

DETECÇÃO DE BACTERIÓFAGOS DE CEPAS HOSPEDEIRAS DE ENTEROCOCOS COMO UMA FERRAMENTA PARA RASTREAMENTO DE FONTES DE POLUIÇÃO FECAL

Lívia Fragoso de Melo Verçosa (*), Amanda Melo Moreira

*Universidade Estadual da Paraíba

liviafragosomelov@gmail.com

RESUMO

A contaminação de recursos hídricos por resíduos fecais representa uma grande ameaça à saúde humana, seja por consumo direto ou indireto, como por exemplo usos recreacionais e irrigação. Consequentemente, assegurar a qualidade dos corpos hídricos é de suma importância para que seja garantida a qualidade de vida de uma população. Uma importante ferramenta para certificar a qualidade de um corpo receptor é a identificação de fontes de contaminações. Neste trabalho, tal identificação foi feita através do rastreamento de fontes microbianas pela utilização de microorganismos termotolerantes. Para executar o rastreamento, foram coletadas amostras do esgoto bruto, proveniente de uma estação de tratamento da área de estudo, e amostras de fezes de diversos animais, que poderiam estar diretamente ligadas à qualidade do corpo receptor. A partir destas amostras foi possível fazer o isolamento de 374 potenciais cepas hospedeiras de *Enterococcus*. Posteriormente, foi feita a identificação de bacteriófagos. Toda a metodologia foi desenvolvida para eliminar possíveis hospedeiros que não atendiam aos requisitos necessários, tal qual uma triagem de isolamento. Na triagem, as cepas foram divididas em 4 grupos, sendo o grupo 1 o mais abrangente, com 263 potenciais hospedeiros, e o grupo 4 o mais seletivo, com 32 hospedeiros. Dessa forma, com base nas informações do grupo 4, foi possível identificar que 50% dos hospedeiros encontrados no corpo receptor eram provenientes de contaminação fecal de origem humana, ou seja, de esgoto bruto. Apesar da metodologia apresentada ter obtido êxito, ainda não há uma metodologia padrão para o rastreamento de fontes microbianas. Sendo assim, faz-se necessário o desenvolvimento de mais estudos acerca do assunto, visto que tal técnica pode auxiliar órgãos e autoridades competentes no que diz respeito ao controle da qualidade de recursos hídricos, através da identificação dos indivíduos poluidores.

PALAVRAS-CHAVE: Rastreamento, fontes de poluição, *enterococos*.

INTRODUÇÃO

O despejo das águas residuárias nos ecossistemas aquáticos é a principal causa da poluição ambiental, resultando na queda da qualidade sanitária dos recursos hídricos e danos tanto à saúde humana quanto ao meio ambiente. A contaminação das águas superficiais com fezes tanto de origem humana quanto não humana leva ao aumento do risco de exposição da saúde pública a patógenos através do abastecimento de água, aquicultura e atividades recreacionais (CRAUN et al., 2010). Ainda, a presença de patógenos também compromete os diversos usos da água, principalmente em regiões tropicais onde o clima é favorável ao crescimento desses microrganismos.

Contaminação fecal de origem humana apresenta maior risco à saúde pública, devido à especificidade dos vírus causadores de doenças, contudo a matéria fecal de origem não humana também representa um risco potencial de infecção por patógenos zoonóticos, tais como *Giardia spp.* e *Cryptosporidium spp.* (PURNELL; EBDON; TAYLOR, 2011). Sendo assim, a identificação da fonte de contaminação fecal é uma importante medida para avaliação dos riscos à saúde pública e para definição de estratégias de gestão.

Tradicionalmente a avaliação da qualidade microbiológica das águas é feita através do monitoramento de microorganismos indicadores da presença de matéria fecal devido, principalmente, à inviabilidade de identificação de todos os microorganismos presentes nos corpos aquáticos.

Os microrganismos mais frequentemente utilizados como indicadores são os coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* e *Enterococcus* em consequência da constante presença desses microrganismos em grandes quantidades no trato gastrointestinal da maioria dos animais de sangue quente (TRAN; GIN; NGO, 2015). Contudo, a utilização desses organismos para detecção e avaliação de patógenos é desafiadora visto que esses microrganismos podem se multiplicar em águas naturais sob condições favoráveis, tais como em temperaturas mornas (VOGEL et al., 2007). Além disso, os organismos indicadores não são capazes de distinguir as fontes de contaminação, resultando na subestimação ou superestimação dos potenciais riscos à saúde humana uma vez que determinadas fontes fecais representam maior risco que outras (PURNELL; EBDON; TAYLOR, 2011).

