

Caracterização da população bacteriana em barragens na bacia hidrográfica do Sado

Characterization of the bacterial population in water dams of the Sado watershed

Maria Sousa^{1,2}, Patrícia Morgado¹, João Rodrigues³, Rui Matias³, Isabel Nogueira⁴, Luísa Jordão¹

maria.jordao@insa.min-saude.pt

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

(2) Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa.

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

(4) Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa, Microlab.

_Resumo

As barragens são fundamentais para a gestão dos recursos hídricos. Estas infraestruturas permitem regular os caudais e aproveitar a água para diversas atividades como a agricultura, pecuária, captação para consumo humano e turismo (p.e. praias fluviais e desportos aquáticos). Neste estudo, foi avaliada a flora bacteriana (planctónica e organizada em biofilmes) presente em 4 barragens da bacia hidrográfica do rio Sado. A caracterização da flora bacteriana presente para além de permitir a caracterização do ecossistema permite inferir sobre potenciais riscos para a saúde humana decorrentes dos diversos usos da água.

_Abstract

Water dams are crucial for water management. These infrastructures allow the control of water flows and usage of water for activities such as agriculture, livestock, for human consumption and tourism (e.g. beaches and aquatic sports). In this study, the bacterial flora present in four dams located at the hydrographic basin of Sado river was evaluated (planktonic and organized in biofilms). The characterization of the bacterial flora allows the characterization of the ecosystem and speculate about the potential risks for human health caused by water usage for different applications.

_Introdução

A água é um bem essencial à vida, contudo pode também veicular microrganismos patogénicos como por exemplo, o agente etiológico da cólera (1). Como tal, é fundamental assegurar a qualidade, não só da água para consumo humano, mas também de águas recreativas e ornamentais em ambiente natural ou humanizado. O controlo de qualidade da água deve ser realizado de acordo com o seu uso o que se reflete na legislação aplicável a cada tipo de água. No caso da água para consumo humano os parâmetros a analisar estão devidamente regulamentados pelo DL152/2017 de 7 de dezembro,

o mesmo sucede com águas recreativas como por exemplo piscinas (NP4542/ 2017) mas, por exemplo, no caso de águas ornamentais não existem quaisquer normativas embora estas também possam funcionar como reservatórios de microrganismos potencialmente patogénicos para o Homem.

Em Portugal, a bacia hidrográfica do rio Sado constituída por 8 barragens (Alvito, Odivelas, Campilhas, Fonte Serne, Monte da Rocha, Pego do Altar, Roxo e Vale do Galho) apresenta elementos de elevado valor patrimonial e paisagístico. Os seus 7692 km² de área fazem dela a bacia com maior área inteiramente portuguesa (2).

A água armazenada nestas barragens, nomeadamente nas quatro estudadas neste trabalho (Alvito, Odivelas, Monte da Rocha e Roxo), é utilizada para diversos fins como captação de água para abastecimento (público e industrial), atividades agrícolas como é o caso das barragens de Monte da Rocha e Roxo (3). A barragem do Alvito é também utilizada para fins recreativos (desportos náuticos). Pelo exposto, a avaliação periódica da qualidade da água é importante para salvaguardar o bem-estar da comunidade.

Para além de avaliar a flora planctónica é também importante pesquisar a presença de biofilmes. Os biofilmes são comunidades complexas formadas por microrganismos de diferentes espécies envolvidos numa matriz extracelular secretada pelos mesmos. Os biofilmes são uma estratégia de sobrevivência dos microrganismos que lhes permite resistir a diversos fatores de stress como exposição a elementos tóxicos e carências nutricionais. O seu estudo é relevante uma vez que estão associados a um aumento da resistência a antimicrobianos podendo originar infeções no Homem de difícil tratamento. A avaliação da presença de reservatórios ambientais de mi-

crorganismos potencialmente patogénicos para o Homem organizados em biofilmes é por isso relevante.

_Objetivos

Este trabalho tem como objetivo caracterizar a população bacteriana presente em 4 barragens localizadas na bacia hidrográfica do rio Sado. A eventual identificação de reservatórios de microrganismos potencialmente patogénicos para o Homem foi outro objetivo do trabalho.

