9. p. 5659-5662.

Payment, P., Waite, M., Dufour, A. 2003. Introducing parameters for the assessment of drinking water quality. Assessing microbial safety of drinking water: improving approaches and methods. Who drinking water quality series. PP. 47-77.

Pereira, J. L. S. 2005. Manipulação de efluentes de bovinicultura: pré-tratamento e aplicação ao solo. Universidade Nova de Lisboa.

Pina, S. Puig, M., Lucena, F. Jofre, J., Girones, R. 1998. Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. V. 64, No. 9. p. 3376-3382.

Porto de Lisboa. 11 de Fevereiro de 2015. <http://www.portodelisboa.pt>

Puig, A., Queralt, N., Jofre, J., Araujo, R. 1999. Diversity of Bacterioides fragilis strains in their capacity to recover phages from human and animal wastes and from fecally polluted wastewater. Appl. Environm. Microbiol. V. 65, No. 4. p. 1772-1776.

- Puig, M., Jofre, J., Lucena, F., Allard, A., Wadell, G. & Girones, R. 1994. Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted waters by nested PCR amplification. *Appl. Environm. Microbiol.* 60, 2963-2970.
- Queralt, N., Jofre, J., Araujo, R., Muniesa, M. 2003. Homogeneity of the morphological groups of bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis* strain HSP40 and strain RYC2056. *Current Microbiology.* V. 46, p. 163-168.
- Samsygina, G. A., and E. G. Boni. 1984. Bacteriophages and phage therapy in pediatric practice. *Pediatrics* 4: 67–70.
- Savichteva, O. and Okabe, S., 2006. Alternative indicators of fecal pollution: Relations with pathogens and conventional indicators, current methodologies for direct pathogen monitoring and future application perspectives. *Water research.* 40, 2463-2476.
- Schill, W. B., Mathes, M. V. 2008. Real-time PCR detection and quantification of nine potential sources of fecal contamination by analysis of mitochondrial cytochrome b targets. *Environ Sci Technol.* 15; 42(14):5229-34.
- Scott, T. M., Rose, J. B., Jenkins, T. M., Farrah, S. R., Lukasik, J. 2002. Microbial source tracking: current methodology and future directions. *App. Environm. Microbiol.* p. 5796-5803.
- Sharp, R. 2001. Wiltshire, UK. Review Bacteriophages: biology and history. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 76, 667-672.
- Silva, J. S. 2008. Estudo da interação do adenovírus humano, sorotipo 41 (HadV-41), com células permissivas. Tese de doutoramento. Instituto de ciências biomédicas da Universidade de São Paulo, Brasil.
- Simpson, J.M., Domingo, J.W.S. and Reasoner, D.J., 2002. Microbial source tracking: state of the science. Vol. 36, No. 24.
- Stoeckel, D. M., Harwood, V. J. 2007. Performance, design, and analysis in microbial source tracking studies. *Appl. Environm. Microbiol.* p. 2405-2415.
- Sulakvelize, A., Alavidze, Z., and Morris, J. G. JR. 2001. Bacteriophage therapy. Tbilisi, Georgia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* Vol. 45, No. 3. P. 649-659.
- USEPA (United States Environment Protection Agency) Microbial Source Tracking Guide Document. Office of research and development. 2005.
- Van Helvoort, T. 1992. Bacteriological and physiological research styles in the early controversy on the nature of the bacteriophage phenomenon. *Med. Hist.* 3: 243–270.
- Yolken, R. H., Lawrence, R. N., Leister, F., Takiff, H. E., Strauss, S. E. 1982. Gastroenteritis associated with enteric type adenovirus in hospitalized infants. *J. Pediatr.* V. 101. p. 21-26.

6 ANEXOS

Anexo A – Preparação das soluções para concentraçã de Adenovírus

A. 1 – *Skimmed Milk*

Reagente	Quantidade
Leite em pó	10 g
Água destilada	1000 mL

Tabela 5) Reagentes e quantidades utilizados na preparação de SM

1. O leite em pó foi pesado e colocado em frasco schott, juntamente com a água destilada;
2. A solução foi agitada suavemente até ficar homogénia.

A. 2 - *Phosphate buffer*

Reagente	Quantidade
Na ₂ HPO ₄	2,68 g
NaH ₂ PO ₄	1,56 g
Água destilada	50 mL

Tabela 6) Reagentes e quantidades necessárias para a preparação da solução de Phosphate buffer

1. Os componentes foram pesados e misturados com a água;
2. Ficaram a agitar com agitador magnético até sua total dissolução.

Anexo B – Preparação dos meios de cultura para pesquisa de Coliformes somáticos e Bacteroides de *B. Fragilis*

B. 1 – Solução de Na₂CO₃ (<1 mol/l)

Reagente	Quantidade
Na ₂ CO ₃	10,6 g
Água destilada	100 mL

Tabela 7) Componentes e quantidades para preparação da solução de Na₂CO₃

1. O Na₂CO₃ foi dissolvido em água destilada;
2. Em seguida foi esterilizado com um filtro com 0,22 µm de tamanho;
3. A solução foi guardada em temperatura ambiente por menos de seis meses.