Portanto, um conhecimento mais profundo acerca das fontes de poluição fecal que afetam a qualidade das águas superficiais é de fundamental importância para a melhoria da gestão dos recursos hídricos, permitindo a adoção de medidas mitigadoras mais apropriadas ao tipo de contaminação, sendo assim menos dispendiosa e mais eficiente.

Como alternativa surge o rastreamento de fontes microbianas que envolvem uma série de técnicas que objetiva a identificação da contaminação fecal em águas superficiais e subterrâneas. O rastreamento de fontes microbianas é uma área que está avançando rapidamente, porém atualmente ainda não há uma metodologia padrão disponível para a identificação das fontes de contaminação em todas as situações. Dentro dessa perspectiva, o presente avaliou a capacidade de identificação de fontes de poluição fecal através de bacteriófagos de cepas hospedeiras de *Enterococos*.

METODOLOGIA

COLETA DAS AMOSTRAS

Amostras de fezes de animais foram coletadas para o isolamento de potenciais cepas hospedeiras de *Enterococos* e para subsequente detecção de bacteriófagos. O material fecal incluiu amostras provenientes de galinhas, porcos, alpacas, patos, gansos, cavalos e vacas. Amostras de esgoto bruto de uma estação de tratamento de esgoto da região metropolitana de Londres, na Inglaterra, foram coletadas para servir como amostras fecais de origem humana. A população equivalente da região é de 3,5 milhões de habitantes.

LOCAL DO EXPERIMENTO

O estudo foi desenvolvido na Unidade de Pesquisa de Meio Ambiente e Saúde Pública (EPHRU) da Escola de Meio Ambiente e Tecnologia da Universidade de Brighton, em Brighton, Reino Unido. No laboratório, as amostras de fezes foram homogeneizadas em solução Ringer estéril. As amostras coletadas para o isolamento de *Enterococos* foram processadas imediatamente.

ISOLAMENTO PRESUNTIVO DAS CEPAS HOSPEDEIRAS DE ENTEROCOCOS

As potenciais cepas hospedeiras foram obtidas a partir das amostras fecais coletadas e da amostra de esgoto bruto. Séries de diluições decimais (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}) foram preparadas das quais foram retirados 100 μ L para a semeadura de placas de petri contendo o meio seletivo m-Enterococcus Agar. As placas foram incubadas à 37°C por 44 horas.

Após a incubação, as placas contendo entre 10 e 60 unidades formadoras de colônias (UFC) foram transferidas para placas contendo ágar Bile Esculina (Oxoid) e incubadas por mais 4 horas à 44°C. As amostras apresentando escurecimento devido à hidrólise da esculina (**Figura 1**) foram semeadas em placas de petri contendo o meio m-Enterococcus Agar objetivando a obtenção de amostras puras.

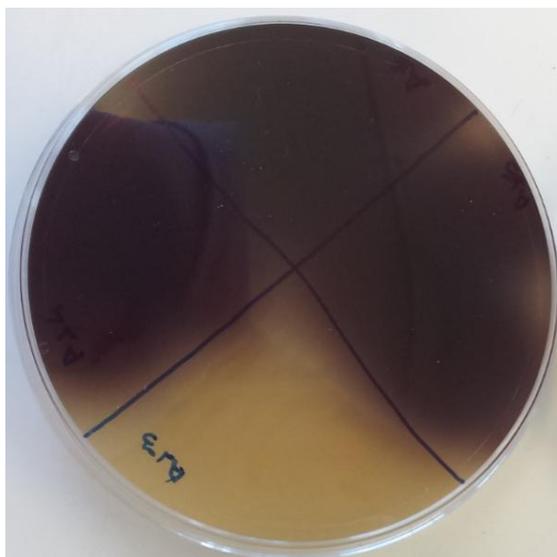


Figura 1: Placa de petri apresentando hidrólise da esculina. Fonte: Autor do Trabalho.