_Metodologia

Amostragem

Em julho de 2016, foram colhidas amostras de água superficial e biofilmes como descrito anteriormente (4) em 4 barragens da bacia hidrográfica do rio Sado: Monte da Rocha (37°43'40.0"N 8°18'03.9"W, Barragem 1), Roxo (37°56'36.7"N 8°03'56.8"W, Barragem 2), Alvito (38°16'56.0"N 7°54'57.6"W, Barragem 3) e Odivelas (38°11'06.9"N 8°06'54.9"W, Barragem 4) (figura 1). Doravante as barragens serão representadas pelos respetivos números. A temperatura e o pH da água foram determinados no local da colheita.

Adicionalmente, foram recolhidas 2 amostras de sedimentos para estudo de biofilmes. O sedimento foi colocado em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato (PFA 4%) no local da colheita.

Caracterização microbiológica das amostras

Foram filtrados 10 mL de água através duma membrana com poro de 0,45 µm. Os filtros foram transferidos para meio Drigalski e Muller Hinton agar e incubados a 30°C ou 37°C durante 24 horas. Os biofilmes foram dispersos em 10 mL de PBS e processados da mesma forma. As bactérias presentes nos meios de cultura foram identificadas utilizando o VITEK2 como descrito anteriormente (4).

Microscopia eletrónica de varrimento (SEM)

As amostras foram processadas para SEM como descrito anteriormente por Bandeira e colegas (5), com pequenas alterações. As amostras foram tratadas com tetróxido de ósmio a

1% em PBS durante 1 hora à temperatura ambiente, desidratadas com soluções de etanol de concentração crescente (30, 50, 70 e 95%) durante 30 minutos e com uma solução de etanol absoluto (3 vezes durante 30 minutos). Os sedimentos foram transferidos para um suporte com fita de carbono dupla e colocados num exsiccador até ficarem completamente secos. As amostras foram cobertas com um filme de carbono com 20 mm de espessura (Sputter Coater QISOT ES) e observadas num microscópio eletrónico de varrimento (JSM-7100F JEOL).

_Resultados e discussão

Este estudo consistiu na identificação de espécies bacterianas nas principais barragens pertencentes à bacia hidrográfica do rio Sado. As características físico-químicas e microbiológicas das amostras são apresentadas na tabela 1.

Em todos os casos, o pH da água estava próximo da neutralidade ou era neutro, tendo oscilado entre 6,6 (Barragem 1) e 7,1 (Barragem 3). A temperatura da água oscilou entre os 27°C (Barragem 1) e 33°C (Barragem 3). Os valores da temperatura podem ter sido influenciados pela hora a que foi efetuada a colheita; uma vez que as temperaturas registadas nas colheitas efetuadas no período da manhã foram inferiores às que se registaram no período da tarde.

Todas as amostras de água apresentavam uma elevada carga microbiana. Embora todas as amostras tenham sido consideradas como incontáveis (> 300 Unidades Formadoras de Colónias (UFC)/10 mL), o número de UFC nas amostras colhidas nas barragens 2 e 4 era mais elevado do que nas barragens 1 e 3. Este facto pode estar relacionado com uma maior eutrofização da água nas barragens 2 e 4, evidenciado pela presença de uma comunidade fitoplantónica muito abundante, como se pode observar na figura 2.

Independentemente, da carga microbiana presente, em todos os casos foram identificadas bactérias potencialmente patogénicas para o Homem. Estas bactérias foram isoladas tanto na forma planctónica (água) como na forma sésil organizadas em biofilmes. Contudo, como se pode observar na tabela 1, foram identificadas espécies distintas na água e nos biofilmes.

Tabela 1: Caracterização das amostras.

Local da colheita		Características físico-químicas da água		Análise microbiológica	
Identificação	Coordenadas GPS	Temperatura (°C)	pH	Água	Biofilme
Albufeira do Monte da Rocha (Barragem 1)	37°43'40.0"N 8°18'03.9"W	27	6,6	<i>Serratia marcescens</i> <i>Aeromonas veroni</i> <i>Aeromonas sobria</i>	<i>Citrobacter braakii</i> <i>Acinetobacter baumani complex</i>
Albufeira do Roxo (Barragem 2)	37°56'36.7"N 8°03'56.8"W	28	7,0	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	<i>Pseudomonas spp</i> <i>Delftia acidovorans</i> <i>Pseudomonas putida</i>
Albufeira do Alvito (Barragem 3)	38°16'56.0"N 7°54'57.6"W	33	7,1	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Aeromonas sobria</i>
Albufeira de Odivelas (Barragem 4)	38°11'06.9"N 8°06'54.9"W	30	6,8	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Citrobacter freundii</i> <i>Enterobacter cloacae complex</i> <i>Acinetobacter baumanni complex</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Pseudomonas putida</i>	<i>Proteus vulgaris</i> <i>Enterobacter cloacae complex</i>

Figura 1: Distribuição geográfica das albufeiras.