B. 2 – Solução de MgCl₂

Reagente	Quantidade
MgCl ₂ .6H ₂ O	100 g
Água destilada	50 mL

Tabela 8) Reagentes e quantidades para a preparação da solução de MgCl₂

1. O MgCl₂ foi pesado e misturado com água destilada até dissolver;
2. A solução foi armazenada em temperatura ambiente por menos de seis meses.

B. 3 – Meio Modified Scholten's Broth (MSB)

Reagentes	Quantidade
Extrato de levedura	3 g
Extrato de carne	12 g
Peptona	10 g
NaCl	3 g
Solução de Na ₂ CO ₃ (150 g/L)	5 mL
Solução de MgCl ₂	0,3 mL
Água destilada	1000 mL

Tabela 9) Reagentes e quantidades utilizadas na preparação do meio MSB para Colifagos somáticos

1. Os reagentes foram pesados e misturados, e em seguida dissolvidos em água destilada;
2. O meio foi esterilizado em autoclave durante 15 min a 121°C;
3. O meio foi guardado a (5± 3) °C por menos de seis meses;
4. Antes da utilização do meio, o mesmo teve o pH ajustado a 7,2 ± 0,5.

B. 4 – Meio Modified Scholten's Agar (MSA)

B. 4. 1 – Meio basal

Reagentes	Quantidade
Extrato de levedura	3 g
Extrato de carne	12 g
Peptona	10 g
NaCl	3 g
Solução de Na ₂ CO ₃ (150 g/L)	5 mL
Solução de MgCl ₂	0,3 mL
Ágar	20 g
Água destilada	1000 mL

Tabela 10) Reagentes e quantidades utilizadas na preparação do meio MSA basal para Colifagos somáticos

1. Os reagentes foram pesados e misturados, e em seguida dissolvidos em água destilada;

2. O meio foi esterilizado em autoclave durante 15 min a 121°C;
3. O pH foi ajustado a $7,2 \pm 0,5$.

B. 4. 2 – Solução de CaCl₂ (M = 1 mol/L)

Reagente	Quantidade
CaCl ₂ .2H ₂ O	14,6 g
Água destilada	1000 mL

Tabela 11) Reagentes e quantidades utilizadas para preparação de Cloreto de cálcio

1. O cloreto de cálcio foi dissolvido em água;
2. Em seguida foi esterilizado com um filtro com 0,22 µm de tamanho;
3. A solução foi guardada no escuro a $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ por menos de seis meses;

B. 4. 3 – Meio completo

Reagente	Quantidade
Solução de CaCl ₂	6 mL
Meio basal	1000 mL

Tabela 12) Reagentes e quantidades necessários para completar o meio de cultura MSA, para Colifagos somáticos

1. Após autoclavar o meio MSA basal, foi adicionada a solução de CaCl₂ estéril;
2. O meio foi agitado e despejado em placas de petri;
3. Após sua solidificação, as placas com o meio foram guardadas no escuro a $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ por até seis meses.

B. 5 – Modified Scholten's Agar semi-sólido (MSAss)

1. O meio basal foi preparado igual ao anexo B.4, porém com metade da quantidade de agar (10 g).

B. 6 – Bacteroides phage recovery medium broth (BPRMB)

Reagentes	Quantidade
Extrato de levedura	2 g
Peptona de carne	10 g
Peptona de caseína	10 g
NaCl	5 g
L – cisteína Monohidratada	0,5 g
Glucose	1,8 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,12 g
Solução de CaCl ₂ (Tabela 11)	1 mL
Água destilada	1000 mL

Tabela 13) Quantidades e reagentes utilizados na preparação do meio BPRMB para bacteriófagos de *Bacteroides*

1. Os reagentes foram pesados e misturados em Schott de 1000 mL;
2. O schott foi autoclavado por 15 min à 121 °C.

B. 6. 1 – Solução de NaOH (1 mol/l)

Reagente	Quantidade
NaOH	40 g
Água destilada	1000 mL

Tabela 14) Reagentes e quantidades necessários para a preparação de NaOH 1M

1. O NaOH foi pesado e misturado com a água até dissolver completamente;
2. Em seguida foi guardado em temperatura ambiente.

B. 6. 2 – Solução de Hemina

Reagente	Quantidade
Hemina	0,1 g
Solução de NaOH (1 mol/l)	0,5 mL
Água destilada	99,5 mL

Tabela 15) Reagentes e quantidades utilizadas para a preparação da solução de hemina

1. Os reagentes foram misturados em schott com a água destilada até sua dissolução;
2. A mistura foi guardada no escuro por até seis meses.

B. 6. 3 – Meio completo

Reagente	Quantidade
Solução de Hemina	10 mL
Meio basal	1000 mL
Solução de Na ₂ CO ₃	25 mL

Tabela 16) Quantidades e reagentes utilizados para completar o meio de cultura após esterilização por autoclave

1. Após autoclavar o meio basal, a solução de Na₂CO₃ e a solução de Hemina foram esterelizadas por filtro com 0,22 µm de tamanho;
2. O pH foi ajustado a 6,8 ± 0,5 por HCl (37%);
3. O meio foi guardado em frigorífico (ver temperatura) e utilizado em até seis meses.

