



Avaliação do risco para a saúde pública resultante do contacto com águas recreativas e ornamentais

Vera Fernandes¹, Sérgio Paulino², Clélia Costa², João Carlos Rodrigues³, Lúcia Reis³, Isabel Nogueira⁴, Patricia Carvalho⁴, Aida Duarte⁵, Luísa Jordão²

maria.jordao@insa.min-saude.pt

(1) Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

(2) Departamento de Saúde Ambiental, INSA.

(3) Departamento de Doenças Infecciosas, INSA.

(4) Avaliação Externa da Qualidade, Departamento de Epidemiologia, INSA.

(5) Departamento de Microbiologia e Imunologia/ iMed.UL. Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa.

Introdução

A água é fundamental para a vida. Contudo, esta fonte de vida, quando não é devidamente tratada, pode veicular microrganismos responsáveis por doenças potencialmente letais como a cólera e a febre tifoide (1). Os perigos decorrentes do contacto com microrganismos patogénicos não estão limitados às águas de consumo. O contacto com águas recreativas no ambiente natural (rios, praias) e humanizado (piscinas) também apresenta riscos.

Nos últimos anos o número de casos de infeções relacionadas com este tipo de águas tem aumentado. Não se sabe contudo se tal deriva dum melhor sistema de comunicação dos casos ocorridos ou dum aumento da virulência dos microrganismos ambientais. A este último aspeto está intimamente associado o aumento do uso de antibióticos no tratamento de animais e na agricultura com a consequente disseminação no meio ambiente (2). Este processo permite a seleção de estirpes resistentes a antibióticos. Por outro lado, a capacidade dos microrganismos se associarem em comunidades denominadas por biofilmes poderá potenciar este processo. A caracterização da flora bacteriana e fitoplantónica existente em águas recreativas e ornamentais é por estas razões importante.

Objetivos

Este trabalho teve como objetivo caracterizar a população de microrganismos presente em águas recreativas (piscinas) e ornamentais (lagos), bem como avaliar o risco para a saúde pública do contacto com as mesmas.

Metodologia

Amostragem: as amostragens decorreram na região de Lisboa em 7 piscinas e 4 lagos dum parque entre dezembro 2014 e fevereiro de 2015. As amostras foram recolhidas em frascos esterilizados de 1 L de capacidade, na ausência (lagos) ou presença de tiosulfato de sódio (piscinas). Para a pesquisa de biofilmes foram efetuadas amostras numa área de 10 cm² com o auxílio duma zaragatoa estéril em dez superfícies de piscinas e de dois lagos. A zaragatoa foi transportada em tubo estéril contendo 10 mL de tampão fosfato. As amostras foram transportadas ao abrigo da luz e conservadas a 5 °C até serem processadas. O tempo de armazenagem nunca foi superior a 24 h.

Isolamento e identificação de bactérias: as amostras foram processadas pelo método de filtração através duma membrana com poro de 0,45 µm. O volume filtrado variou de acordo com o tipo de amostra e microrganismo pesquisado. Nas águas de piscinas e lagos foram filtrados 1000 mL e 100 mL, respetivamente, para a pesquisa de micobactérias não tuberculosas (MNT). Para os restantes microrganismos, independentemente da amostra, foram filtrados 10 mL.

No caso das MNTs as membranas foram transferidas para tubos falcon contendo 10 mL de PBS. A dispersão dos microorganismos presentes na membrana e/ou zaragatoa (biofilme) foi assegurada por agitação num vortex e sonicação num banho de ultra-sons. A amostra foi descontaminada por adição de Mycoprep de acordo com as indicações do fabricante. Os sedimentos obtidos após centrifugação a 3800 g durante 30 minutos foram suspensos em PBS, semeados em duplicado em meio de Lowenstein Jensen e incubados a 30, 37 e 42 °C durante pelo menos 3 semanas.