Na figura, as barragens estão identificadas por números: 1 – Barragem do Monte da Rocha 2 – Barragem do Roxo 3 – Barragem do Alvito 4 – Barragem de Odivelas

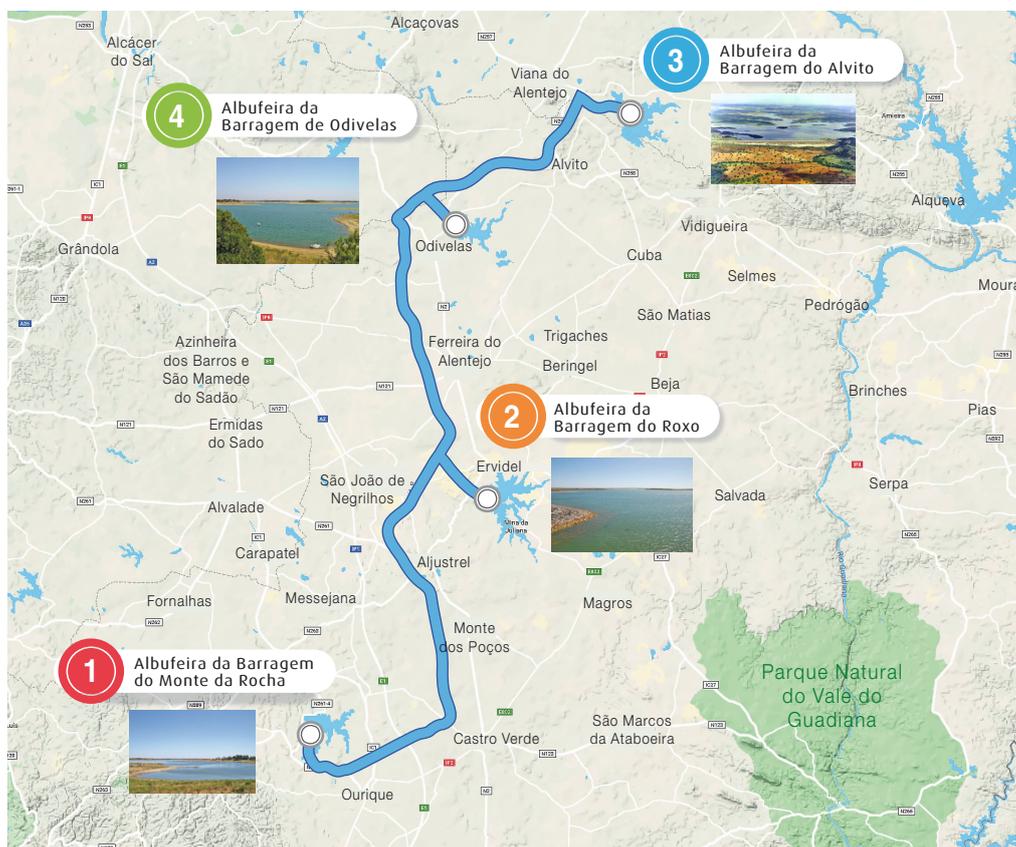


Figura 2: Micrografia de sedimento colhido na barragem do Roxo (2).

O sedimento foi observado por microscopia eletrónica de varrimento tendo sido identificadas espécies de diversos grupos fitoplanctónicos. A barra da escala corresponde a 10 µm.