B. 7 – Bacteroides phage recovery medium agar (BPRMA)

Reagentes	Quantidade
Extrato de levedura	2 g
Peptona de carne	10 g
Peptona de caseína	10 g
NaCl	5 g
L – cisteína Monohidratada	0,5 g
Glucose	1,8 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,12 g
Solução de CaCl ₂ (Tabela 11)	1 mL
Ágar	12 g a 20 g
Água destilada	1000 mL

Tabela 17) Compostos e quantidades utilizados para a preparação do meio BPRMA, para bacteriófagos de *Bacteroides*

1. Os ingredientes foram dissolvidos em água e adicionada a solução de CaCl₂;
2. A mistura foi autoclavada à 121°C durante 15 min.

B. 7. 1 – Meio completo

Reagente	Quantidade
Solução de Hemina	10 mL
Meio basal	1000 mL
Solução de Na ₂ CO ₃	25 mL

Tabela 18) Reagentes e quantidades utilizados para completar o meio de cultura BPRMA, após autoclavado

1. Após autoclavar o meio basal, a solução de Na₂CO₃ e a solução de Hemina foram esterilizadas por filtro com 0,22 µm de tamanho;
2. O pH foi ajustado a 6,8 ± 0,5 por HCl (37%);
3. O meio foi distribuído em placas de Petri (aproximadamente 20 mL de meio por placa com 9 cm de diâmetro);
4. Foi aguardado o meio solidificar nas placas;
5. Em seguida as placas foram guardadas no escuro a (5 ± 3)°C por até um mês.

B. 8 – Bacteroides phage recovery medium agar semi-sólido (ssBPRMA)

1. Foi preparado o meio basal igual ao anexo B. 7, porém com metade da quantidade de agar (6 a 10 g).

Anexo C – Preparação dos inóculos para detecção e quantificação de Colifagos Somáticos e Bacteriófagos de *B. Fragilis*

C. 1 – Preparação de inóculo de *E. coli* para detecção de Colifagos somáticos

1. O vial com a cultura foi retirado do congelador a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e colocado à temperatura ambiente até descongelar;
2. Foi adicionado a um erlenmeyer (50 ± 5) mL de meio MSB (Anexo B ponto B.3);
3. Em seguida, foi inoculado 1 mL da cultura de *E. coli* no meio MSB;
4. O erlenmeyer foi coberto com um algodão para não haver contaminações;
5. Em seguida o erlenmeyer com a mistura foi incubado a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ num incubador com agitação suave até ter um bom crescimento;
6. Assim que a cultura obteve bom crescimento foi retirada do incubador e colocado a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ num frigorífico até sua utilização. A cultura tinha que ser utilizada no mesmo dia em que foi preparada.

C. 2 – Preparação de inóculo de GB 124 para detecção de Bacteriófagos de *B. Fragilis*

1. O vial com a cultura foi retirado do congelador $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e colocado à temperatura ambiente até descongelar;
2. Foi adicionado a um tubo de vidro de 50 mL, 30 mL de meio de cultura BPRMB (Anexo B ponto B.6);
3. Em seguida foi adicionado 1 mL da cultura de GB 124 no meio BPRMB;
4. Mais aproximadamente 19 mL de meio BPRMB foram adicionados ao tubo de vidro, com intenção de criar um ambiente anaeróbio;
5. O tubo foi incubado a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ O. N.;
6. Na manhã seguinte o processo foi repetido, adicionando 1 mL da cultura do dia anterior em novo tubo com meio BPRMB novo, e incubado a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$;
7. Foi esperado a cultura estar crescida o suficiente para utiliza-la no processo de detecção de bacteriófagos de *B. Fragilis*.

Anexo D – Preparação de soluções para concentração de indicadores microbiológicos na água

D. 1 – Solução de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Reagente	Quantidade
$\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	800 g
Água destilada	400 mL

Tabela 19) Reagentes e quantidades necessárias para preparação de uma solução 4,14 M de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

1. Os reagentes foram misturados e colocados em agitação até serem dissolvidos;
2. A mistura foi autoclavada a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos;
3. A solução foi utilizada em até seis meses guardada no escuro.

D. 2 – Eluente

Reagente	Quantidade
----------	------------

Tween 80	6 mL
Extrato de carne	2 g
NaCl	5,844 g
Água destilada	200 mL

Tabela 20) Quantidades e reagentes necessárias para a preparação do eluente na concentração de Colifagos somáticos

1. Os reagentes foram acrescentados num schott de 250 mL;
2. O frasco contendo os reagentes foi aquecido entre 50 e 55 °C;
3. A solução foi agitada por agitador magnético por 3 min;
4. Após os 3 minutos a solução repousava durante 2 min, até os reagentes todos solubilizarem;
5. Foi medido o pH que se encontrava por $6,5 \pm 0,1$ e ajustado para $9,0 \pm 0,1$, sendo utilizado NaOH 1M;
6. O frasco com a solução foi autoclavado a 121 °C durante 15 minutos;
7. Após a autoclave a solução foi agitada de forma a confirmar a turbidez;
8. Enquanto a temperatura diminuía, a solução ficou a agitar. A uma temperatura de 75 °C já se percebia um aclaramento da mesma;
9. De seguida era verificado se o Tween 80 estava dissolvido;
10. A solução ficou a esfriar a temperatura ambiente;
11. O pH foi medido novamente, devendo estar entre $9,0 \pm 0,1$. Se não estivesse, era ajustado novamente.
12. Em caso de precipitação do Tween 80, a solução era colocada em agitação novamente a 55 °C.

