



## Pesquisa de fatores de virulência em *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de águas minerais naturais

doi: 10.4136/ambi-agua.1359

Received: 07 Apr. 2014; Accepted: 24 May 2014

Aline Pereira Pedrosa\*; Marcelo Luiz Lima Brandão; Valéria de Mello Medeiros;  
Carla de Oliveira Rosas; Sílvia Maria Lopes Bricio;  
Antônio Eugênio Castro Cardoso Almeida

Fundação Oswaldo Cruz, (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde,  
Departamento de Microbiologia

\*Autor correspondente: e-mail: alinepp.nut@gmail.com,  
marcelollb\_8@hotmail.com, valeria.medeiros@incqs.fiocruz.br,  
carla.rosas@incqs.fiocruz.br, silvia.bricio@incqs.fiocruz.br,  
eugenio.almeida@incqs.fiocruz.br

### RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a formação de biofilme e o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas na avaliação da qualidade microbiológica de 80 amostras de águas minerais naturais comercializadas em garrações de 20 L. Foi realizada a quantificação de *P. aeruginosa* e enterococos; a pesquisa de coliformes totais, coliformes termotolerantes e de clostrídios sulfito redutores (CSR). A produção de biofilme de *P. aeruginosa* foi avaliada em caldo infusão cérebro-coração (BHI) e em água mineral natural estéril nas temperaturas de 25 e 35°C por 24 e 48 h. A avaliação da susceptibilidade a antimicrobianos foi realizada pelo teste de difusão em ágar (Kirby-Bauer). De 80 amostras analisadas, 40 (50%) apresentaram qualidade microbiológica insatisfatória segundo a RDC nº275/05. Trinta e oito (47,5%) amostras apresentaram *P. aeruginosa*, nove (11,2%) coliformes totais, quatro (5,0%) CSR e uma (1,2%) coliformes termotolerantes. Nenhuma amostra apresentou contaminação por enterococos. Dezesesseis cepas (51,6%) de *P. aeruginosa* foram classificadas como não aderentes ou fracamente aderentes, tanto no BHI quanto na água mineral. Contudo, cinco cepas (16,1%) apresentaram-se fortemente aderentes nas duas matrizes, principalmente no caldo BHI e na temperatura de 25°C. Cepas resistentes ou com resistência intermediária a antibióticos da classe dos aminoglicosídeos e/ou β-lactâmicos foram isoladas neste estudo. Concluiu-se que os isolados de *P. aeruginosa* foram capazes de produzir biofilme nas matrizes estudadas e apresentaram resistência a antimicrobianos. Metade das amostras apresentou qualidade microbiológica insatisfatória, principalmente devido à contaminação por *P. aeruginosa* (47,5%).

**Palavras-chave:** clostrídios sulfito redutores, coliformes, águas engarrafadas, biofilme, antimicrobianos.

## Assessment of virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from natural mineral water

### ABSTRACT

This study evaluated biofilm formation and antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolated to evaluate the microbiological quality of 80 natural mineral water samples sold in 20 L bottles. The quantity of *P. aeruginosa* and enterococci was assessed, including total coliforms, thermotolerant coliforms and sulfite-reducing clostridia (SRC). Biofilm production from *P. aeruginosa* was evaluated in brain heart infusion broth (BHI) and sterile natural mineral water at temperatures of 25 and 35°C for 24 and 48 h. Antimicrobial susceptibility tests were performed using the agar diffusion method (Kirby-Bauer). Of the 80 samples analyzed, 40 (50%) presented unsatisfactory microbiological quality according to RDC no. 275/05. Thirty-eight (47.5%) samples presented *P. aeruginosa*, nine (11.2%) total coliforms, four (5.0%) SRC and one (1.2%) thermotolerant coliform. Sixteen *P. aeruginosa* strains (51.6%) were classified as non-adherent or weakly adherent, both in BHI as in mineral water. However, five strains (16.1%) were strongly adherent in the two matrices, mainly in BHI at the temperature of 25°C. The study also isolated resistant or intermediate resistant strains to antibiotics of aminoglycosides and/or  $\beta$ -lactams classes. It was concluded that *P. aeruginosa* isolates were able to produce biofilm in the studied matrices and presented resistance to antimicrobials. Half of the samples presented unsatisfactory microbiological quality, mostly due to *P. aeruginosa* contamination.

**Keywords:** sulfite-reducing clostridia, coliforms, bottled water, biofilm, antimicrobials.

### 1. INTRODUÇÃO

A preocupação com a qualidade da água, decorrente da progressiva poluição hídrica, é um dos motivos que levam grande parte da população mundial ao consumo de água proveniente de fontes naturais (Leclerc e Moreau, 2002). A água mineral natural é obtida diretamente de fontes naturais ou por extração de águas subterrâneas, sendo caracterizada por um conteúdo definido e constante de determinados sais minerais, oligoelementos e outros constituintes considerando as flutuações naturais (Brasil, 2006). No Brasil, o consumo de águas minerais subiu de 16,6 bilhões de L em 2010 para 17,4 bilhões de L em 2012, sendo o quarto maior mercado consumidor de água engarrafada do mundo (Brasil, 2013a).

