

## \_Fungos em areias e águas costeiras e interiores em Portugal – relevância para a saúde humana e bem-estar

*Fungi in sand and coastal and inland waters in Portugal – relevance to human health and well-being*

Sara Brito<sup>1</sup>, Raquel Sabino<sup>2</sup>, Cristina Veríssimo<sup>2</sup>, Susana Silva<sup>3</sup>, Elisabete Valério<sup>1</sup>, João Brandão<sup>1\*</sup>

joao.brandao@insa.min-saude.pt

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

(2) Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge.

(3) Departamento de Epidemiologia, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge.

\*autor correspondente

### \_Resumo

Os fungos filamentosos e as leveduras são ubíquos na natureza, incluindo nas zonas balneares, e portanto, na areia. Contudo, certas espécies de fungos podem causar infeções ou alergias em humanos. Estudos anteriores mostraram que microrganismos patogénicos ou patogénicos oportunistas sobrevivem e crescem na areia. Uma vez que as zonas balneares são locais frequentados por um elevado número de pessoas, especialmente no verão, a qualidade microbiológica das areias e das águas balneares é particularmente importante. Assim sendo, o objetivo deste estudo é a recolha de dados sobre as espécies de fungos existentes em três zonas balneares, duas águas costeiras – Algarve e Lisboa e Vale do Tejo (LVT) e uma água de transição (LVT) A identificação dos isolados foi realizada através da observação de características morfológicas e através de métodos moleculares. Para isto, foram analisadas 18 amostras de areia e 18 amostras de água. Os isolados fúngicos detetados com maior frequência foram *Cladosporium* sp. (na praia costeira do Algarve e na de águas de transição) e *Sarocladium kiliense* (na praia costeira de LVT). Foram também isoladas algumas espécies responsáveis por causar alergias e infeções, tais como *Exophiala dermatitidis*, *Alternaria alternata*, *Trematosphaeria grisea* e *Aspergillus* secção *Nidulantes*, além de fungos potencialmente produtores de micotoxinas, nomeadamente *Aspergillus* secção *Fumigati*. Não foi possível identificar 19 das colónias isoladas (de 1005 no total, 1,9%). Os resultados obtidos permitiram identificar as espécies presente nos locais amostrados entre novembro de 2018 e junho de 2019, confirmando-se a presença de espécies com expressão clínica, que representam um potencial risco para a saúde dos utilizadores das praias e que deve passar a ser tido em conta na avaliação da qualidade da praia.

### \_Abstract

Filamentous fungi and yeast are ubiquitous in nature, including bathing areas and therefore, sand. However, certain fungal species can cause infections or allergies in humans. Previous studies have shown that there are opportunistic or pathogenic microorganisms that can survive and grow in sand. Since bathing areas are used by a large numbers of people, especially during the summer months, the microbiological quality of sand and bathing water is particularly important. Thus, the aim of this study is to collect data on the fungal species present in the three bathing areas under study (two coastal – one in Algarve and the other in Lisbon and Tagus Valley - and one with transition waters in Lisbon and Tagus Valley). The identi-

fication of the isolates was performed by observing morphological characteristics and by using molecular tools. For this purpose, 18 sand samples and 18 water samples were analysed. The most frequently isolated fungi were *Cladosporium* sp. (in Algarve at the transition waters beach) and *Sarocladium kiliense* (at the coastal beach of Lisboa and Tagus Valley). Some species causing allergies and infections, such as *Exophiala dermatitidis*, *Alternaria alternata*, *Trematosphaeria grisea* and *Aspergillus* section *Nidulantes*. Moreover, species potentially producers of mycotoxins were also isolated, namely members of *Aspergillus* section *Fumigati*. Nineteen of the isolates were not possible to identify (out of 1005, 1.9%). This project generated data on the fungal species isolated between November 2018 and June 2019 in the three sites sampled. The presence of fungi that may be associated with clinical cases was confirmed, thus revealing a potential health risk to beach users that must be taken into account in the beaches quality profile.