Anexo E – Quantificação dos microrganismos indicadores

E.1 – Interpretação dos resultados

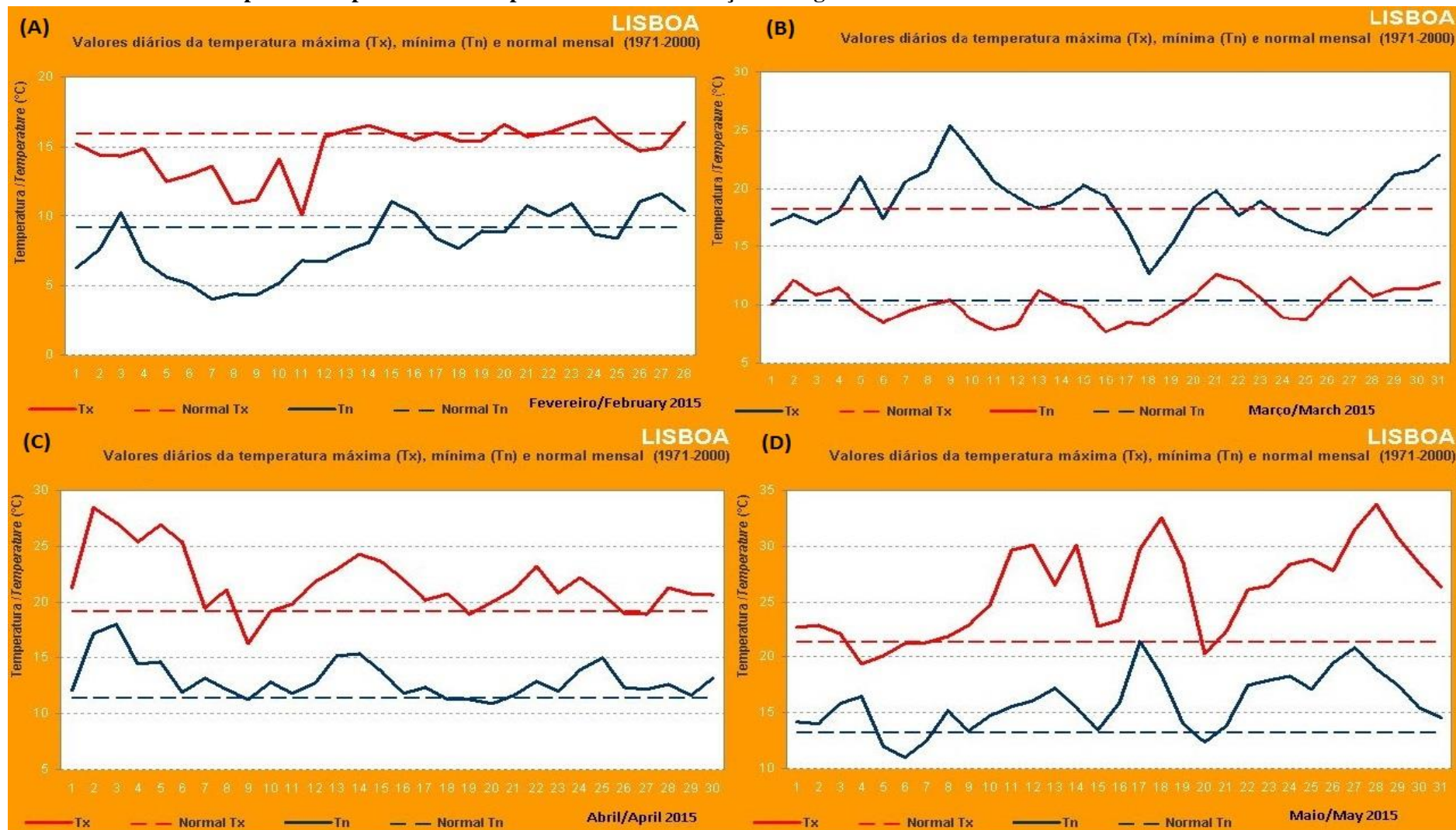
Aspecto	Interpretação do resultado
Tão amarelo e fluorescente ou mais que o comparador	Positivo para <i>E.coli</i>
Menos amarelo que o comparador	Negativo para <i>E.coli</i>

Tabela 21) Interpretação dos resultados obtidos a partir de Enterolert

Aspecto	Interpretação do resultado
Fluorescência azul	Positivo para Enterococos Fecais
Sem fluorescência	Negativo para Enterococos Fecais

Tabela 22) Interpretação dos resultados obtidos a partir de Colilert-18

Anexo F – Dados de temperatura e pluviosidade no período de monitorização das águas



