



Espécies exóticas em lagos ornamentais: adorno ou fonte de desequilíbrio?

Maria Nascimento¹, Sérgio Paulino², Sónia Faria^{2,3},
Manuela Cano², Nuno Rosa², João Carlos Rodrigues³,
Lúcia Reis³, Luísa Jordão²

maria.jordao@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Engenharia Química e Biológica, Instituto Superior de Engenharia de Coimbra.

(2) Departamento de Saúde Ambiental, INSA.

(3) Departamento de Doenças Infecciosas, INSA.

_Introdução

Os lagos ornamentais presentes em espaços lúdicos são fundamentais para o equilíbrio nos meios urbanos. Contudo, os microrganismos que neles habitam podem representar uma ameaça para a saúde dos que usufruem destes espaços. O microbioma destes equipamentos urbanos é profundamente afetado pelo seu uso inadequado pelo Homem (deposição de lixo doméstico) e pelos animais que neles habitam ou usufruem.

A população de microrganismos na água pode ainda ser afetada pelas alterações climáticas. Estas alterações macros são alvo de muitos estudos devido ao reconhecido aumento das temperaturas registadas que, entre outros efeitos, promovem a proliferação das populações microbianas (1). Contudo, pequenas alterações, aparentemente inócuas, derivadas da ação do Homem nos ecossistemas podem ter consequências preocupantes. O fenómeno da globalização que contribuiu para o desenvolvimento económico e social também promoveu o intercâmbio de espécies indígenas. Este fenómeno levou à introdução de espécies originárias de uma determinada região (espécies indígenas) em locais onde nunca chegariam naturalmente sendo aí consideradas espécies exóticas.

Em Portugal, foram registados vários casos de introdução de espécies exóticas que alteraram o equilíbrio do ecossistema onde foram inseridas. O achigã é o exemplo dum animal exótico que foi introduzido em rios, lagoas e outros sistemas de água doce. Como este peixe é predador contribui para a diminuição de pequenas espécies nativas alterando o equilíbrio do ecossistema (2). Este fenómeno também foi observado no reino vegetal. O jacinto-de-água

sendo uma planta de crescimento rápido forma tapetes que podem cobrir totalmente a superfície dos cursos de água onde é introduzido. Este fenómeno contribui para a diminuição da qualidade da água e aumento da eutrofização. Para além destes existem muitos outros exemplos de introdução acidental ou consciente sem intenção danosa que originam graves desequilíbrios ambientais (3).

_Objetivo

Este trabalho teve como objetivo analisar a evolução sazonal da população de microrganismos dum lago ornamental da região de Lisboa.

_Metodologia

Amostragem

As amostras foram recolhidas num lago ornamental da região de Lisboa. A recolha foi efetuada num frasco estéril (100 mL) ou com zaragoatas estéreis numa área de 10 cm² para análise da água ou do biofilme, respetivamente. O acondicionamento e transporte da amostra foi efetuado como descrito anteriormente por Fernandes e colegas (4).

Caraterização dos microrganismos presentes na amostra

O ensaio para o isolamento e identificação das bactérias foi efetuado conforme descrito por Fernandes e colegas (4) com uma alteração. O meio Drigalsky foi substituído por CLED.

Para os fungos após incubação durante 4-5 dias a 25°C em agar de extrato de malte (MEA), foi retirada uma porção da colónia contendo um pouco de agar, utilizando uma lanceta e uma agulha devidamente esterilizadas, tendo o cuidado de selecionar zonas em diferentes estádios de desenvolvimento. Esta foi colocada numa lâmina de vidro sobre uma gota de azul de lactofenol, as hifas foram cuidadosamente separadas das estruturas formadoras de esporos, os conidióforos, e o conjunto foi coberto com uma lamela. A preparação foi observada num microscópio ótico com ampliações que oscilaram entre as 100 e as 1000 vezes. As colónias de fungos foram identificadas com base nas suas características macro (cor, textura, aspeto, tipo de crescimento, etc.) e microscópicas, utilizando como orientação manuais de micologia (5,6).