A água mineral natural deve apresentar qualidade que garanta ausência de risco à saúde do consumidor, devendo ser captada, processada e envasada obedecendo condições higiênico-sanitárias e as boas práticas de fabricação (BPF). No Brasil isto é regulamentado pela RDC n.º 173/2006, que dispõe sobre o Regulamento Técnico de Boas Práticas de fabricação para Industrialização e Comercialização de Água mineral Natural e Água Natural (Brasil, 2006).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, mais de 1,8 milhões de pessoas morrem anualmente devido a doenças transmitidas pela água (DTA), tornando as DTA a causa mais importante de morte no mundo (WHO, 2007). No Brasil, entre 2000 e abril de 2013 foram notificados 492 surtos ocasionados por água contaminada. Contudo, os dados disponibilizados não discriminam o tipo de água envolvido em cada surto (Brasil, 2013b).

Os potenciais contaminantes da água mineral incluem uma variedade de espécies saprófitas, tais como aeróbios mesófilos, coliformes, enterococos, *Pseudomonas* spp. e clostrídios sulfito redutores (CSR) (Kim e Feng, 2001). Dentre estes, *P. aeruginosa* é a bactéria mais comumente isolada em amostras de águas minerais naturais comercializadas em galões de 20 L no Brasil (Sant'Ana et al., 2003; Brandao et al., 2012).

*P. aeruginosa* é um patógeno oportunista que pode causar infecções urinárias, dermatites e uma grande variedade de infecções sistêmicas, principalmente em pacientes imunocomprometidos (Koneman et al., 2001). Esta espécie é um dos patógenos mais relevantes ligados à DTA (Wingender e Flemming, 2011) e é o pneumônio mais isolado em casos de infecções hospitalares, sendo uma bactéria de difícil controle devido a sua fácil disseminação pelo ambiente (Koneman et al., 2001).

A contaminação de *P. aeruginosa* em águas minerais naturais pode ocorrer devido à presença natural desta bactéria na flora da água retirada da fonte (Kim e Feng, 2001) ou devido à contaminação durante o processo de envase e engarrafamento, devido à característica de formação de biofilmes nas embalagens reutilizáveis e equipamentos da fábrica (Wingender e Flemming, 2011). Os biofilmes são formados por micro-organismos que crescem de forma agregada, geralmente em superfícies, embebidos em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) de sua própria origem que sua constituem a matriz (Yasuhiko et al., 2012).

*P. aeruginosa* consegue se reproduzir em água e outros ambientes com poucos nutrientes (Sant'ana et al., 2003) e possui a capacidade de adquirir resistência a múltiplos antimicrobianos (Koneman et al., 2001). O uso intensivo de antibióticos contribuiu para o aumento da seleção de bactérias resistentes, inclusive em ambientes aquáticos. Desta forma, estas bactérias podem representar um reservatório de resistência, bem como um meio para a propagação e evolução de genes de resistência (Baquero et al., 2008).

O objetivo deste estudo foi avaliar a formação de biofilme e o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos em cepas *P. aeruginosa* oriundas da avaliação da qualidade microbiológica de águas minerais naturais comercializadas em garrações de 20 L no Estado do Rio de Janeiro.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Amostras de água

Foram analisadas 80 amostras indicativas de água mineral natural, não gaseificada, comercializada em garrações retornáveis de 20 L, de 33 marcas distintas, codificadas de A até Z e de A' a G', entre os meses de agosto de 2012 a agosto de 2013, segundo os critérios preconizados pela RDC nº 275/2005 (Brasil, 2005). Foram analisadas 17 amostras da marca "U", seis amostras da marca "E", quatro das marcas "A, M, O e Z", três das marcas "G, J, C' e G'", duas das marcas "F, K, Q, Y, B' e D'" e uma das marcas "B, C, D, H, I, L, N, P, R, S, T, V, W, X, A', E' e F'". As amostras foram adquiridas e levadas ao laboratório e estocadas em temperatura ambiente até o momento da análise.

### 2.2. Metodologias de ensaio

A quantificação de *P. aeruginosa* e enterococos foi realizada pela técnica de tubos múltiplos para determinação do número mais provável (NMP) em 100 mL (APHA, 2012). Para pesquisa de coliformes totais e termotolerantes foi utilizado o método de presença-ausência (APHA, 2012). A pesquisa de CSR foi realizada pela técnica de enriquecimento em meio líquido (ISO, 1986).

### 2.3. Isolamento de *Pseudomonas aeruginosa*

Os tubos de caldo acetamida que apresentaram turvação foram semeados, pela técnica de esgotamento, em ágar cetrimide (Merck, Alemanha) e incubados a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 24-h. As placas foram observadas sob luz ultravioleta a 365 nm e foram selecionadas, de cada amostra, uma colônia isolada, verde e com produção de pigmento. As colônias foram semeadas em ágar nutriente (BD, EUA) de forma a colecioná-las para a avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos e formação de biofilme.

## 2.4. Pesquisa de formação de biofilme

A pesquisa de formação de biofilme dos isolados de *P. aeruginosa* foi realizada segundo a metodologia descrita por Patel e Sharma (2010) com modificações. Foram realizados três experimentos independentes para cada cepa.