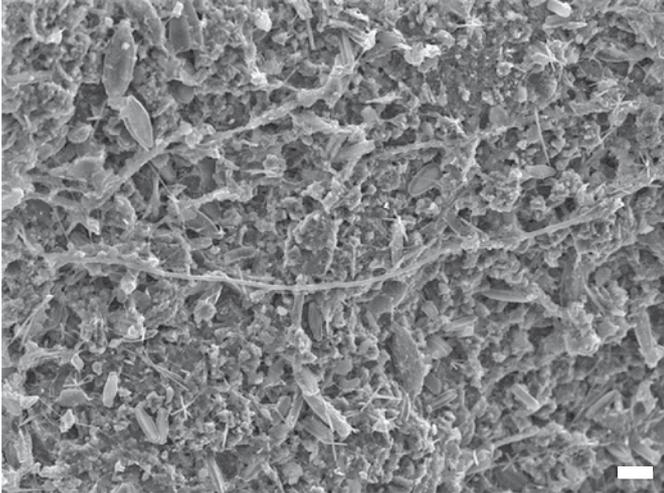


Figura 3: Imagem do local onde foi efetuada a colheita na barragem de Odivelas (4).

Na fotografia é visível um peixe em estado de decomposição avançada.



De seguida, tentamos relacionar a flora bacteriana presente nas amostras das diferentes barragens com outras características dos ecossistemas nomeadamente com existência de ligação entre as barragens. Como referido anteriormente, este estudo foi realizado em julho de 2016, menos de um

mês após a abertura da ligação à albufeira da barragem do Alqueva. Esta ligação é efetuada pela barragem 3, que por sua vez, está ligada à barragem 2 (3).

Ambas as barragens (2 e 3) são utilizadas para apoio à atividade agrícola e abastecimento, sendo que na barragem 3 é possível realizar atividades náuticas e recreativas. A ausência de microrganismos indicadores de contaminação fecal nas amostras analisadas foi um aspeto importante em termos de avaliação de risco. Contudo, existem alguns microrganismos identificados em ambas as barragens que são potencialmente patogénicos para o Homem (6,7). A *Aeromonas sobria*, isolada na barragem 2, faz parte da flora intestinal dos peixes e é responsável por infeções gastrointestinais no Homem, em populações imunodeprimidas (8,9). A presença de bactérias do género *Pseudomonas* e *Enterobacter* nas amostras da barragem 3 e 2, respetivamente, também captou a nossa atenção porque algumas espécies destes géneros são responsáveis por infeções associadas aos cuidados de saúde (10,11).

Na barragem 1 foram identificados microrganismos tipicamente associadas à colonização/infeção nos peixes (água) e distúrbios gastrointestinais no Homem. No biofilme realçamos a presença de *Acinetobacter baumani complex* que apresenta um risco para o consumo humano uma vez que é uma bactéria que está associada a infeções na pele e trato respiratório (8,9). A capacidade de formarem biofilme é também um fator que lhes confere maior resistência a fatores de stress, como por exemplo agentes antimicrobianos. Assim, a utilização desta água para fins de rega e/ou banhar pode constituir um problema para a saúde uma vez que o contacto com os microrganismos presentes na água pode causar infeções quer através da contaminação de produtos agrícolas que são consumidos sem serem cozinhados (ex: alfaces) quer através do contacto direto com o Homem (ingestão e contacto com a pele e mucosas). Por outro lado, como está prevista a ligação entre as barragens 1 e 2, tal poderá permitir a disseminação das bactérias da barragem 1 para a barragem 2 uma vez que o sentido da corrente seria de Sul para Norte (característica do rio Sado). Se a premissa se confirmar, a barragem 2 que é considerada uma barragem “protegida” apresentando muitas restrições de uso (pesca,

banhos, navegação recreativa), poderia registar um decréscimo na qualidade da água armazenada na albufeira (3).

As amostras (água e biofilmes) onde se verificou uma maior diversidade bacteriana foram as da barragem 4. Este facto poderá, em parte, estar associado à presença de peixes mortos nesta albufeira (figura 3) uma vez que as espécies bacterianas isoladas, nomeadamente *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas putida* e *Stenotrophomonas maltophilia*, estão associadas à putrefação e degradação de peixes (12). A identificação do coliforme fecal *Citrobacter freundii*, habitualmente presentes no trato intestinal dos animais, indicia a contaminação com matéria fecal recente. A presença de *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus vulgaris* associados a diversas infeções no Homem desaconselha igualmente o contacto com esta água (13,14). A monitorização periódica da qualidade desta água seria importante em termos de saúde pública, uma vez que esta área é usada para fins recreativos nomeadamente como praia fluvial.