### \_Introdução

Os fungos são organismos eucariotas, heterotróficos e sem clorofila que estão dependentes dos nutrientes de origem externa. Assim, vivem como saprófitas, parasitas, ou em simbiose com plantas e animais, em praticamente todas as condições ambientais. O fenótipo destes organismos vai desde um aspeto unicelular a um aspeto dimórfico ou filamentoso (1).

Os fungos filamentosos e as leveduras são ubíquos na natureza como microrganismos que habitam o solo. Nas areias das praias também são encontrados. A temperatura e a disponibilidade de nutrientes são os principais fatores que determinam a composição da comunidade de leveduras. A água doce e os ambientes marinhos costeiros sujeitos a ações terrestres e a atividades humanas estão fortemente colonizados por fungos (2).



As areias das praias podem atuar como um elemento passivo da poluição cumulativa e podem ser contaminadas por lixo, dejetos de animais que são passeados nas praias ou pela própria água, que pode transportar microrganismos patogénicos, oportunistas e parasitas (3–5). A areia também pode atuar como um mecanismo de transmissão para agentes patogénicos oportunistas de origem não-fecal, como acontece com os dermatófitos, que podem ser levados pelos próprios utilizadores das praias (6). As leveduras, por outro lado, podem provocar infeções se entrarem em contacto direto com a pele.

Várias publicações têm reportado a existência de microrganismos patogénicos e oportunistas que sobrevivem e crescem na areia (2). Indivíduos com o sistema imunitário comprometido (transitoriamente ou cronicamente) são mais suscetíveis a adquirir infeções causadas por microrganismos encontrados na areia da praia (7).

Os fungos considerados como verdadeiramente patogénicos estão incluídos numa única ordem, quase em exclusivo – a Onygenales. Esta ordem contém os dermatófitos, como os do género *Trichophyton*, e os fungos dimórficos, como os géneros *Coccidioides* e *Histoplasma* (8).

O conjunto vasto de infeções causadas por fungos resulta da inalação de esporos fúngicos e de células vegetativas (hifas)

ou do contacto com células fúngicas. A ingestão de micotoxinas também poderá causar problemas de saúde graves. Em contraste com outras fontes alergénicas, os fungos são muito comuns no meio ambiente, e a exposição a esporos no ar é quase constante durante todo o ano (1,2).

As infeções fúngicas da pele e das unhas constituem o grupo mais numeroso e mais comum de todas as micoses (9). Os casos de dermatofitoses em humanos são, essencialmente, infeções fúngicas superficiais, dado que os dermatófitos invadem e espalham-se em tecidos queratinizados, como o cabelo, a pele e as unhas, podendo, contudo, afetar várias partes do corpo (10).

Os banhistas passam a maioria do seu tempo na areia e não na água. Atualmente existe já legislação para a qualidade das águas balneares, contudo a qualidade das areias é um tema ainda não contemplado na avaliação da segurança da utilização pública das praias (costeiras ou fluviais).

Tendo em consideração todas as questões enumeradas, julgamos que os fungos não devem ser negligenciados na avaliação da qualidade das praias e consequente utilização de zonas balneares, que deve ser integrada nas políticas de saúde pública com brevidade.

## \_Objetivos

O objetivo principal deste trabalho foi a caracterização das populações de fungos das microbianas em três zonas balneares como participação Nacional no projeto Europeu “*Exploring fungal contamination in the sand and water around the Mediterranean Sea and other water bodies of Europe – relevance to human health and wellbeing*”, da *European Confederation of Medical Mycology* (ECMM), apresentando-se os primeiros sete meses da contribuição de Portugal para este mesmo projeto. Pretende-se deste modo definir os perfis “normais” das praias, de maneira a facilmente identificar casos não conformes, associados a contaminações, ou casos atípicos que requeiram uma intervenção especial.

## \_Materiais e métodos

As colheitas decorreram entre o final de novembro de 2018 e junho de 2019 tendo sido recolhidas uma amostra de areia e uma amostra de água em cada campanha.