Posteriormente, as amostras foram submetidas ao teste de coloração de Gram (Figura 2). As presuntivas cepas hospedeiras de *Enterococos* (hidrólise da esculina, Gram positiva) foram incubadas à 37°C por 24 h em caldo soja tripticaseína (TSB).

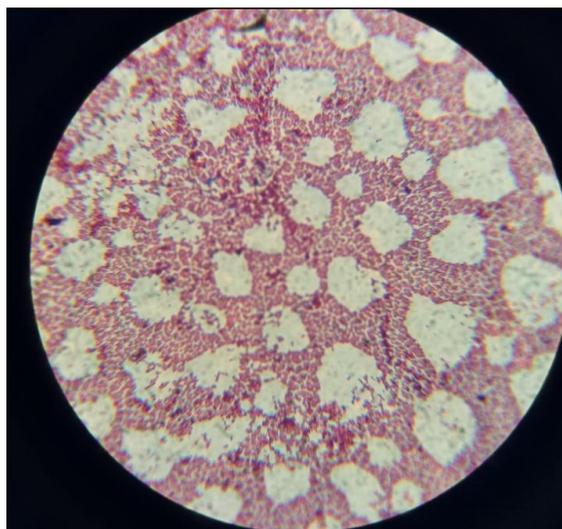


Figura 2: Presuntiva cepa hospedeira de *Enterococos* (hidrólise da esculina e Gram-positiva). Fonte: Autor do Trabalho.

As cepas que apresentaram crescimento satisfatório foram semeadas em meio líquido e incubadas à 37°C por 24 horas. Os tubos que apresentaram crescimento (turbidez das amostras) foram selecionados. Uma alíquota de 200 µL de cada amostra foram adicionadas à 10 mL de caldo soja tripticaseína (TSB) e incubadas à 37°C por 4 horas. As suspensões foram posteriormente utilizadas para a enumeração dos bacteriófagos.

ENUMERAÇÃO DOS BATERÍOFAGOS

As amostras fecais previamente homogêneas foram diluídas (1:10 v/v) em solução Ringer e centrifugadas a 3000g por 10 minutos. Os sobrenadantes resultantes foram filtrados em filtros seringa (Milipore) de 0,22 µm para a obtenção da suspensão viral.

Os bacteriófagos foram enumerados através do método da camada dupla, utilizando o ágar soja tripticase (TSA) em ambas as camadas. As concentrações de ágar tanto na camada superior quanto na camada inferior utilizadas correspondem às concentrações estabelecidas na ISO 10705/2.

As suspensões contendo os *Enterococos* em fase exponencial foram despejados na superfície das placas de petri contendo as camadas duplas de TSA. Uma alíquota de 1 mL da suspensão viral de cada amostra foi derramado sobre a camada hospedeira de *Enterococos*. Após solidificação, as placas foram vertidas e incubada à 37°C por 24 horas e, em seguida, observadas e quantificadas quanto à formação de zonas de lise (zonas claras) dentro da camada de bactérias, indicando a presença de fagos. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de placa por mL (UFP/mL) de amostra.

TRIAGEM DE ISOLAMENTO

Com o intuito de reduzir racionalmente a grande quantidade inicial de potenciais hospedeiros de *Enterococos*, através da eliminação das cepas que não atendiam aos requisitos necessários para serem consideradas hospedeiras, foi adotada uma abordagem de triagem utilizando grupos (**Figura 3**).



Figura 3: Abordagem de triagem para o isolamento de cepas hospedeiras de *Enterococos*. Fonte: Adaptado de PURNELL, EBDON e TAYLOR (2011).

O grupo 1 corresponde às cepas que foram confirmadas como presuntivas, ou seja, que apresentaram hidrólise da esculina, que foram identificadas como Gram positivas e que apresentaram bom crescimento após 24 h de incubação à 37°C em meio TSB.

O grupo 2 compreende as cepas da camada 1 que apresentaram bacteriófagos em pelo menos uma UFP por 100 mL. No grupo 3 se encontram as cepas da camada 2 que apresentaram especificidade à fontes fecais ou grupos fecais. O grupo 4, por sua vez, compreende as cepas da camada 3 que além de apresentarem especificidade também apresentaram mais de 100 UFP por 100 mL.