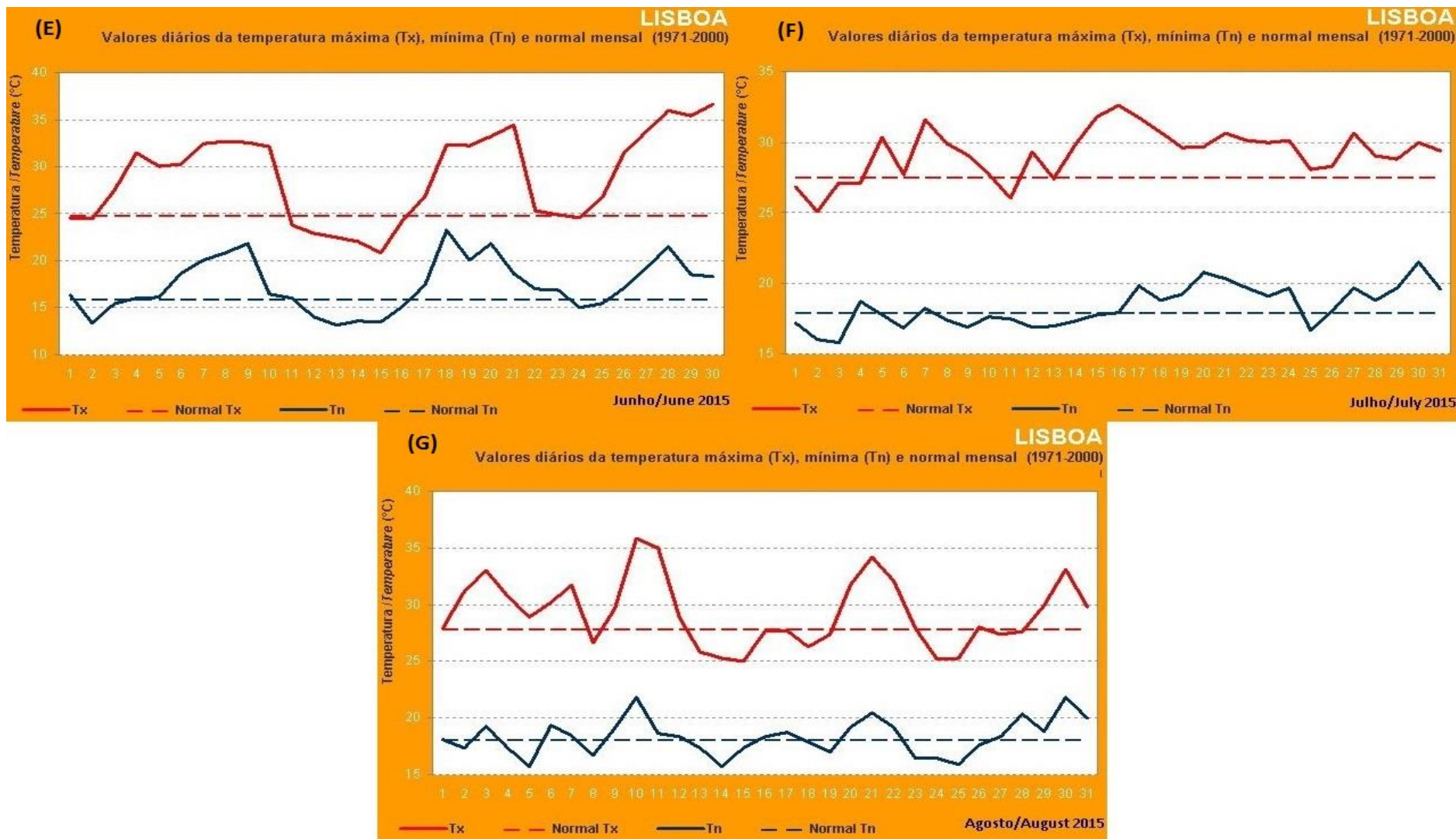
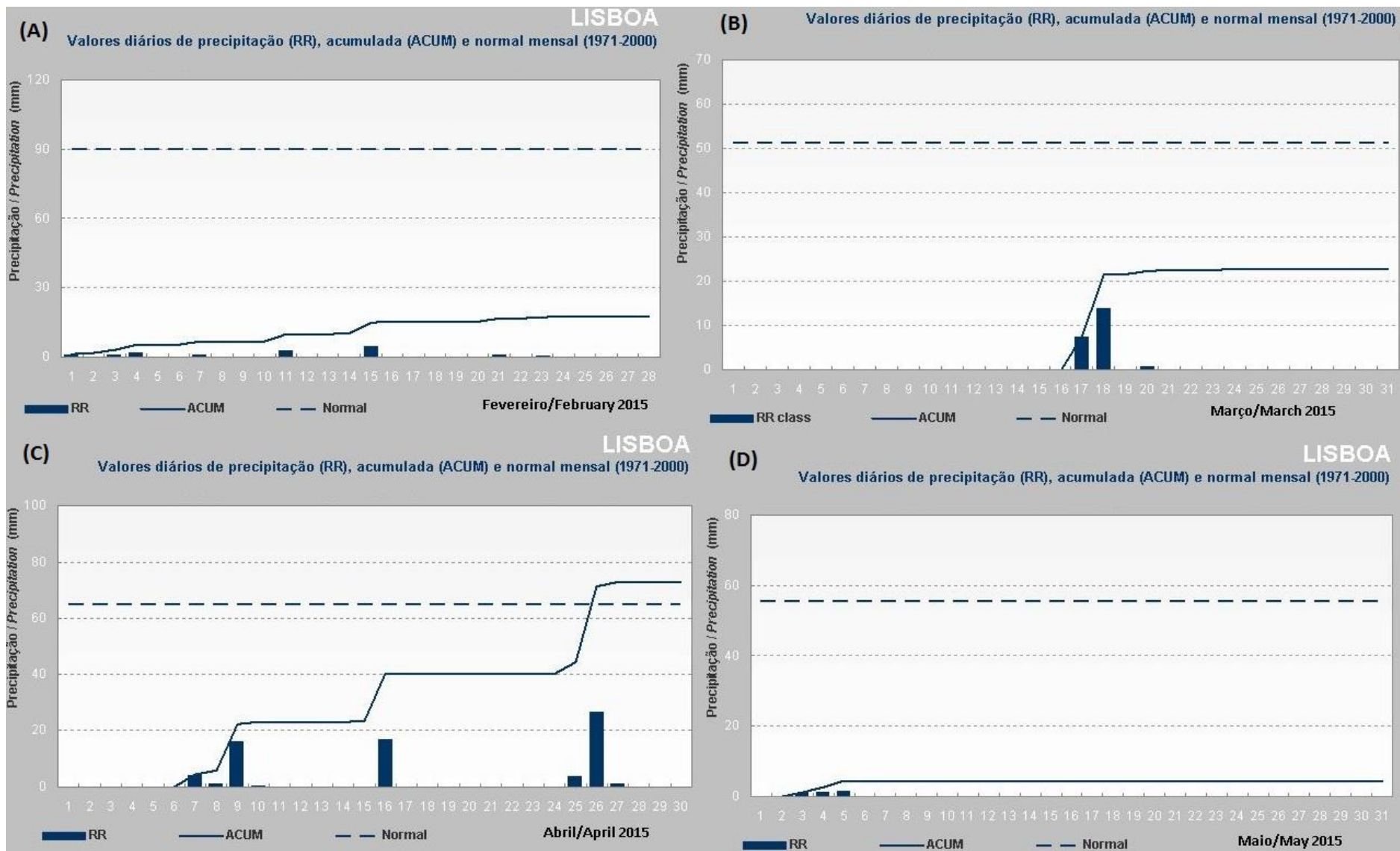