A análise da população fitoplanctónica presente no lago foi realizada como descrito anteriormente (4).

Ensaio de formação de biofilmes

O ensaio foi realizado para as estirpes encontradas no biofilme conforme descrito por Bandeira e colegas (7). A capacidade das diferentes bactérias formarem biofilmes isoladamente ou em conjunto foi avaliada a 25°C e 37°C.

Preparação de amostras para microscopia eletrónica de varrimento

Para análise do fitoplâncton por microscopia eletrónica de varrimento (SEM) 10 mL da amostra de água foram centrifugados a 1500 rpm durante 10 minutos. Após ter sido ressuscitado em aproximadamente 200 µl de água o sedimento foi transferido para um porta-amostra previamente revestido com fita de carbono e deixado a secar à temperatura ambiente. No caso dos fungos uma parte da colónia cultivada em MEA foi transferida com o auxílio duma pinça para um porta-amostra revestido com fita de carbono. As amostras foram analisadas num SEM de baixo vácuo (Phenom).

_Resultados e discussão

Inicialmente o objetivo deste estudo era analisar o impacto das estações do ano na flora dos lagos dum parque de Lisboa. O primeiro lago a ser analisado tinha revelado na colheita de inverno (fevereiro) a existência duma população bacteriana constituída por *Klebsiella pneumoniae ozaenae*, *Pastorella* e *Shigella* não tendo sido deteta-

dos nem fungos nem leveduras. Na colheita de água realizada em maio estes resultados apresentaram alterações significativas. No meio não seletivo, independentemente da temperatura de incubação, foi sempre detetado um número incontável de microrganismos (> 300 unidades formadoras de colónias- UFC). As UFC presentes a 30 e 37°C no meio CLED eram semelhantes tendo a sua identificação revelado a presença de *Enterobacter aerogenes* e *Aeromonas sobria*. No grupo das bactérias foi ainda identificado a partir do meio não seletivo incubado a 44°C uma bactéria do género *Bacillus*. Ao contrário do registado na colheita de inverno desta vez a *Klebsiella pneumoniae* estava ausente, foram detetados fungos dos géneros *Fusarium* e *Penicillium* e uma levedura (*Rhodotorula* sp). Na figura 1A é apresentada uma cultura de *Penicillium* e na figura 1B um pormenor do mesmo obtido por SEM.

De seguida resolvemos caracterizar a flora microbiana presente no biofilme do lago. Desta forma pretendemos verificar se as alterações registadas na população planctónica se refletiam também nos biofilmes. Tanto os dois géneros de fungos como as *Aeromonas* presentes na água foram identificados no biofilme. Adicionalmente, foi também identificado um coco-bacilos Gram-negativo o *Chromobacterium violaceum*. No caso das *Aeromonas* foram

Figura 1: Fungo do género *Penicillium* isolado numa amostra de água ornamental realizada em maio. Cultura do fungo em agar de extrato de malte (A) e um pormenor obtido por SEM (B).



artigos breves_ n. 7

encontradas duas espécies *Aeromonas veroni*, também presente na água, e *Aeromonas sobria*. Estes resultados levantaram várias questões. A primeira seria se a ocorrência de temperaturas atipicamente elevadas durante o mês de maio, características dos meses de verão, poderiam justificar esta alteração da flora microbiana por si só. O predomínio da população de *Aeromonas* tipicamente associadas à colonização/ infecção de peixes (8) sugeria a existência de outros fatores. No período de tempo que separou as duas colheitas foi introduzida neste lago uma população de carpas Koi originárias do Japão. A introdução de espécies exóticas, e por arrasto dos microrganismos que as colonizam, pode alterar de forma significativa o equilíbrio do ecossistema. Assim, a alteração da população microbiana do lago pode não ser devida unicamente à transição das estações do ano mas também à introdução das carpas Koi.