Seria interessante e benéfico fazer um estudo posterior para verificar se ocorreu permuta de microrganismos entre as barragens ligadas entre si. Uma vez que a ligação no momento deste estudo era recente, não teria ainda ocorrido uma transferência significativa entre os vários ecossistemas o que se traduziu numa grande diversidade microbiológica entre as barragens que se encontram ligadas (2 e 3). Se este estudo fosse efetuado, seria de esperar uma maior homogeneidade na população bacteriana dos dois corpos de água.

Conclusão

Este trabalho contribuiu para aumentar o conhecimento relativamente aos ecossistemas estudados.

A caracterização da flora microbiana permitiu identificar a presença de bactérias potencialmente patogénicas para o Homem que não são alvo de pesquisa dedicada de acordo com a legislação em vigor em Portugal. A presença destas bactérias permite inferir sobre potenciais riscos para a saúde e recomendar uma monitorização periódica como forma de os minimizar e a inclusão de pesquisas dedicadas entre os parâmetros de análise como sucede noutros países (p. e. pesquisa de *Aeromonas* nos EUA).

Referências bibliográficas:

- (1) Cabral JP, (2010), Water microbiology. *Bacterial pathogens and water*, *Int J Environ Res Public Health*, 7(10):3657-703.
- (2) Agência Portuguesa do Ambiente, (2016), Plano de Gestão de Região Hidrográfica 2016/2021 Região Hidrográfica do Sado e Mira https://ambiente.pt/_zdata/Políticas/Agua/PlaneamentoGestao/PGRH/2016-2021/PTRH6/PGRH6_Parte2.pdf
- (3) Município de Aljustrel, (2019) <http://www.mun-aljustrel.pt/menu/526/barragem-do-roxo.aspx>
- (4) Fernandes V, Paulino S, Costa C, Rodrigues J, Reis L, Nogueira I, Carvalho P, Duarte A e Jordão L, (2015), Avaliação do risco para a saúde pública resultante do contacto com águas recreativas e ornamentais, *Observações_Boletim Epidemiológico* 13, 26-29
- (5) Bandeira M, Borges V, Gomes JP, Duarte A and Jordao L, (2017), Insights on *Klebsiella pneumoniae* biofilms assembled on different surfaces using phenotypic and genotypic approaches, *Pathogens* 3: 720-731; doi:10.3390/pathogens3030720.
- (6) Trust TJ, Bartlett KH, (1974), Occurrence of potential pathogens in water containing ornamental fishes, *Appl. Microbiol* 28, 35-40.
- (7) Smith KF, Schmidt V, Rosen GE, Amaral-Zettler L, (2012), Microbial diversity and potential pathogens in ornamental fish aquarium water, *PLoS ONE* 7, e39971.
- (8) Chopra AK, Houston CW, (1999), Enterotoxins in *Aeromonas*-associated gastroenteritis, *Microbes Infect* 1, 1129-1137.
- (9) Ghenghesh KS Ahmed SF, Cappuccinelli P, Klena JD, (2014), Genospecies and virulence factors of *Aeromonas* species in different sources in a North African country, *Libyan. J. Med*, 9, 25497-25502.
- (10) Kim SE, Park SH, Park HB, Park KH, Kim SH, Jung SI, Shin JH, Jang HC, Kang SJ, (2012), Nosocomial *Pseudomonas putida* Bacteremia: High Rates of Carbapenem Resistance and Mortality, *Chonnam Med J*, 48(2):91-5. doi: 10.4068/cmj.2012.48.2.91.
- (11) 1Davin-Regli A, Pagès JM, (2015), *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment, *Front Microbiol*, 18;6:392. doi: 10.3389/fmicb.2015.00392. eCollection.
- (12) Houicher A, Kuley E, Bendeddouche B and Ozogui F, (2013), Histamine and tyramine production by bacteria isolated from spoiled sardine (*Sardina pilchardus*), *Academic Journals* 12: 3290.
- (13) Peleg AY, Hooper DC, (2010), Hospital-Acquired Infections Due to Gram-Negative Bacteria. *N. Engl. J. Med.*, 362, 180421813.
- (14) Drzewiecka D, (2016), Significance and Roles of *Proteus* spp. Bacteria in Natural Environments, *Microb Ecol.*, 72(4):741-758.