As cepas foram semeadas em ágar tripticaseína de soja (TSA) (Merck, Alemanha) e incubadas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 24-h. Uma colônia isolada foi semeada em dois tubos contendo 5,0 mL de caldo infusão cérebro-coração (BHI) (Merck, Alemanha) incubados sob agitação de 150 rpm (Orbit-Shaker, Lab-Line, EUA) a  $37 \pm 2^\circ\text{C}$  por 20-24-h. Após a incubação, um tubo de caldo BHI foi utilizado para inoculação de 200  $\mu\text{L}$  do crescimento celular, em triplicata, em quatro microplacas de poliestireno contendo 96 orifícios com fundo chato (Microtess<sup>TM</sup> Falcon, EUA). O outro tubo contendo a mesma cepa, foi centrifugado a 7500 rpm/10 min (Eppendorf 5804-R, A-4-44, Alemanha), o sobrenadante foi descartado, e o sedimento ressuspenso em 5,0 mL de água mineral natural estéril. Duzentos microlitros dessa suspensão foram inoculados, em triplicata, nas microplacas. A cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853 foi utilizada como controle positivo (CP). Três orifícios foram inoculados com 200  $\mu\text{L}$  de caldo BHI sem crescimento e com a água mineral natural estéril, sendo utilizados como controles negativos (CN). Duas microplacas foram incubadas a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e duas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ . Após 24 e 48-h foi realizada a leitura de uma microplaca incubada em cada temperatura. Cada orifício foi lavado por cinco vezes com água destilada e placa foi mantida a temperatura ambiente durante 45 min. A seguir foi adicionada 200  $\mu\text{L}$  de uma solução de cristal violeta 0,41% (Merck, Alemanha) preparado em solução de etanol a 20% (v/v) e a placa foi mantida a temperatura ambiente por 45 min. O conteúdo foi novamente lavado com água destilada por cinco vezes e mantida a temperatura ambiente por 45 min. Em seguida foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de etanol a 96% (Merck, Alemanha) e as microplacas foram mantidas sob agitação de 500 rpm/10 min (IKA, MS3D, EUA). Após, 150  $\mu\text{L}$  de cada orifício foram transferidos para uma nova microplaca e foi determinada a densidade ótica (DO) em espectrofotômetro (Biomérieux, Reader 270, França) em comprimento de onda de 600 nm. A interpretação dos resultados foi realizada pela média das nove leituras de cada cultura. As cepas foram classificadas como: não aderentes (NA), fracamente aderentes (FA), moderadamente aderentes (MA) e fortemente aderentes (FMA), segundo o critério descrito por Stepanovic et al. (2007):

NA  $\rightarrow$  DO  $\leq$  DO do CN ( $\text{DO}_C$ ); FA  $\rightarrow$   $\text{DO}_C < \text{DO} < 2 \times \text{DO}_C$ ; MA  $\rightarrow$   $2 \times \text{DO}_C < \text{DO} < 4 \times \text{DO}_C$ ; FMA  $\rightarrow$   $4 \times \text{DO}_C < \text{DO}$ .

## 2.5. Avaliação da susceptibilidade a antimicrobianos

A avaliação da suscetibilidade dos isolados de *P. aeruginosa* frente aos antimicrobianos foi realizada pelo teste de difusão em ágar (Kirbi-Bauer) baseada nos critérios do CLSI (2012). Foram utilizados discos (produzidos por Diagnósticos Microbiológicos Especializados, Brasil) de doze antibióticos: Imipenem (IPM; 10  $\mu\text{g}$ ), Ceftazidima (CAZ; 30  $\mu\text{g}$ ), Meropenem (MER; 10  $\mu\text{g}$ ), Piperacilina/Tazobactam (PIT; 100/10  $\mu\text{g}$ ), Cefepima (CPM; 30  $\mu\text{g}$ ), Levofloxacina (LVX; 5  $\mu\text{g}$ ), Tobramicina (TOB; 10  $\mu\text{g}$ ), Amicacina (AMI; 30  $\mu\text{g}$ ), Aztreonam (ATM; 30  $\mu\text{g}$ ), Gentamicina (GEN; 10  $\mu\text{g}$ ), Ticarcilina/Ácido clavulânico (TAC; 75/10  $\mu\text{g}$ ) e Ciprofloxacina (CIP; 5  $\mu\text{g}$ ).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras que apresentaram contaminação por algum grupo de micro-organismos descrito na RDC n.º 275/05 estão descritas na Tabela 1. Das 80 amostras analisadas, 40 (50,0%) apresentaram qualidade microbiológica insatisfatória segundo os critérios da

resolução supracitada. Quatro amostras (5,0%) apresentaram CSR, nove (11,2%) apresentaram coliformes totais e uma (1,2%) apresentou coliformes termotolerantes. O maior índice de amostras insatisfatórias foi devido à presença de *P. aeruginosa*, que foi detectada em 38 amostras (47,5%). Nenhuma amostra apresentou contaminação por enterococos.

**Tabela 1.** Caracterização microbiológica das amostras de água mineral natural que apresentaram qualidade insatisfatória segundo os parâmetros estabelecidos pela RDC nº 275/05 (Brasil, 2005).