Para o isolamento dos restantes microrganismos, as membranas filtrantes foram colocadas à superfície de meios gelosados não seletivos como Plate Count Agar (PCA) e meios gelosados seletivos para as leveduras e fungos filamentosos como Sabouraud; para bacilos de Gram negativo Drigalsky, Violet Red Bile Agar (VRBA), Cetrimida (*Pseudomonas* spp.) e Mannitol salt agar (*Staphylococcus* spp.) Os meios de cultura foram incubados a diferentes temperaturas de 30, 37 e 44 °C durante 24 e 48 horas para as bactérias e leveduras e até 5 dias para os fungos.

A identificação dos isolados foi efetuada por sistemas automatizados API20E para as enterobactérias e VITEK para as bactérias não fermentadoras.



artigos breves_ n. 2

Estudo da susceptibilidade aos antibióticos: este ensaio foi efetuado pelo método de difusão em meio Mueller Hinton agar com discos dos seguintes antibióticos: associação de amoxicilina com ácido clavulânico (AMC), cefoxitina (FOX), ceftazidima (CAZ), cefotaxima (CTX), imipenemo (IPM), gentamicin (GM) e ciprofloxacina (CIP). Após incubação a 37 °C durante 24 h, a leitura e a interpretação dos halos foi feita de acordo com as normas EUCAST (3).

Determinação da concentração mínima inibitória das formas planctónicas e biofilmes de *K. pneumoniae*: este ensaio foi realizado apenas para a amoxicilina. A gama de concentrações usadas variou entre 0,98 e 500 µg/mL. Os ensaios foram realizados como descrito anteriormente (4).

Ensaio de formação de biofilmes: o ensaio foi realizado para as quatro estirpes de *K. pneumoniae* isoladas conforme descrito por Bandeira e colegas (4). As temperaturas de incubação usadas foram 25 °C e 37 °C.

Preparação de amostras para microscopia eletrónica de varrimento: a formação dos biofilmes foi seguida em dois materiais diferentes, vidro e massa de cimento, previamente esterilizados, e colocados numa placa de cultura de células com 24 poços. A suspensão bacteriana foi preparada a partir de culturas em meio Mueller-Hinton agar após incubação durante 18 h a 37 °C, inoculada nos poços contendo Mueller-Hinton líquido e a placa foi incubada a 25 ou 37 °C durante 48 h. Após incubação, a lamela de vidro e o pedaço de massa de cimento foram lavados com água destilada estéril para remover as bactérias não aderentes. Os biofilmes foram transferidos para uma solução de PBS contendo 2,5 % de glutaraldeído e 0,05 % de vermelho de ruténio (solução de fixador) e conservados a 5 °C durante 18 h. O tratamento com ósmio e a restante preparação foram realizados como descrito anteriormente (4). As amostras foram observadas num microscópio eletrónico de varrimento JSM-7100F JEOL.

Análise da composição e abundância da comunidade fitoplancónica dos lagos: as amostras foram fixadas com uma solução de lugol de 0,5 % (v/v) e colocadas em câmaras de sedimentação, ao abrigo da luz e à temperatura ambiente, durante 24 h (5). Após esse período procedeu-se à sua análise quantitativa num microscópio invertido, de acordo com o método descrito por Utermöhl (6).

_Resultados e discussão

O primeiro passo deste estudo consistiu na caracterização da flora bacteriana presente nas piscinas e lagos. Em nenhuma das amostras analisadas foi detetada a presença de MNT. Nas piscinas, quer na água quer nas superfícies, não foram encontradas unidades formadoras de colónias (UFC) tanto para bactérias como leveduras/fungos. No caso dos lagos também não foram encontradas UFC para leveduras/fungos; no entanto, no meio não seletivo para bactérias (PCA) foi encontrado um número incontável de UFC (> 300/10 mL). Nos meios seletivos para *Staphylococcus* spp. e *Pseudomonas* spp. não foram detetadas colónias. Nos restantes meios, tanto nos incubados a 37 como a 44 °C, foram detetadas colónias identificadas maioritariamente entre as espécies da família das Enterobactérias, nomeadamente: *Klebsiella pneumoniae*, *K. pneumoniae* variedade *ozaenae*, *Enterobacter* spp., *Serratia marcescens*, *S. rubidea* e *S. odorífera*. Entre as bactérias não fermentadoras e oxidase positiva foram identificadas as espécies *Elizabethkingia meningoseptica*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Vibrio metschnikovii*.