O próximo passo consistiu no estudo da cinética de formação do biofilme bacteriano. A análise da **tabela 1** mostra que as estirpes de *Aeromonas* apresentam uma maior capacidade de formação de biofilme do que o *C. violaceum*. De acordo com o observado para os biofilmes de *K. pneumoniae* presentes nas amostras de fevereiro todas as bactérias, com exceção do *C. violaceum*, apresentam maior capacidade de formação de biofilme a 25°C do que a 37°C. Esta observação indicia uma adaptação das bactérias às condições ambientais. O resultado observado para o *C. violaceum* poderá ser explicado pelas variações experimentais e pela sua menor apetência para formar biofilme. Uma vez que a partir das amostras de biofilmes foram isoladas várias bactérias tentamos mimetizar a formação dum biofilme misto em condições laboratoriais. Ao contrário do esperado a performance das bactérias individualmente, com exceção do *C. violaceum*, era melhor do que quando associadas. Este resultado sugere que ao nível ambien-

tal se pode observar um fenómeno semelhante ao observado nos biofilmes da cavidade oral. Neste caso existe uma divisão entre os microrganismos que iniciam a formação de biofilme e outros que se associam posteriormente (9). Assim, resolvemos mimetizar este fenómeno começando por deixar as várias espécies de *Aeromonas* formarem um biofilme maduro (aproximadamente durante 18h) tendo depois adicionado o *C. violaceum*. Os resultados preliminares obtidos demonstram que nos estadios iniciais (2, 4h) a associação com as *Aeromonas* facilita a formação de biofilme pelo *C. violaceum*. Contudo, estes resultados carecem de validação uma vez que teremos de demonstrar que o acréscimo de biomassa se deve apenas ao *C. violaceum*. Outro aspeto que também deverá ser investigado é o papel desempenhado pelos fungos na formação e persistência do biofilme.

Tabela 1: Avaliação da formação de biofilmes a diferentes temperaturas.

Bactérias	Formação de biofilme (OD _{570nm})	
	25°C	37°C
<i>A. sobria 1</i>	0,284 ± 0,06	0,155 ± 0,03
<i>C. violaceum</i>	0,017 ± 0,01	0,096 ± 0,05
<i>A. veronii</i>	0,761 ± 0,11	0,185 ± 0,004
<i>A. sobria 2</i>	0,756 ± 0,24	0,119 ± 0,09

A capacidade de formação de biofilme pelas bactérias foi avaliada após 24h de incubação a 25°C ou 37°C por um método espectralométrico.

O último aspeto estudado foi a evolução da população de fitoplâncton. Embora o estado trófico do lago se tenha mantido inalterado (eutrófico), o equilíbrio entre as populações existentes foi alterado (**tabela 2**). As populações de cianobactérias, clorófitas, criptófitas e dinoflagelados registaram um aumento tanto em densidade como

Grupos fitoplanctónicos	Densidade (células/mL)		Biovolume (mm ³ /L)	
	Fevereiro	Maio	Fevereiro	Maio
Cianobactérias	1357	567762	0,04	6,25
Carófitas	95	-	0,02	-
Clorófitas	2286	20333	2,44	2,44
Criptófitas	-	381	-	0,22
Diatomáceas	4143	2524	1,48	1,48
Dinoflagelados	71	762	1,85	1,85
Haptófitas	24	-	4,09x10 ⁻⁴	-
Total	7976	591762	5,84	12,25

Tabela 2: Análise da densidade e biovolume da população fitoplanctónica.

artigos breves_ n. 7

em diversidade. O fenómeno inverso, diminuição da população, foi observado para as carófitas e diatomáceas. As haptófitas não foram sequer detetadas na amostra colhida em maio. Na **figura 2** é apresentado um representante das diatomáceas o *Achnanthydium minutissimum*.

Figura 2: Microfotografia de *Achnanthydium minutissimum*, pertencente ao grupo das diatomáceas, obtida por SEM.