Amostra	Coliformes termotolerantes	Coliformes totais	Clostrídeos sulfito redutores	<i>P. aeruginosa</i>
A1	Ausência	Ausência	Ausência	>23
B1	Ausência	Ausência	Ausência	2,2
E5	Ausência	Ausência	Ausência	>23
F2	Ausência	Ausência	Ausência	16
G2	Ausência	Ausência	Ausência	>23
H1	Ausência	Ausência	Ausência	1,1
J1	Ausência	Ausência	Ausência	1,1
J2	Ausência	Ausência	Ausência	5,1
K2	Ausência	Ausência	Ausência	>23
L1	Ausência	Ausência	Ausência	9,2
M1	Ausência	Ausência	Ausência	1,1
M2	Ausência	Ausência	Ausência	1,1
M3	Ausência	<b>Presença</b>	<b>Presença</b>	1,1
M4	<b>Presença</b>	<b>Presença</b>	<b>Presença</b>	6,9
Q2	Ausência	Ausência	Ausência	>23
S1	Ausência	<b>Presença</b>	Ausência	2,2
U1	Ausência	Ausência	Ausência	2,2
U3	Ausência	<b>Presença</b>	Ausência	2,2
U5	Ausência	Ausência	Ausência	3,6
U6	Ausência	Ausência	Ausência	1,1
U7	Ausência	Ausência	<b>Presença</b>	<1,1
U8	Ausência	Ausência	Ausência	5,1
U9	Ausência	Ausência	Ausência	9,2
U10	Ausência	<b>Presença</b>	Ausência	12
U11	Ausência	<b>Presença</b>	Ausência	6,9
U12	Ausência	<b>Presença</b>	Ausência	6,9
U13	Ausência	Ausência	Ausência	2,2
U15	Ausência	Ausência	Ausência	1,1
U16	Ausência	Ausência	<b>Presença</b>	>23
U17	Ausência	Ausência	Ausência	>23
Y1	Ausência	Ausência	Ausência	1,1
Z1	Ausência	Ausência	Ausência	16
Z4	Ausência	Ausência	Ausência	1,1
A'1	Ausência	Ausência	Ausência	5,1
C'2	Ausência	Ausência	Ausência	1,1
D'1	Ausência	<b>Presença</b>	Ausência	<1,1
D'2	Ausência	<b>Presença</b>	Ausência	23
G'1	Ausência	Ausência	Ausência	9,2
G'2	Ausência	Ausência	Ausência	>23
G'3	Ausência	Ausência	Ausência	2,2

**Nota:** Coliformes termotolerantes, coliformes totais e clostrídeos sulfito redutores – Ausência ou presença em 100 mL; *P. aeruginosa* – Número mais provável/100 mL.

O índice de amostras insatisfatórias obtidos neste estudo foi semelhante ao relatado por outros autores, que ao analisarem águas minerais naturais comercializados em garrafões de 20 L encontraram um percentual de amostras insatisfatórias variando de 23,8-71,0% (Sant'ana et al., 2003; Farache Filho e Dias, 2008; Brandao et al.; 2012). Das 33 marcas analisadas neste estudo, apenas 14 marcas (42,4%) apresentaram qualidade microbiológica satisfatória para todas as amostras analisadas. Este resultado foi distinto do relatado por Brandao et al. (2012) que ao analisarem a qualidade 15 marcas, observaram que nenhuma marca apresentou qualidade satisfatória em todas as amostras analisadas.

*P. aeruginosa* foi o micro-organismo que representou maior prevalência, com uma concentração variando de 1,1 a >23 NMP/100 mL (Tabela 1). Trinta amostras (78,9%) apresentaram concentração entre 1,1 a 23 NMP/100 mL, enquanto que as demais apresentaram o resultado >23 NMP/100 mL. Esse resultado foi similar ao obtido por Brandao et al. (2012), que observaram que 78,6% das amostras contaminadas por *P. aeruginosa* apresentavam-se na mesma faixa de concentração. Outros autores relataram um maior percentual de amostras de águas minerais naturais em garrafões de 20 L contaminadas por *P. aeruginosa*, com prevalência de 50,0% (Nascimento et al., 2000) e 67,7% (Brandao et al., 2012). A menor prevalência de *P. aeruginosa* observada neste estudo, cujo resultado foi de 38 amostras insatisfatórias para este micro-organismo (47,5%), pode estar associada ao fato de que as amostras foram coletadas após a publicação da RDC n.º 173/2006 (Brasil, 2006), que regulamentou as BPF para os produtores de água mineral natural. Além disso, em 2009 foi publicado a Portaria n.º 358/2009 (Brasil, 2009) que estipulou um prazo de validade de três anos para as embalagens plástico-garrafão de 20 L. Contudo, o índice de 50% de amostras insatisfatórias obtido neste estudo indica que ainda estão ocorrendo falhas por parte dos produtores, que devem cumprir a norma de BPF assim como o setor regulador quanto a sua fiscalização desse cumprimento. Além disso, o prazo de três anos talvez ainda não seja suficiente para garantir a integridade das embalagens reutilizáveis de 20 L.

Os resultados da produção de biofilme pelas cepas de *P. aeruginosa* e do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos estão apresentados na Tabela 2. Não foi possível isolar cepas de *P. aeruginosa* das amostras J2, M1, U8, U12, U15, Y1 e Z1 pois não houve crescimento de colônias no ágar cetrímide. Isto pode ter ocorrido devido ao tempo maior que o caldo acetamida ficou estocado antes da realização da semeadura no ágar cetrímide, que quando não pode ser realizado em tempo hábil, acabou levando a perda da viabilidade da cultura no caldo.