A presença de *K. pneumoniae* reteve a nossa atenção por esta bactéria ser considerada um dos principais agentes etiológicos de infeções nosocomiais, e apresentar elevadas taxas de resistência aos antimicrobianos (7). A capacidade de formar biofilmes foi descrita pela primeira vez para a *K. pneumoniae* na década de 1980, tendo sido posteriormente associada à persistência em determinados ambientes, como o hospitalar, e à resistência aos antimicrobianos (4, 8, 9). Por estas razões a capacidade de formar biofilmes é atualmente considerada como um fator de virulência. Assim, nos lagos onde foi isolada *K. pneumoniae* foi realizada a colheita de amostras de biofilme. Tal como se verificou para as águas dos lagos as enterobactérias estavam presentes em maioria. A *K. pneumoniae* (Kp4) foi identificada apenas no biofilme do lago 2.

O próximo passo consistiu na caracterização das 4 estirpes de *K. pneumoniae* isoladas do ambiente na forma planctónica (Kp 1, Kp2 e Kp3) e em biofilme (Kp4). Os resultados obtidos são apresentados na **tabela 1**. A avaliação da capacidade de formação de biofilmes foi um dos primeiros parâmetros avaliados. Uma vez que estas bactérias foram isoladas de amostras ambientais e se pretende inferir a sua capacidade de colonizar o Homem, os ensaios foram conduzidos a 25 °C e 37 °C,

Tabela 1: Estirpes de *K. pneumoniae* isoladas de lagos.

ID	Local de isolamento	Formação de biofilme (OD570nm)		Antibiograma (mm)							CMI AMX (µg/ml)	
		25°C	37°C	AMC	FOX	CAZ	CTX	IPM	GM	CIP	Plant	Biof
Kp1	Lago 1	0,240	0,153	18	28	>30	>30	>30	24	>30	7,81	62,5
Kp2	Lago 2	0,076	-	6	20	25	30	25	18	28	0,98	125
Kp3	Lago 2	0,740	0,256	6	24	>30	>30	22	18	>30	500	>500
Kp4	Biofilme Lago 2	1,159	0,285	6	6	25	29	25	18	28	500	>500

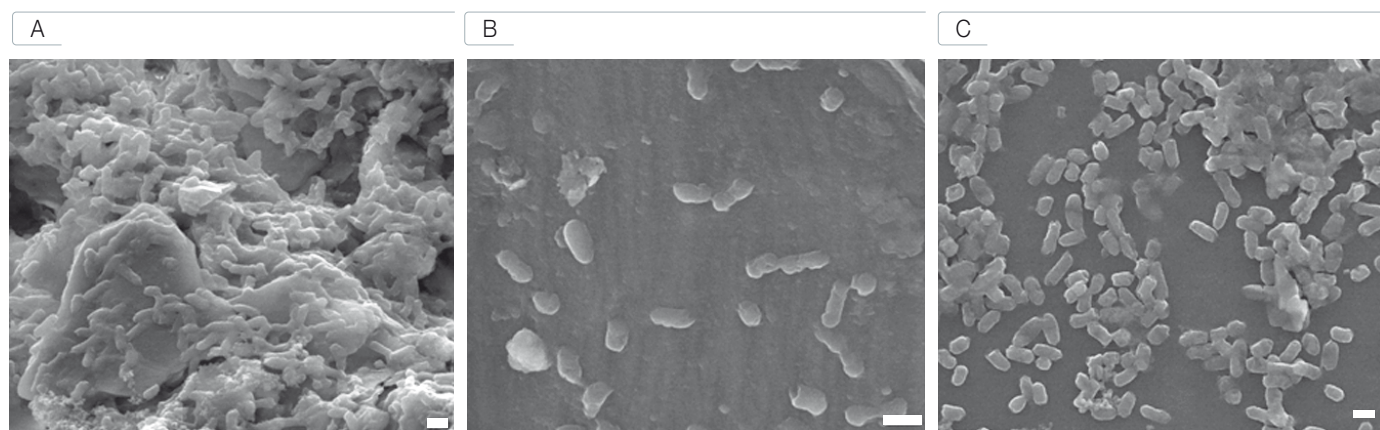
As abreviaturas Plant e Biof referem-se às formas planctónicas e associadas em biofilmes, respetivamente, dos isolados bacterianos. Os antibióticos testados foram a associação de amoxicilina com ácido clavulânico (AMC), cefoxitina (FOX), ceftazidima (CAZ), cefotaxima (CTX), imipenemo (IPM), gentamicina (GM), AMX (amoxicilina) e ciprofloxacina (CIP).