Figura 40) Valores de temperatura máxima e mínima diários em Lisboa, para os meses de colheitas, de (A) Fevereiro a (G) Agosto de 2015(adaptado de <https://www.ipma.pt/>)



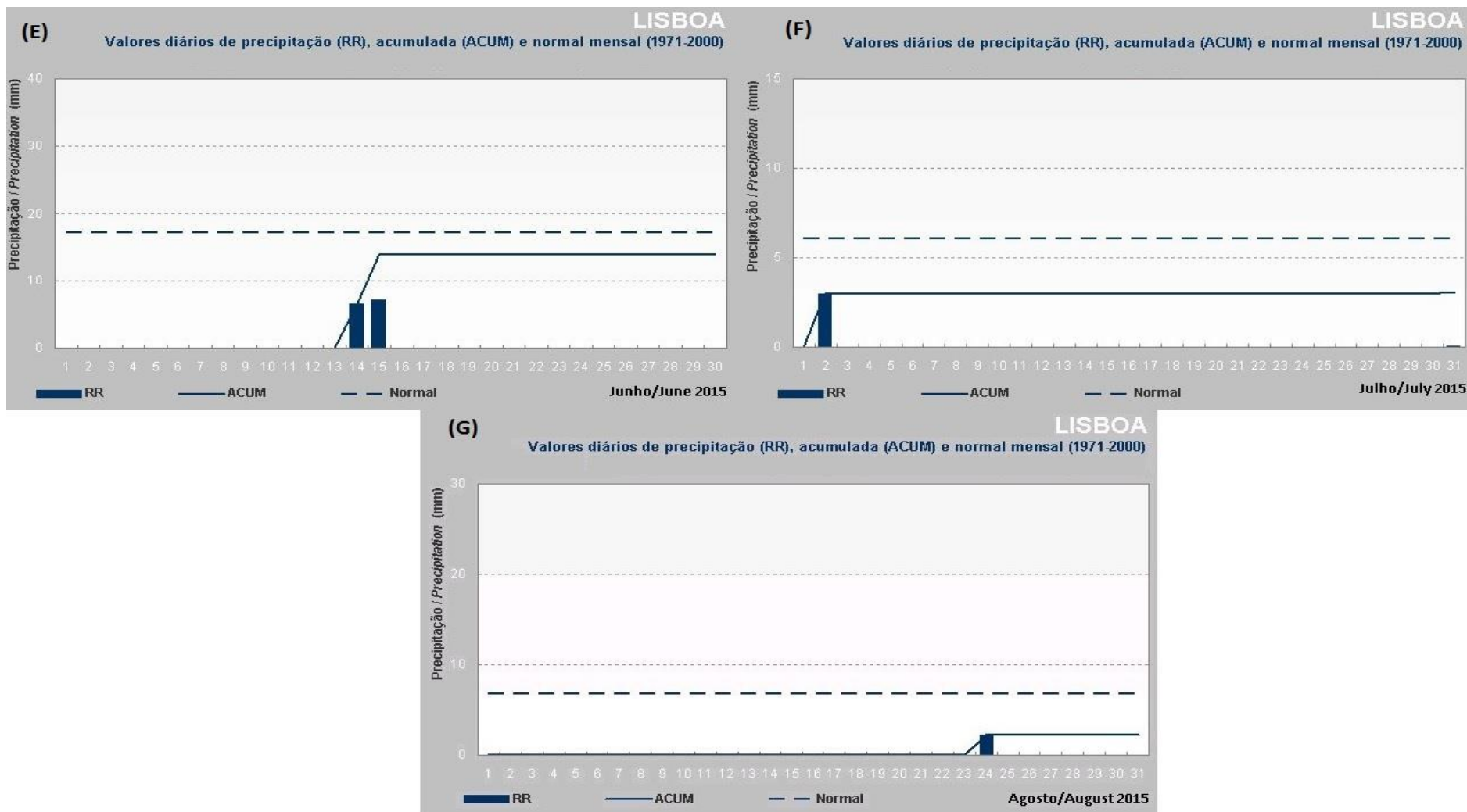


Figura 41) Valores diários de precipitação nos meses de realização das colheitas, de (A) Fevereiro a (G) Agosto de 2015 (adaptado de <https://www.ipma.pt/>)

Anexo G – Tabela de Resultado

VFX	2015	2015	2015	2015	2015	2015	2015	2015	2015	2015	2015	2015	2015	2015	2015	2015	2015
Data	5-mar	19-mar	23-mar	31-mar	13-abr	20-abr	4-mai	14-mai	19-mai	1-jun	11-jun	15-jun	18-jun	25-jun	16-jul	10-ago	20-ago
<i>E. coli</i>	616	103	663	247	447	1737	210	907	210	483	137	1137	983	287	1150	280	173290
E.F	40	40	20	62	62	386	104	104	82	20	<1	104	62	60	20	20	19365
CS	500	100	550	150	269	150	100	600	550	100	76	154	132	100		112	4200
B. <i>B.fragilis</i>	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	1	<1	<1	<1	<1
HAdV			4,65E+03			9,00E+03				2,25E+04	2,87E+03		1,99E+07				
HumDNA	4,98E+06	1,10E+06	2,11E+06	1,39E+06	8,24E+03	2,49E+06	2,92E+04	1,61E+06		3,29E+04	1,34E+05	7,00E+05	2,48E+05	3,82E+04	9,02E+04	1,96E+06	
CowDNA	2,21E+05		680,59	7,97E+03	1,37E+05	6,69E+04	3,83E+05	4,82E+04	4,52E+05	1,21E+06	1,17E+05	3,79E+04	1,13E+05	2,82E+04	3,37E+06	2,87E+06	3,22E+04