Outros autores que pesquisaram *P. aeruginosa* em amostras de águas minerais naturais em outros tipos de embalagem não retornáveis, como copos plásticos ou garrafas de politereftalato de etileno, não detectaram amostras contaminadas (Coelho et al., 2007; Bernardo, 2009; Neta et al., 2013). Isto indica que as águas minerais comercializadas em garrafões reutilizáveis de 20 L estão mais sujeitas à contaminação. Esse fato está relacionado principalmente a ineficiência das etapas de limpeza e desinfecção dos garrafões, uma vez que o biofilme formado nestas embalagens não é facilmente removível durante estas etapas (Farache Filho e Dias, 2008).

Neste estudo, a pesquisa de formação de biofilme foi testada nas temperaturas de  $25 \pm 2$  °C, que simula a temperatura ambiente, onde as embalagens de 20 L são normalmente estocadas no comércio, e  $35 \pm 2$  °C, que é próxima da temperatura ótima de crescimento de *P. aeruginosa* (Koneman et al., 2001) e comum em dias de calor no Estado do Rio de Janeiro.

Avaliou-se a produção em dois tipos de matrizes, uma em caldo BHI, que é um meio de cultivo rico em nutrientes, e outra em água mineral natural estéril, que apresenta pequena quantidade de nutrientes, de forma a comparar a produção do biofilme na própria matriz em que os micro-organismos se encontram.

**Tabela 2.** Produção de biofilme e perfil de susceptibilidade à antimicrobianos das cepas de *P. aeruginosa*.

Amostra	Produção de biofilme								Antibiograma	
	Caldo infusão cérebro coração				Água mineral natural estéril				Intermediário	Resistente
	25°C		35°C		25°C		35°C			
	24-h	48-h	24-h	48-h	24-h	48-h	24-h	48-h		
A1	FA	FA	NA	FA	FA	FA	FA	FA	*	*
B1	<b>FTA</b>	<b>FTA</b>	<b>MA</b>	<b>MA</b>	FA	FA	FA	FA	*	*
E5	<b>MA</b>	<b>FTA</b>	FA	<b>MA</b>	FA	FA	FA	FA	*	*
F2	FA	FA	NA	FA	<b>MA</b>	FA	FA	FA	TAC	CAZ, CPM, ATM
G2	<b>MA</b>	<b>MA</b>	<b>MA</b>	FA	FA	FA	FA	FA	*	*
H1	<b>MA</b>	<b>MA</b>	<b>MA</b>	<b>MA</b>	<b>FTA</b>	<b>FTA</b>	<b>MA</b>	FA	ATM, TAC, CIP	*
J1	NA	FA	FA	FA	FA	FA	NA	FA	*	*
K2	<b>FTA</b>	<b>FTA</b>	<b>MA</b>	<b>MA</b>	FA	FA	FA	FA	*	*
L1	FA	FA	FA	FA	FA	FA	FA	FA	ATM	TAC
M2	FA	FA	NA	FA	FA	FA	FA	FA	ATM, CIP	TOB, AMI, GEN, TAC
M3	FA	FA	NA	FA	FA	FA	FA	FA	TAC	*
M4	FA	FA	NA	FA	FA	FA	FA	FA	TAC	*
Q2	<b>MA</b>	<b>MA</b>	<b>MA</b>	<b>MA</b>	FA	FA	FA	FA	*	*
S1	<b>FTA</b>	<b>FTA</b>	<b>FTA</b>	<b>FTA</b>	FA	FA	<b>MA</b>	<b>MA</b>	*	*
U1	FA	FA	NA	FA	FA	FA	FA	FA	ATM, TAC	*
U3	FA	FA	FA	<b>MA</b>	FA	FA	FA	FA	*	*
U5	FA	FA	FA	FA	FA	FA	FA	FA	TAC	*
U6	FA	FA	FA	FA	FA	FA	FA	FA	*	*
U9	FA	FA	FA	FA	FA	FA	FA	FA	*	*
U10	FA	FA	FA	<b>MA</b>	FA	<b>MA</b>	FA	FA	ATM, TAC	*
U11	<b>FTA</b>	<b>MA</b>	<b>MA</b>	FA	<b>MA</b>	<b>MA</b>	FA	<b>MA</b>	ATM, TAC	*
U13	FA	FA	FA	FA	FA	FA	FA	FA	ATM	TAC
U16	FA	FA	NA	FA	FA	FA	<b>MA</b>	FA	ATM, TAC	*
U17	FA	FA	FA	FA	FA	FA	FA	FA	TAC	*
Z4	FA	FA	FA	FA	FA	FA	FA	FA	ATM	TAC
A'1	FA	FA	<b>MA</b>	FA	<b>FTA</b>	<b>FTA</b>	FA	FA	ATM, TAC	*
C'2	FA	FA	FA	FA	<b>MA</b>	<b>FTA</b>	<b>MA</b>	<b>MA</b>	TAC	*
D'2	<b>MA</b>	<b>FTA</b>	<b>MA</b>	<b>FTA</b>	FA	FA	FA	FA	*	*
G'1	FA	FA	FA	FA	FA	FA	FA	FA	*	ATM, TAC
G'2	FA	FA	FA	FA	FA	FA	FA	FA	*	*
G'3	FA	FA	FA	FA	FA	FA	FA	FA	*	TAC
<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	<b>FTA</b>	<b>FTA</b>	<b>FTA</b>	<b>FTA</b>	<b>FTA</b>	<b>FTA</b>	<b>MA</b>	<b>MA</b>	NR	NR

**Nota:** FA- Fracamente aderente; NA- Não aderente; \*- Sensível a todos os antimicrobianos testados; FTA- Fortemente aderente; MA - Moderadamente aderente; TAC- Ticarcilina/Ácido clavulânico; CAZ - Ceftazidima, COM - Cefepima; ATM- Aztreonam; CIP - Ciprofloxacina; TOB - Tobramicina; AMI - Amicacina; GEN- Gentamicina; NR - Não realizado.