respetivamente. Embora todos os isolados tenham demonstrado capacidade de formar biofilmes a 25 °C, a estirpe Kp4 destacou-se das restantes. A 37 °C, a formação de biofilmes é menor para todos os isolados estando mesmo ausente na Kp2. Este resultado demonstra uma adaptação dos isolados às condições ambientais e simultaneamente uma baixa apetência para persistir a 37 °C, o que pode indicar uma menor capacidade de colonização no Homem.

A adaptação às condições ambientais foi ainda realçada pela observação dos biofilmes da Kp4 formados em diferentes condições por microscopia eletrónica de varrimento (figura 1). Os biofilmes mais exuberantes e bem organizados foram observados no material de revestimento do Lago 2 (massa de cimento) a 25 °C (figura 1A).

No entanto, o número de bactérias aderentes à superfície diminuiu drasticamente (figura 1 B), para a mesma superfície, incubada a 37 °C. Esta observação sugere que embora a bactéria retenha a capacidade de formar biofilme (tabela 1) o processo decorre mais lentamente, sendo necessário um período de adaptação mais longo. O biofilme formado sobre a lamela de vidro a 25 °C (figura 1C) está num estado de desenvolvimento superior ao formado no material da superfície do lago a 37 °C. A comparação dos biofilmes formados sobre lamelas de vidro a 25 e 37 °C demonstrou que os primeiros são mais maduros que os segundos. Podemos concluir que a temperatura de incubação parece desempenhar um papel mais relevante do que a superfície à qual as bactérias aderem, como se pode constatar por comparação das figuras 1B e C.

Figura 1: Biofilmes de *K. pneumoniae*.



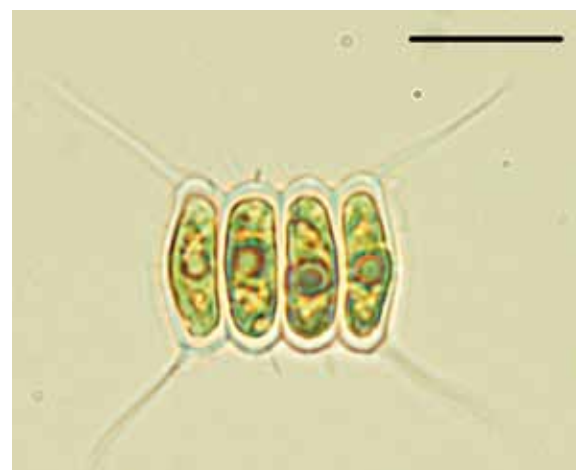
A capacidade da Kp4 isolada sob a forma de biofilme do lago 2 foi avaliada *in vitro* em diferentes superfícies e temperaturas de incubação. As condições que melhor mimetizam as encontradas no ambiente em termos de superfície (revestimento do lago) e temperatura (25 °C) correspondem às que permitem observar um biofilme mais diferenciado ao fim de 48 h (A). A manutenção da superfície com alteração da temperatura para 37 °C (B) ou a manutenção da temperatura com alteração da superfície (C) provocaram uma significativa alteração da formação de biofilmes. A barra de escala corresponde em todas as imagens a 1 µm.