PigDNA	9,81E+03				6,73E+04	2,27E+04	6,43E+04	1,05E+05		1,57E+06		5,04E+05	1,74E+05	5,47E+03	9,75E+04		1,15E+04
PouDNA			2,61E+04			5,57E+04		1,68E+04						9,92E+03		2,69E+04	1,23E+04

MPN	2015	2015	2015	2015	2015	2015	2015	2015	2015	2015	2015	2015	2015	2015	2015	2015	2015	2015	
Data	12-fev	26-fev	5-mar	19-mar	23-mar	31-mar	13-abr	20-abr	4-mai	14-mai	19-mai	1-jun	11-jun	15-jun	18-jun	25-jun	16-jul	10-ago	20-ago
<i>E. coli</i>	1877	1793	1493	327	2460	137	2253	387	483	283	287	440	993	67	897	447	483	97	33
EF	244	462	342	290	738	62	82	146	342	214	280	148	104	6	264	62	124	21	20
CS	62	27	1000	200	350	800	450	700	300	800	1700	150	285	263	285	150	16	71	50
B.B.fragilis	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
HAdV		3,72E+04	1,31E+04		3,29E+03		7,17E+04				1,09E+04			1,12E+04		4,91E+03			

HumDN A		4,24E+05	6,69E+06	1,93E+06	2,40E+07	3,53E+06	1,42E+06	2,44E+05	3,87E+05	1,60E+05	2,22E+04		4,47E+06	1,09E+04	1,24E+05	1,81E+03	1,36E+05	1,70E+06	2,24E+04
CowDN A	1,48E+06	1,95E+06	1,48E+06	6,36E+03	5,03E+03	3,38E+04	3,59E+05	1,29E+05	1,36E+05	2,42E+04	5,51E+05		6,51E+04	3,60E+04	1,40E+06	4,34E+06	1,01E+04	2,29E+07	4,12E+05
PigDNA	3,02E+03				1,04E+05	2,50E+05	9,59E+04	5,21E+04	1,29E+04		8,69E+04	1,63E+04	2,10E+04		8,52E+05	1,42E+05	1,33E+04	1,73E+04	
PouDN A	1,04E+04	1,27E+09			6,52E+03				1,96E+06	3,42E+04	1,35E+06	3,84E+04		1,35E+05		7,60E+04	1,13E+04		1,14E+04