A maioria das cepas de *P. aeruginosa* (A1, J1, L1, M2, M3, M4, U1, U5, U6, U9, U13, U17, Z4, G'1, G'2 e G'3) foram classificadas como NA ou FA, tanto no caldo BHI quanto na água mineral estéril (Tabela 2). Considerando como resultado positivo para produção de biofilme a classificação de MA ou FTA em pelo menos uma das temperaturas estudadas (25 °C ou 35 °C) e durante um dos períodos de incubação (24 ou 48-h); as cepas B1, E5, G2, K2, Q2, U3 e D'2 foram capazes de produzir biofilme no BHI, mas não foram capazes de produzir biofilme na água mineral. Provavelmente, estas cepas necessitam de uma quantidade de nutrientes para produção do EPS e/ou dos demais componentes do biofilme que só estavam disponíveis no BHI. Por outro lado, as cepas H1, S1, U10, U11 e A'1 produziram biofilme tanto no BHI quanto na água mineral, indicando que a concentração de nutrientes no meio não foi o fator limitante para produção do biofilme. Já as cepas F2, U16 e C'2 produziram

biofilme apenas na água mineral. Neste caso, a escassez de nutrientes pode ter sido a responsável pela ativação de genes para a produção de biofilme. A cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853 utilizada como CP apresentou produção de biofilme em todos os experimentos.

Muitos estudos apontam que o aumento de bis-(3',5')-di-guanosina monofosfato cíclico (c-diGMP) intracelular atua como um segundo mensageiro que leva a expressão de fímbrias em *P. aeruginosa* que auxiliam na formação do biofilme (Häußler, 2008). Determinados fatores ambientais, como luz, oxigênio e nutrientes, podem modular a expressão de c-diGMP (Kulasakara et al., 2006). De acordo com Yasuhiko et al. (2012), o biofilme formado devido ao aumento de c-diGMP intracelular tende a ser mais aderente e robusto do que em cepas que produzem biofilme sem ativar esta via. Logo, as cepas que foram classificadas como FTA (B1, E5, H1, K2, S1, U11, A'1, C'2 e D'2) provavelmente utilizaram a via c-diGMP para produção de biofilme. A identificação de cepas de *P. aeruginosa* fortemente produtoras de biofilme já foi descrito por Bernardo (2009) em ensaios que avaliaram a produção de biofilme em BHI a 37 °C durante 24-h.

O grau de formação do biofilme produzido foi considerado com maior adesão quando incubado à temperatura de 25°C (Tabela 2). Contudo, as cepas S1, U3 e U16 não apresentaram este perfil, produzindo biofilme apenas na temperatura de 35°C. Segundo Mohamed e Huang (2007), a temperatura tem um efeito na produção de EPS, afetando de forma direta a capacidade de adesão e formação de biofilme, bem como a forma com que as bactérias neste estado lidam com os estresses ambientais. A maior formação do biofilme na temperatura de 25°C demonstra que quando as águas estão contaminadas por *P. aeruginosa* o biofilme pode ser formado mesmo na temperatura de prateleira (Bernardo, 2009).

Os isolados de *P. aeruginosa* apresentaram sensibilidade a maioria dos antibióticos, sendo 13 isolados (34,2%) sensíveis a todos os antibióticos. Esse resultado foi similar ao relatado por Bernardo (2009), que avaliou o perfil de susceptibilidade de isolados de *P. aeruginosa* de amostras de água mineral e observaram que as cepas foram sensíveis a todos os antibióticos. Contudo, 12 cepas (38,7%) apresentaram resistência intermediária a TAC, 10 (32,2%) a ATM e dois (6,4%) a CIP (Tabela 2). Seis cepas (19,4%) apresentaram resistência a TAC e duas (6,4%) a ATM (Tabela 2). A cepa F2 apresentou resistência a CAZ e CPM; e a cepa M2 apresentou resistência a TOB, AMI e GEN (Tabela 2), sendo os isolados que apresentaram maior resistência aos antimicrobianos. Resultado semelhante foi relatado por Vaz-Moreira et al. (2012) que ao analisarem diferentes tipos de água, incluindo água mineral natural, observaram que as cepas de *P. aeruginosa* possuíam maior resistência a TAC (80%), seguidas de CAZ e CPM (18 e 2%, respectivamente) e não foi observada nenhuma resistência a IPM e MER. Os antibióticos ATM, CAZ, CPM e TAC pertencem ao grupo dos  $\beta$ -lactâmicos (CLSI, 2012). Resistência a esta classe de antimicrobianos já foi descrita em cepas de *P. aeruginosa*, sendo os mecanismos de resistência mais comuns a difusão deficiente ou porinas alteradas e a produção de  $\beta$ -lactamase de amplo espectro. Outros mecanismos também descritos são a alteração de proteínas fixadoras de penicilinas e a baixa força motriz de prótons (Konemann et al., 2001). Segundo Dunn e Wunderink (1995) os  $\beta$ -lactâmicos variam na aptidão em induzir a produção de  $\beta$ -lactamase em *P. aeruginosa*. Logo, isso também pode explicar o porquê determinadas cepas apresentaram resistência a alguns  $\beta$ -lactâmicos e outras não. Os antibióticos TOB, AMI e GEN pertencem ao grupo dos aminoglicosídeos que necessitam cruzar a membrana citoplasmática bacteriana antes de iniciar seus efeitos letais (Beltrame et al., 1999). A resistência a esta classe de antimicrobianos em *P. aeruginosa* provém da modificação do antibiótico mediada por enzimas e/ou difusão deficiente ou porinas alteradas (Koneman et al., 2001).