Sendo a resistência aos antibióticos um problema preocupante em saúde pública, ainda mais quando associado à formação de biofilmes, resolvemos determinar a susceptibilidade aos antibióticos das estirpes de Kp. Contrariamente ao que ocorre nas estirpes clínicas, normalmente multirresistentes, as estirpes ambientais eram sensíveis às três classes de antibióticos: β -lactâmicos (cefalosporinas e carbapenemos), aminoglicosídeos (gentamicina) e quinolonas (ciprofloxacina). Este resultado não nos permite classificar estas bactérias como multirresistentes. Como tal, foi apenas avaliado o efeito da formação de biofilmes na resistência à amoxicilina. Os resultados obtidos para a concentração mínima inibitória (CMI) das formas planctónicas e organizadas em biofilme são apresentadas na **tabela 1**. Os isolados Kp3 e 4 apresentam valores de CMI (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) significativamente mais elevados do que os apresentados por Kp2 (0,98 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e Kp3 (7,81 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Estes resultados permitiram-nos formular a hipótese de que Kp3 e Kp4 poderão corresponder a bactérias derivadas dum mesmo biofilme, inclusive poderá ter sido libertada por dispersão do biofilme, onde se encontrava a Kp4, uma vez que ambos foram isolados do mesmo lago. Este aspecto está atualmente a ser explorado no laboratório. A comparação das CMI obtidas para a forma planctónica e respetivo biofilme permitem-nos concluir que a formação de biofilmes aumenta significativamente a resistência aos antibióticos. Este resultado está em concordância com um estudo recente realizado pelo nosso grupo com estirpes de *K. pneumoniae* responsáveis por infeções nosocomiais (4). Como tal podemos concluir que este fenómeno é transversal às estirpes de *K. pneumoniae*, independentemente da sua origem.

A análise da comunidade biológica existente no ecossistema destes dois lagos ficaria contudo incompleta se não fosse analisada a comunidade de organismos fitoplanctónicos. O fitoplâncton é um componente da comunidade planctónica composto por microrganismos unicelulares, solitários ou coloniais, com capacidade fotosintética, que vivem em suspensão na zona eufótica da coluna de água. Nesta comunidade existem alguns membros com reconhecida capacidade para provocarem patologias em humanos. As cianobactérias são as mais conhecidas, devido à capacidade de algumas espécies poderem formar densas florescências potencialmente tóxicas para o Homem (10), contudo algumas clorófitas do género

Desmodesmus (figura 2) podem também provocar infeções oportunistas associadas a traumatismos (11, 12). No último caso, estes incidentes ocorreram em associação a infeções por *Staphylococcus* e *Klebsiella*, o que sugere uma estreita relação entre estes microrganismos. A população fitoplanctónica encontrada nos dois lagos é apresentada na **tabela 2**. Embora os dois lagos tenham valores de biovolume fitoplanctónico típicos de massas de água fortemente eutrofizadas, a abundância e diversidade da comunidade fitoplanctónica do lago 2 é claramente superior à do lago 1. Por outras palavras, a comunidade residente no lago onde foram isoladas estirpes de *Klebsiella* em biofilme é consideravelmente mais rica. Outro aspeto interessante foi a presença em ambos os lagos de microalgas, como por exemplo *Chlamydomonas reinhardtii* e *Oocystis* spp, para as quais está descrita a capacidade de produzirem substâncias com propriedades antibacteriana e antifúngicas (13). Tal poderá, explicar, pelo menos parcialmente, a ausência de fungos nas amostras recolhidas. A relação entre estas duas comunidades, microalgas e bactérias, não se limita a ser antagónica. Uma simbiose também é possível devido, por exemplo, à capacidade de bactérias como a *Klebsiella* fixarem azoto atmosférico e facultarem-no às microalgas sob a forma de compostos azotados. Adicionalmente, a mucilagem das microalgas poderá funcionar como reservatório destas bactérias.