As amostragens ocorreram em três praias: duas de áreas costeiras em Lisboa e Vale do Tejo (LVT) e no Algarve, e uma de transição de LVT. Foram recolhidas sete amostras na praia costeira de LVT, sete amostras na praia de águas de transição, e quatro amostras na praia costeira do Algarve.

A recolha de areia foi feita em três pontos da praia, usando um único saco de plástico estéril. A colheita da areia foi efetuada na superfície do areal, utilizando luvas descartáveis para colocar a areia dentro do saco.

A colheita de água foi realizada num único ponto, com recurso a um frasco de plástico estéril, que se encheu com água na zona de rebentação.

Todas as amostras (de areia e de água) foram transportadas para o laboratório e conservadas a 4 °C (+/- 1°C), até ao seu processamento (máximo até 5 dias após colheita).

As amostras de areia foram processadas com extração de 40 g de areia com 40 mL de água destilada estéril por agitação orbital (100 rotações por minuto). Do sobrenadante da extração de cada amostra foram usados 200 µL para espalhamento em cada uma das placas de Petri, umas de agar de malte (contendo extrato de malte e cloranfenicol para cres-

cimento e identificação de fungos filamentosos e leveduras), outras em placas de Petri de Micosel agar (com actidiona e cloranfenicol para crescimento e identificação de dermatófitos). Realizaram-se 3 réplicas de cada inoculação por meio. A incubação fez-se a (27,5°C +/- 2,5°C), durante 5 a 7 dias para as placas de malte e 3 semanas para as de Micosel agar. De modo a caracterizar macroscopicamente cada um dos isolados, foram analisadas as seguintes características das colónias: cor do lado frontal, a cor do reverso, topografia, textura e o seu aspeto geral. A identificação microscópica realizou-se com recurso a coloração com azul de lactofenol e observação microscópica com ampliação de 400x.

A identificação molecular foi realizada com o propósito de identificar os isolados para os quais não foi possível obter identificação morfológica. Esta análise foi realizada em 51 colónias utilizando a sequenciação da região ITS1 (*Internal transcribed spacer*) dos genes do rDNA (11).

## \_Resultados

No total foram analisadas 36 amostras, tendo-se verificado que o número de colónias que cresceu nas amostras de areia foi superior ao que cresceu nas amostras de água, o que sugere um efeito de dispersão na água.

O maior número de isolados (576) foi obtido na praia de águas de transição, seguida pela praia costeira do Algarve (305 isolados), e pela praia Costeira de LVT (124).

O número de espécies, teve a mesma distribuição: em que na praia de águas de transição revelou o maior número de espécies (51), seguida pela praia do Algarve (33 espécies), e pela praia Costeira de LVT (28).


Na praia do Algarve, o número médio de isolados decresceu desde novembro até junho. No mês de novembro registou-se o maior número de isolados (265); em março registaram-se, em média, 107 isolados; em abril, o número médio de isolados foi 97; por fim, em junho, registou-se o menor número de isolados (84). O género mais abundante foi *Cladosporium* sp. – no total, foram encontrados 95 isolados deste género; as espécies/géneros menos abundantes foram *Didymella* sp., *Fusarium proliferatum*, *Penicillium glabrum*, *Phaeosphaeria*

*spartinae*, *Sarocladium strictum*, *Acremonium atrogriseum*, *Phialemoniopsis curvata*, *Acrostalagmus luteoalbus* e *Roussoella neopustulans* – para cada uma destas espécies, foi encontrado apenas um isolado. Registou-se o maior número de isolados no mês de novembro – o número médio de colónias na amostra de areia foi 200 e o número médio de colónias na amostra de água foi 65. O menor número de isolados foi registado no mês de junho – em média, cresceram 84 colónias na amostra de areia, ao passo que não cresceu nenhuma colónia na amostra de água.