Comparando a produção de biofilme com o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos, nota-se que a maior parte das cepas que apresentou resistência intermediária ou resistência a antimicrobianos foram classificadas como FA (Tabela 2). As cepas F2, H1, U10, U11, U16,



A<sup>1</sup> e C<sup>2</sup> que produziram biofilme na água mineral apresentaram resistência e/ou resistência intermediária a determinados antimicrobianos. De acordo com Häußler (2008), o aumento dos níveis de c-diGMP também pode aumentar a resistência a antibióticos. Logo, estas cepas podem ter utilizado o mecanismo de aumento c-diGMP intracelular e consequentemente apresentaram maior resistência a antimicrobianos.

#### 4. CONCLUSÃO

Concluiu-se que isolados de *P. aeruginosa* foram capazes de produzir biofilme em caldo BHI (22,6%), em água mineral natural (9,7%) e em ambos (16,1%). Esta produção foi maior no caldo BHI e na temperatura de 25°C (32,3%). Algumas cepas apresentaram resistência (51,6%) ou resistência intermediária (22,6%) a antimicrobianos, o que pode prejudicar o tratamento de pacientes no caso de infecções que tenham como agente estes microorganismos. Metade das amostras analisadas (40 amostras) apresentou qualidade microbiológica insatisfatória segundo a legislação brasileira vigente, principalmente devido à contaminação por *P. aeruginosa*. Desta forma sugerimos que os fabricantes estejam atentos ao cumprimento das BPF, principalmente na etapa de higienização das embalagens retornáveis de 20 L, de forma a garantir a eliminação do biofilme possivelmente presente.

#### 5. AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao INCQS/Fiocruz pelo financiamento deste estudo e pela concessão de bolsa de iniciação científica (PIBIC-CNPq) à Aline Pedrosa. Agradecemos às Vigilâncias Sanitárias Municipais e Estadual pela coleta das amostras analisadas neste estudo.

#### 6. REFERÊNCIAS

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 22<sup>st</sup> Ed. Washington, 2012.
- BAQUERO, F.; MARTÍNEZ, J. L.; CANTÓN, R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. **Current Opinion in Biotechnology**, Inglaterra, v. 19, n.3, p. 260 - 265, jun., 2008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2008.05.006>
- BELTRAME, R. E.; SILVA FILHO, C. R.; TANAKA, I. I.; SORNAS, A. M. F. *Pseudomonas aeruginosa* – antibioticoterapia e perfil de resistência de cepas isoladas de UTIs dos Hospitais da Faculdade de Medicina de Marília. **RBM Revista Brasileira de Medicina**, São Paulo, v.56, n.11, p. 1132-1144, 1999. Disponível em: <[http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?fase=r003&id\\_materia=414](http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?fase=r003&id_materia=414)>. Acesso em maio 2014.
- BERNARDO S. P. C. **Avaliação da Suscetibilidade a Antimicrobianos e Formação de Biofilmes em *Pseudomonas aeruginosa* Isoladas de água Mineral**. 2009. 70f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro, 2009.
- BRANDAO, M. L. L.; ROSAS, C. O.; MEEIROS, V. M.; WARNKEN, M. B.; BRICIO, S. M. L.; SILVA, A. M. L. da et al. Comparação das técnicas do Número Mais Provável (NMP) e de filtração em membrana na avaliação da qualidade microbiológica de água mineral natural. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 71, n. 1, p. 32-39, 2012.

- BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC n.º 275 de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico de características microbiológicas para água mineral natural e água natural. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, v. 184, 23 set. 2005, Seção 1, p. 377.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC n.º 173 de 13 de setembro de 2006. Dispõe sobre o regulamento técnico de boas práticas para industrialização e comercialização de água mineral natural e água mineral. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, v. 178, 15 set. 2006, Seção 1, p. 60.
- BRASIL. Ministério de Minas e Energia. Departamento Nacional de Produção Mineral. Portaria n.º 358, de 21 de setembro de 2009. Altera a Portaria n.º 387, de 19 de setembro de 2008. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, v. 181, 22 set. 2009, Seção 1, p. 51.
- BRASIL. Ministério de Minas e Energia. Departamento Nacional de Produção Mineral. **Sumário Mineral Brasileiro 2013**. Disponível em: <[https://sistemas.dnpm.gov.br/publicacao/mostra\\_imagem.asp?IDBancoArquivoArquivo=8963](https://sistemas.dnpm.gov.br/publicacao/mostra_imagem.asp?IDBancoArquivoArquivo=8963)>. Acesso em: 15 jan. 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis. **Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos**: abril - 2013. Brasília, 2013.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing**; twenty-second informational supplement. M100-S22, v. 32, n. 3, p. 62 – 63. Wayne, 2012.
- COELHO, D. A.; FARIA E SILVA, P. M. de; VEIGA, S. M. O. M. Avaliação da qualidade microbiológica de águas minerais naturais comercializadas em supermercados da cidade de Alfenas, MG. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.21, n. 151, p. 88-92, maio 2007.
- DUNN, M.; WUNDERINK, R. G. Ventilator-associated pneumonia caused by *Pseudomonas* infection. **Clinics in Chest Medicine**, USA, v.16, n.1, p. 95-109, 1995.
- FARACHE FILHO, A.; DIAS, M. F. F. Qualidade microbiológica de águas minerais em galões de 20 litros. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 19, n.3, p. 243-248, jul./set. 2008.
- HÄUBLER, S. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms: impact of small colony variants on chronic persistent infections. In: CORNELIS, P. ***Pseudomonas Genomic and Molecular Biology***. Norfolk: Horizon Scientific Press, 2008. p. 159-175.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION – ISO. **ISO 6461 – Water Quality – Detection and enumeration of the spores of sulfite-reducing anaerobes (clostridia)**, Part 1 – Method by enrichment in a liquid medium. 1<sup>st</sup> Ed. [S.l.], 1986.
- KIM, H.; FENG, P. Bottled water. In: DOWNES, F. P.; ITO, K.; AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Compendium of methods of examination of foods**. 4. ed. Washington: APHA, 2001. p. 573-576.

- KONEMAN, W. E.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR., W. C. Bacilos Gram-Negativos não-fermentadores. In: KONEMAN, E. W. **Diagnóstico microbiológico – texto e atlas colorido**. 5. ed. Rio de Janeiro: Médica e Científica, 2001. p. 263-329.
- KULASAKARA, H.; LEE, V.; BRENCIC, A.; LIBEATI, N.; URBACH, J.; MIYATA, S. et al. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* diguanylate cyclases and phosphodiesterases reveals a role for bis-(3'-5')-cyclic-GMP in virulence. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 103, n. 8, p. 2839-2844, 2006. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0511090103>
- LECLERC, H.; MOREAU, A. Microbiological safety of natural mineral water. **FEMS Microbiology Reviews**, Reino Unido, v. 26, n. 2, p. 207-222, 2002. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00611.x>
- MOHAMED, J. A.; HUANG, D. B. Biofilm formation by enterococci. **Journal of medical microbiology**, v. 56, p. 1581 - 1588, dec. 2007. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.47331-0>
- NASCIMENTO, A. R.; AZEVEDO, T.K.L.; FILHO, N.E.M.; ROJAS, M. O. A. I. Qualidade microbiológica das águas minerais consumidas na cidade de São Luís - MA. **Higiene Alimentar**, Campinas, v. 14, n. 76, p. 69-72, 2000.
- NETA, M. S.; LEAL, M. P. N.; REIS, A. S. Análise físico-química, microbiológica de água mineral produzida no nordeste e comercializada em Teresina – Piauí. **Revista Interdisciplinar**, Teresina, v. 6, n. 2, p. 33–37, abr./maio/jun. 2013.
- PATEL, J.; SHARMA, M. Differences in attachment of *Salmonella enterica* serovars to cabbage and lettuce leaves. **International Journal of Food Microbiology**, Holanda, v. 139, p. 41-47, 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.005>
- SANT'ANA, A.; SILVA, S. C. F. L.; FARANI, I. O. J.; AMARAL, C. H. R.; MACEDO, V. F. Qualidade microbiológica de águas minerais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, p. 190 -194, dez., 2003.
- STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; HOLA, V.; DI BONAVENTURA, G.; DJUKIĆ, S.; ČIRKOVIĆ, I. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **APMS**, v. 115, n. 8, p. 891-899, Aug. 2007. [http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm\\_630.x](http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x)
- VAZ-MOREIRA, I.; NUNES, O. C.; MANAIA, C. M. Diversity and antibiotic resistance in *Pseudomonas spp.* from drinking water. **Science of Total Environment**, v. 426, p. 366 - 374, June 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.03.046>
- WINGENDER, J.; FLEMMING, H. C. Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. **International Journal of Hygiene and environmental Health**, Alemanha, v. 214, n. 6, p. 417-423, Nov. 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.05.009>
- WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Burden of disease and cost-effectiveness estimates. In: \_\_\_\_\_. **Water sanitation health**. 2007. Disponível em: [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/diseases/burden/en/](http://www.who.int/water_sanitation_health/diseases/burden/en/). Acesso em: 31 jan. 2014.

YASUHIKO, I.; BORLEE, B. R.; O'CONNOR, J. R.; HILL, P. J., HARWOOD, C. S.; WOZNIAK, D. J. et al. Self-produced exopolysaccharide is a signal that stimulates biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 109, n. 50, p. 20632-20636, Dec. 2012.