Figura 2:  Colónia de *Desmodesmus armatus*.



Microfotografia de uma colónia de *Desmodesmus armatus* observada na amostra colhida no lago 2. A barra de escala corresponde a 10 μm .

Tabela 2: ↓ Densidade e biovolume da comunidade fitoplanctónica.

Grupos fitoplanctónicos	Lago 1		Lago 2	
	Densidade (células/mL)	Biovolume (mm ³ /L)	Densidade (células/mL)	Biovolume (mm ³ /L)
Cianobactérias	287381	1,68	1357	0,04
Carófitas	595	1,11	95	0,02
Clorófitas	212738	22,28	2286	0,98
Criptófitas	2500	5,43	–	–
Crisófitas	1667	0,78	–	–
Diatomáceas	6071	2,27	4143	3,45
Dinoflagelados	119	0,26	71	0,23
Haptófitas	–	–	24	4,09 x 10 ⁴
Totais	511071	33,81	7976	4,72

_Conclusões

Este estudo efetuado em isolados ambientais permitiu a confirmação de dados reportados em isolados clínicos, em que a formação de biofilmes aumenta significativamente a resistência aos antibióticos.

A ausência de leveduras e fungos filamentosos assim como a presença de bactérias implicadas em patologias infecciosas para o Homem, em águas com uma densidade microbiana tão elevada, permite inferir das interações entre os microrganismos e dos malefícios que podem advir quando se intervém no meio ambiente de um modo desordenado.

Em temas ambientais, a simbiose entre os microrganismos e o Homem deverá ser respeitada e os benefícios para a saúde do contacto com a natureza e a prática de atividade desportiva superam todos os riscos.

Referências bibliográficas:

- (1) Cabral JP. Water microbiology. Bacterial pathogens and water. *Int J Environ Res Public Health*. 2010;7(10):3657-703. [LINK](#)
- (2) Martinez JL. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environ Pollut*. 2009;157(11):2893-902.
- (3) The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 5.0, 2015. [LINK](#)
- (4) 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. [LINK](#)
- (5) Lund JWG, Kipling C, Le Cren ED. The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting. *Hydrobiologia*. 1958;11(2):143-170.
- (6) Utermöhl H. Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Mitt in Ver theor angew Limnol*. 1958;9:1-38.
- (7) European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report 2013. Reporting on 2011 surveillance data and 2012 epidemic intelligence data. Stockholm: ECDC, 2013. [LINK](#)
- (8) LeChevallier MW, Cawthon CD, Lee RG. Factors promoting survival of bacteria in chlorinated water supplies. *Appl Environ Microbiol*. 1988;54(3):649-54. [LINK](#)
- (9) Anderl JN, Franklin MJ, Stewart PS. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(7):1818-24. [LINK](#)
- (10) Cheung MY, Liang S, Lee J. Toxin-producing cyanobacteria in freshwater: a review of the problems, impact on drinking water safety, and efforts for protecting public health. *J Microbiol*. 2013;51(1):1-10.
- (11) Westblade LF, Ranganath S, Dunne WM Jr, et al. Infection with a chlorophyllous eukaryote after a traumatic freshwater injury. *N Engl J Med*. 2015;372(10):982-4. [LINK](#)
- (12) Yu J, Li Z, Brand JJ. Characterization of a green alga isolated from infected human external tissue. *Phycological Res*. 2009; 57: 251–258
- (13) Amaro HM, Guedes AC, Malcata FX. Antimicrobial activities of microalgae: an invited review. In: Méndez-Vilas A (ed). *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. Badajoz: FORMATEX, 2011, Vol 2, pp. 1272-80. [LINK](#)