Na praia costeira de LVT, a variação do número médio de isolados não ocorreu de forma decrescente durante o período do estudo. Em dezembro, registaram-se, em média, 10 isolados; em janeiro, o número médio de isolados foi 10; em fevereiro, o número médio de isolados foi 77; em março, registaram-se 89 isolados; em abril, registaram-se 7 colónias; em maio, o número médio de colónias foi 12; em junho, o número de colónias registadas foi quatro. A espécie mais abundante foi *Sarocladium kiliense* – no total, foram encontrados 21 isolados desta espécie. As espécies menos abundantes foram *Aspergillus* secção *Nidulantes*, *Phoma* sp. e *Trematosphaeria grisea*. Para além destas três espécies, houve mais quatro espécies que não foram possíveis de identificar que também fazem parte das espécies menos abundantes, pois para cada uma delas foi encontrado apenas um isolado. O maior número de isolados foi registado no mês de março - na amostra de areia, cresceram, em média, 67 colónias; na amostra de água, cresceram 22 colónias. O menor número de isolados foi registado no mês de junho – o número médio de colónias na amostra de areia foi quatro; não cresceu nenhuma colónia na amostra de água.

Na praia de águas de transição, tal como aconteceu na costeira de LVT, não se observou uma variação do número médio de isolados decrescente entre dezembro e junho. Em dezembro, registaram-se, em média, 55 colónias; em janeiro, o número médio de isolados foi 129; em fevereiro, o número de colónias registado foi 272; em março, registaram-se 64 colónias; em abril, registaram-se 159 colónias; em maio, o número médio de colónias foi 220; em junho, o número médio de colónias registado foi 64. O género mais abundante na areia

foi *Cladosporium* sp. – no total, estavam presentes 150 isolados. As espécies/géneros menos abundantes foram *Chrysosporium* sp., *Rhizopus arrhizus*, *Plectosphaerella plurivora*, *Peniophora quercina*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Aspergillus* secção *Nigri*, *Fusarium proliferatum*, *Acremonium vitellinum* e *Sarocladium glaucum* – para cada uma destas espécies, foi encontrado apenas um isolado. Registou-se o maior número de isolados no mês de fevereiro - cresceram, em média, 245 colónias na amostra de areia e 27 colónias na amostra de água. Em dezembro registou-se o menor número de isolados - na amostra de areia, o número médio de colónias foi 50; na amostra de água, o número médio de colónias foi 5. A [figura 1](#) mostra a distribuição por praia e por matriz (areia e água) para todo o período de estudo numa análise descritiva da contagem total de unidades formadoras de colónias por grama de areia (ufc/g). A [tabela 1](#) mostra a distribuição de ufc/g por praia, por matriz e por mês.

Figura 1:  Boxplot da Contagem total de unidades formadoras de colónias (por grama de areia) por praia e tipo de amostra (areia a laranja e água a azul).

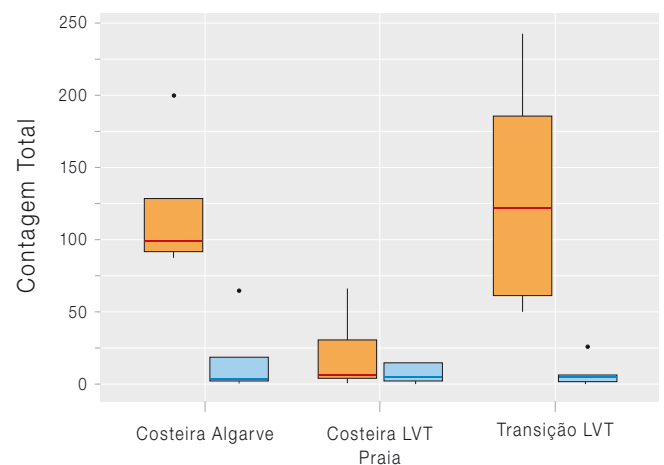


Tabela 1: ↕ Distribuição do número de unidades formadoras de colónias por grama de areia - por praia, por matriz (água/areia) e por mês. ND: não disponível.