ALC	2015	2015	2015	2015	2015	2015	2015	2015	2015	2015	2015	2015	2015	2015	2015	2015	2015	2015	
Data colheita	19-mar	23-mar	31-mar	13-abr	20-abr	4-mai	14-mai	19-mai	1-jun	11-jun	15-jun	18-jun	25-jun	16-jul	10-ago	17-ago	20-ago		
E. coli	1653	173	247	323	710	210	3707	3107	4037	33	487	483	173	210	210	103	100		
EF	296	104	60	40	40	104	220	240	1434	7	20	25	40	40	32	20	58		
CS	2000	150	750	500	500	850	1150	650	16450	310	243	151	100	19	500	700	250		
B.B.fragilis	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1		
HAdV	1,18E+04		6,97E+03	5,90E+03		1,49E+04	9,83E+03	1,73E+04	2,19E+04		1,27E+04				1,87E+06				
HumDN A	9,10E+05	8,45E+06	2,35E+06	5,95E+03	1,10E+05	1,04E+07	3,72E+04			5,61E+05	1,40E+05	3,51E+05	2,64E+04	7,85E+04	9,16E+03	3,99E+05	2,47E+03		
CowDNA	2,06E+06	299,916	1,61E+06			4,03E+05	4,05E+05	6,28E+04	2,28E+04	1,00E+05	1,03E+05	1,38E+06	3,11E+04	2,90E+03	3,40E+06	1,29E+04	4,46E+05		
PigDNA					9,02E+03	6,49E+04			3,58E+05			3,19E+05	6,25E+03						7,38E+04
PouDNA				1,06E+06												2,20E+05	2,25E+05		2,69E+04

Belém	2015	2015	2015	2015	2015	2015	2015	2015	2015	2015	2015	2015	2015	2015	2015	2015	2015	2015	2015	
Data	12-fev	26-fev	5-mar	19-mar	23-mar	31-mar	13-abr	20-abr	4-mai	14-mai	19-mai	1-jun	11-jun	15-jun	18-jun	25-jun	16-jul	10-ago	17-ago	20-ago
E. coli	2323	43323	487	210	137	103	287	173	570	137	<30	403	450	33	67	33	67	173	67	137

EF	550	8212	216	20	20	40	60	82	808	<20	3586	172	82	40	20	82	69	45	14	20
CS	50	10450	200	12	100	200	1450	250	200	350	450	50	241	114	126	450		203	168	150
B.B.fragilis	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
HAdV	1,69E+03	4,21E+03	7,47E+04				8,79E+02						3,12E+05	1,41E+04		1,85E+04			2,96E+03	
HumDNA	3,67E+04	7,98E+11	9,69E+05	1,48E+12	1,19E+05	2,05E+06	8,24E+04	2,01E+05	4,90E+05	2,48E+04	8,21E+05	1,81E+04	8,53E+04	8,82E+05	9,99E+04		1,42E+05	1,96E+06	2,02E+05	7,03E+03
CowDNA		106295143	56910606,43	4,15E+04	9,13E+03	2,68E+04	9,45E+04	7,47E+04	1,05E+10	1,82E+05	1,46E+06	1,70E+05	1,37E+05	1,49E+03	6,53E+05	1,06E+05	3,23E+04	7,52E+06		1,88E+06
PigDNA		9,04E+04	4,86E+08	1,08E+04	1,12E+06			9,85E+04	6,58E+05		5,36E+04	1,62E+05	1,40E+04		1,00E+00			6,46E+04		9,03E+04
PouDNA		8,68E+03						4,28E+04	3,55E+05					1,11E+05		4,41E+03		3,26E+04		

Tabela 23) Tabela de todos os resultados obtidos neste estudo de todos os pontos e datas de colheitas

Anexo H – Tabela das características das águas nos dias de colheitas

	2015	2015	2015	2015	2015	2015	2015	2015	2015	2015	2015	2015	2015
Data colheita	12-Fev	26-Fev	05-Mar	19-Mar	23-Mar	31-Mar	13-Abr	20-Abr	04-Mai	14-Mai	19-Mai	01-Jun	11-Jun
VFX	-	-	Muito suja	Suja	Pouco suja	Pouco suja	Limpa	Suja	Muito suja	Pouco suja	Muito suja	Pouco suja	Pouco suja
MPN	Limpa	Muito suja	Muito suja	Muito suja	Muito suja	Limpa	Pouco suja	Suja	Muito Suja	Pouco suja	Suja	Limpa	Limpa
ALC	-	-	-	Suja	Limpa	Limpa	Suja	Pouco suja	Muito suja	Pouco suja	Pouco suja	Limpa	Limpa
Belém	Limpa	Suja	Muito suja	Suja	Limpa	Limpa	Limpa	Suja	Muito suja	Pouco suja	Pouco suja	Limpa	Limpa

	2015	2015	2015	2015	2015	2015	2015
Data colheita	15-Jun	18-Jun	25-Jun	16-Jul	10-Ago	17-Ago	20-Ago
VFX	Suja	Muito suja	Suja	Muito suja	Suja	-	Muito suja + cheiro
MPN	Limpa	Pouco suja	Pouco suja	Suja	Suja	-	Suja
ALC	Limpa	Limpa	Limpa	Limpa	Limpa	Limpa	Limpa
Belém	Limpa	Pouco suja	Suja	Pouco suja	Suja	Limpa	Limpa

Tabela 24) Características das águas em cada ponto nos dias das colheitas