RESULTADOS

A **Tabela 1** apresenta as potenciais cepas hospedeiras de *Enterococos* proveniente de várias fontes fecais de acordo com a abordagem de triagem adotada.

Tabela 1. Designação das potenciais cepas hospedeiras de *Enterococos* provenientes de diversas fontes fecais.

Origem do hospedeiro	Nº de amostras	Nº de cepas			
		Grupo 1	Grupo 2 (%)	Grupo 3 (%)	Grupo 4 (%)
Galinha	5	27	8 (30)	6 (22)	2 (7)
Porco	5	44	15 (34)	12 (27)	2 (4)
Pato	5	33	9 (27)	7 (21)	3 (9)
Cavalo	2	14	1 (7)	1 (7)	0 (0)
Gado	3	48	21 (44)	19 (40)	9 (19)
Esgoto bruto	6	97	51 (63)	47 (48)	16 (17)
Total	26	263	105 (40)	92 (35)	32 (12)

Ao todo 374 potenciais hospedeiros de *Enterococos* foram isolados, dos quais 263 foram classificados no grupo 1. Em 38% dos hospedeiros do grupo 1 foram detectados bacteriófagos, sendo estes classificados como pertencentes ao grupo 2. Dentre os hospedeiros do grupo 2, a porcentagem mais alta corresponde aos fagos detectados nas cepas provenientes do esgoto bruto. Um total de 92 cepas foram designadas como pertencentes ao grupo 3 por apresentarem especificidade à fontes fecais. Desse grupo, a maior porcentagem, cerca de 48% das cepas, foram específicas de *Enterococos* provenientes do esgoto bruto. O grupo 4 compreendeu os 32 hospedeiros que apresentam uma concentração de fagos superior à 1×10^4 mL, os quais 50% provenientes de esgoto bruto.

CONCLUSÃO

A metodologia adotada para isolamento de potenciais cepas hospedeiras de *Enterococos* se apresentou satisfatória, permitindo a identificação da fonte de poluição fecal através da ação de bacteriófagos específicos de cada cepa hospedeira. Essa metodologia também se destaca pela facilidade em se isolar *Enterococos* e pela sua presença em animais de sangue quente.

Ainda, essa metodologia serve de subsídio para as agências ou órgãos fiscalizadores da qualidade de corpos aquáticos, visto que uma vez conhecido a fonte de poluição é possível rastrear os possíveis responsáveis e então tomar as devidas medidas de remediação e de punição, quando cabível. Sendo assim, essa metodologia pode se configurar como uma importante ferramenta da gestão dos recursos hídricos.

Apesar da metodologia apresentada ter obtido êxito, ainda não há uma metodologia padrão para o rastreamento de fontes microbianas. Sendo assim, faz-se necessário o desenvolvimento de mais estudos acerca do assunto, visto que tal técnica pode auxiliar órgãos e autoridades competentes no que diz respeito ao controle da qualidade de recursos hídricos, através da identificação dos indivíduos poluidores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CRAUN, G. F. et al. Causes of Outbreaks Associated with Drinking Water in the United States from 1971 to 2006. **Clinical Microbiology Reviews**, [s.l.], v. 23, n. 3, p.507-528, 1 jul. 2010. American Society for Microbiology.
2. PURNELL, Sarah E.; EBDON, James E.; TAYLOR, Huw D.. Bacteriophage Lysis of *Enterococcus* Host Strains: A Tool for Microbial Source Tracking?. **Environmental Science & Technology**, [s.l.], v. 45, n. 24, p.10699-10705, 15 dez. 2011. American Chemical Society (ACS).
3. TRAN, Ngoc Han; GIN, Karina Yew-hoong; NGO, Huu Hao. Fecal pollution source tracking toolbox for identification, evaluation and characterization of fecal contamination in receiving urban surface waters and groundwater. **Science of the Total Environment**, [s.l.], v. 538, p.38-57, dez. 2015. Elsevier BV.
4. VOGEL, Jason R. et al. Identifying Fecal Sources in a Selected Catchment Reach Using Multiple Source-Tracking Tools. **Journal of Environment Quality**, [s.l.], v. 36, n. 3, p.718-729, 2007. American Society of Agronomy.