		Areias			Águas		
		Costeira Algarve	Costeira LVT	Transição LVT	Costeira Algarve	Costeira LVT	Costeira LVT
Número de espécies identificadas		18	11	29	9	11	12
Contagem Total (mediana)		99,17	6,67	136,67	3,33	5,00	5,00
Contagem total por mês (mediana)	Nov/18	200,00	ND	ND	65,00	ND	ND
	Dez/18	ND	1,67	ND	ND	8,33	5,00
	Jan/19	ND	5,00	121,67	ND	5,00	6,67
	Fev/19	ND	55,00	245,00	ND	21,67	26,67
	Mar/19	105,00	66,67	60,00	3,33	21,67	3,33
	Abr/19	93,33	6,67	151,67	3,33	0,00	6,67
	Mai/19	ND	6,67	220,00	ND	5,00	0,00
	Jun/19	88,33	3,33	63,33	0,00	0,00	0,00

## \_Discussão e conclusões

Dos três grupos – leveduras; fungos filamentosos potencialmente patogénicos ou alergénicos; e dermatófitos – os fungos filamentosos potenciais patogénicos ou alergénicos foram os fungos com maior representação. Destes, o género *Aspergillus* foi o mais abundante. Os géneros *Chrysosporium* e *Scopulariopsis* foram os menos frequentes deste grupo – cada um deles foi detetado apenas numa amostra.

O número de espécies de leveduras presentes nas amostras foi inferior ao número de espécies de fungos filamentosos. No total, foram identificadas seis espécies de leveduras pertencentes a três géneros. Não foi encontrada nenhuma espécie de dermatófitos em nenhuma amostra das três praias.

É possível observar que algumas das espécies encontradas no presente trabalho são as mesmas que já foram anteriormente identificadas noutros estudos (7,12-16). Tendo em conta que estas espécies já tinham sido identificadas em algumas praias portuguesas, a presença destes fungos nas três praias em estudo pode indicar que eles estão distribuídos pela costa portuguesa, com as diferenças apontadas entre estudos anteriores e o atual.

Verificou-se a existência de diversas espécies, algumas das quais são responsáveis por causar infeções e alergias muito graves. As espécies *Trematosphaeria grisea*, *Alternaria alternata*, *Alternaria tenuissima*, *Exophiala dermatitidis*, *Aspergillus* secção *Nidulantes*, *Aspergillus* secção *Nigri* e *Cladosporium* *cladosporoides* são exemplos de espécies presentes nas amostras deste estudo que podem causar alergias e infeções em humanos.

Verificou-se uma baixa frequência de *Candida albicans*, o que indica ausência de contaminação fecal nos locais em estudo (semelhante ao anteriormente descrito por Brandão *et al.* (12)). No geral observa-se que a abundância e diversidade encontrada é influenciada pelas características geológicas e circundantes das praias. As espécies fúngicas podem contextualizar a praia de que são isoladas, já que algumas das espécies são saprófitas vegetais revelando uma componente mais natural enquanto que fungos negros sugerem potencial contaminação com hidrocarbonetos, como combustíveis e plásticos que podem advir de atividades circundantes.

Julgamos importante divulgar os resultados obtidos neste estudo, no sentido de alertar as autoridades competentes a to-

marem medidas, de forma a melhorar a qualidade das areias, de forma idêntica ao que já é feito com as águas, uma vez que os banhistas passam a maioria do seu tempo na areia e não têm conhecimento dos microrganismos que aí habitam, o que faz com que não tenham consciência das doenças a que podem estar expostos quando visitam uma praia e consequentemente tomar medidas de higiene adequadas.

É importante realizar também campanhas de sensibilização ao público em geral para que os utilizadores das praias tenham consciência que devem ter atenção às atividades que podem provocar contaminações, principalmente dejetos de animais e lixo orgânico.

#### Agradecimentos

Os autores agradecem o financiamento interno do departamento de saúde ambiental que permitiu desenvolver este trabalho do qual resultou a tese de mestrado da autora Sara Brito e a Dr<sup>a</sup> Lena Klingspor pelo apoio prestado relativamente à amostragem no Algarve.