O aumento da população foi particularmente significativo para as cianobactérias (cerca de 78%). Algumas espécies de cianobactérias produzem florescências tóxicas que são mais frequentes durante o verão. A monitorização destes fenómenos durante as duas últimas décadas incidiu por imperativos legais sobre as microcistinas que são um dos grupos mais usuais de cianotoxinas. Uma vez que está descrita a acumulação de microcistinas ao nível do tecido dos peixes a introdução das carpas, o aproximar da estação quente e o aumento da população de cianobactérias conse-

lha a monitorização deste ecossistema para evitar eventuais problemas para a saúde dos que com ele interagem (10). Outro aspeto curioso foi a diminuição da densidade de microrganismos fitoplanctónicos associados à produção de compostos com atividade anti-fúngica, como por exemplo a clorófito *Chlamydomonas reinhardtii* (11), e o aparecimento de fungos e leveduras no lago.

Conclusão

Os resultados obtidos demonstram como uma pequena alteração pode ter impacto num ecossistema. A introdução duma espécie de peixes exóticos juntamente com a transição das estações do ano alterou profundamente o equilíbrio do ecossistema em estudo. Esta observação é um alerta para refletirmos sobre o modo como interagimos com o meio ambiente.

Referências bibliográficas:

- (1) World Health Organization. Climate change and health [Em linha]. Fact sheet n° 266. Rev. Aug. 2014. [consult. 15/7/2015] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs266/en/>
- (2) Ribeiro F, Collares-Pereira MJ. Life-history variability of non-native centrarchids in regulated river systems of the lower River Guadiana drainage (south-west Iberian Peninsula). *J Fish Biol.* 2010;76(3):522-37.
- (3) de Almeida JD, Freitas H. Exotic naturalized flora of continental Portugal: a reassessment. *Botanica Complutensis.* 2006;30:117-30. <http://revistas.ucm.es/index.php/BOCM/article/view/BOCM0606110117A/6271>
- (4) Fernandes V, Paulino S, Costa C, et al. Avaliação do risco para a saúde pública resultante do contacto com águas recreativas e ornamentais. *Boletim Epidemiológico Observações.* 2015 abril-junho;4(12):7-11. <http://hdl.handle.net/10400.18/3031>
- (5) Samson RA, Houbakken J, Thrane U, et al. (eds). *Order Food and Indoor Fungi.* Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) Fungal Biodiversity Centre, 2010. (CBS Laboratory Manual Series 2).
- (6) Larone D H. *Medically important fungi: a guide to identification.* 2nd. ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1993.
- (7) Bandeira M, Carvalho PA, Duarte A, et al. Exploring Dangerous Connections between *Klebsiella pneumoniae* Biofilms and Healthcare-Associated Infections. *Pathogens.* 2014 ;3(3):720-31. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4243437/>
- (8) Zhou QL, Wang YJ, Xie J, et al. Distribution and virulence gene comparison of *Aeromonas* strains isolated from diseased fish and water environment. *Pol J Microbiol.* 2013;62(3):299-302. <http://www.pjm.microbiology.pl/archive/vol6232013299.pdf>
- (9) Tabenski L, Maisch T, Santarelli F, et al. Individual growth detection of bacterial species in an in vitro oral polymicrobial biofilm model. *Arch Microbiol.* 2014;196(11):819-28.
- (10) Ni W, Zhang J, Luo Y. Microcystin accumulation in bighead carp (*Aristichthys nobilis*) during a *Microcystis*-dominated bloom and risk assessment of the dietary intake in a fish pond in China. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2015 Jul 8. Doi 10.1007/s11356-015-4974-9. [Epub ahead of print].
- (11) Amaro HM, Guedes AC, Malcata FX. Antimicrobial activities of microalgae: an invited review. In: Mendez-Vilas A. (ed.). *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances.* Badajoz: Formatex Research Center, 2011, pp. 1272-80. (Microbiology book series; 3). <http://www.formatex.info/microbiology3/book/1272-1284.pdf>