#### Participação

Sara Brito e João Brandão realizaram as campanhas de amostragem. Sara Brito realizou as análises moleculares sob supervisão e apoio de Elisabete Valério, e as restantes sob orientação de João Brandão, Raquel Sabino e Cristina Veríssimo. Raquel Sabino e Cristina Veríssimo efetuaram otimização da metodologia molecular aplicada ao estudo e a confirmação da identificação de espécies (função laboratório de referência). Susana Santos validou e analisou os dados.

João Brandão desenhou o estudo em colaboração com os parceiros Europeus do Projecto Mycosands, incluindo Raquel Sabino e Cristina Veríssimo. Junto com Elisabete Valério, liderou a construção do artigo em igual participação.

#### Referências bibliográficas:

- (1) Simon-Nobbe, B., Denk, U., Pöll, V., Rid, R. & Breitenbach, M. The spectrum of fungal allergy. *International archives of allergy and immunology* 145, 58–86 (2008).
- (2) Efstratiou, M. A. Microorganisms in Beach Sand: Health Implications. in *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences* (Elsevier, 2018). doi:10.1016/b978-0-12-409548-9.10914-5
- (3) Ashbolt, N. J., Grohmann, G. S. & Kueh, C. S. W. Significance of Specific Bacterial Pathogens in the Assessment of Polluted Receiving Waters of Sydney, Australia. *Water Sci. Technol.* 27, 449–452 (1993).
- (4) Nix, P. G., Daykin, M. M. & Vilkas, K. L. Sediment bags as an integrator of fecal contamination in aquatic systems. *Water Res.* 27, 1569–1576 (1993).
- (5) Howell, J. M., Coyne, M. S. & Cornelius, P. L. Effect of sediment particle size and temperature on fecal bacteria mortality rates and the fecal coliform/fecal streptococci ratio. *J. Environ. Qual.* 25, 1216–1220 (1996).
- (6) Weiskerger, C. J. *et al.* Impacts of a changing earth on microbial dynamics and human health risks in the continuum between beach water and sand. *Water Research* 162, 456–470 (2019).
- (7) Sabino, R. *et al.* Pathogenic fungi: An unacknowledged risk at coastal resorts? New insights on microbiological sand quality in Portugal. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 1506–1511 (2011).
- (8) Hyde, K. D. *et al.* The world's ten most feared fungi. *Fungal Divers.* 93, 161–194 (2018).
- (9) Havlickova, B., Czaika, V. A. & Friedrich, M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses* 51, 2–15 (2009).
- (10) Coulibaly, O., L'Ollivier, C., Piarrou, R. & Ranque, S. Epidemiology of human dermatophytoses in Africa. *Med. Mycol.* 56, 145–161 (2018).
- (11) White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ and White TJ (editors). *PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications*. New York: Academic Press, Inc; 1990. pp. 315–322. 11.  
White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ and White TJ (editors). *PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications*. New York: Academic Press, Inc; 1990. pp. 315–322.
- (12) Brandão, J. *et al.* Qualidade microbiológica de areias de praias litorais - Relatório Final. *Associação Bandeira Azul da Europa (ABAE) - Instituto do Ambiente (IA)* (2002).
- (13) Steele, C.W. Fungus Populations in Marine Waters and Coastal Sands of the Hawaiian, Line, and Phoenix Islands. *Pacific Sci.* 21, 317–331 (1967).
- (14) Dunn, P.H. & Baker, G.E. Filamentous fungal populations of Hawaiian beaches. *Pacific Sci.* 38, 232–248 (1984).
- (15) Pereira, E. *et al.* Microbiological and mycological beach sand quality in a volcanic environment: Madeira archipelago, Portugal. *Sci. Total Environ.* 461–462, 469–479 (2013).
- (16) Abreu, R. *et al.* Sediment characteristics and microbiological contamination of beach sand – A case-study in the archipelago of Madeira. *Sci. Total Environ.* 573, 627–638 (2016).