

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS

INVESTIGAÇÃO DO ANTAGONISMO ENTRE
***Pseudomonas aeruginosa* E BACTÉRIAS DO GRUPO COLIFORME**

Ulrich Vasconcelos

Recife - 2005

Ulrich Vasconcelos

**INVESTIGAÇÃO DO ANTAGONISMO ENTRE
Pseudomonas aeruginosa E BACTÉRIAS DO GRUPO
COLIFORME**

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE
PRODUTOS BIOATIVOS PARA OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE MESTRE EM BIOTECNOLOGIA

Área de Concentração: Microbiologia Aplicada

Orientadoras: Prof^a Dr^a Glícia Maria Torres Calazans
Prof^a Dr^a Maria Alice G. de A. Lima

Recife- 2005

Vasconcelos, Ulrich

Investigação do antagonismo entre *Pseudomonas aeruginosa* e bactérias do grupo coliforme / Ulrich Vasconcelos. – Recife : O Autor, 2005.

128 folhas : il., fig., tab., quadros.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Biotecnologia, 2005.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Ciências biológicas – Microbiologia. 2. Águas – Bactérias – Estudo da qualidade. 3. *Pseudomonas aeruginosa* – Grupo coliforme – Antagonismo. 4. Piocianina – Ação inibitória. I. Título.

579.841.1

CDU (2.ed.)

UFPE

579.332

CDD (22.ed.)

BC2005-289

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS

DISSERTAÇÃO DE Mestrado apresentada por *ULRICH VASCONCELOS DA ROCHA GOMES* ao **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS**, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM 27 DE ABRIL DE 2005 DIANTE DA BANCA EXAMINADORA:



Dra. MARIA DE LOS ANGELES PEREZ FERNANDEZ PALHA
Departamento de Engenharia Química - UFPE



Dra. JANETE MAGALI DE ARAUJO
Departamento de Antibióticos - UFPE



Dra. MARIA ALICE GOMES DE ANDRADE LIMA
Departamento de Engenharia Química - UFPE

“[...] Ocorreu-me então que todas as águas do mundo estavam ligadas e onde houvesse água, a sabedoria brotava [...] A água percorre todos os lugares. Ela conhece todos os mistérios do mundo [...]”

Flávia Iulia Helena Augusta, pensando enquanto caminha pelas areias da praia do Golfo de Neápolis em “A sacerdotisa de Avalon” de Marion Z. Bradley (1930-1999) e Diana L. Paxson (1943-)

**Aos meus pais Dulce e Rocha, às
minhas irmãs Uliana e Ulnary, à minha
avó Evalda e à minha grande amiga
Pragati, dedico este trabalho.**

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Dulce, pelo amor, cumplicidade, apoio e por acreditar que sempre posso ir além dos meus limites. Obrigado por ser minha mãe e amiga.

Ao meu pai Rocha, pela companhia e por me levantar em todos os momentos críticos deste trabalho.

À minha irmã Uliana, parceira de sonhos, pelo carinho e paciência comigo.

À minha irmã Ulnary, grande companheira de infância e que hoje representa o equilíbrio e a razão entre nós três.

À Glícia, amiga, mestra e diretora. Por suas palavras e sabedoria que me orientaram e estarão comigo por todos os meus dias a partir de hoje.

À Professora Alice pelas idéias e direções importantes para o andamento da pesquisa.

À Pragati, minha fonte e modelo de inspiração, grande companheira e amiga há mais de 10 anos, agradeço pela força, apoio e amizade

À Swati, pela ternura, carinho, suporte e palavras de grande importância para minha vida.

A Leonardo, por construir comigo uma sólida amizade nascida desde o início deste trabalho e por se tornar um dos melhores amigos.

À Professora Alda Chiapeta por me apresentar o Departamento de Antibióticos durante a disciplina *Botânica 4* na minha graduação em Farmácia.

Aos professores das disciplinas teóricas e em especial Janete Magali, Carlos Edison Lopes e Maria de Fátima Queiroz.

À amável e simpática atenção de Suely e à disponibilidade de Salatiel.

Aos meus colegas de Mestrado, em especial Laurení, Cláudia e Claudemir.

À Lílian que pelo suporte durante os ensaios, não conseguiria finalizá-lo a tempo.

À Marcela pelo companheirismo, amizade e por me auxiliar nos momentos difíceis do trabalho.

Aos meus amigos externos ao Departamento de Antibióticos que participaram, conheceram e estiveram envolvidos com o projeto por estarem sempre presentes na minha vida.

À Rita, Roberta e todos os colegas do BAPPD pelos momentos divididos no laboratório.

Aos demais componentes da família do Departamento de Antibióticos e da minha vida, que participaram direta ou indiretamente para a realização deste projeto.

Por fim, agradeço aos espíritos de luz que me acompanharam e me guiaram nesta jornada e também a quem criou as águas e a partir dela, fez surgir todas as criaturas que povoam o universo, inclusive eu e você.

SJT

4.9.2	Teste de contato em meio líquido.....	76
4.9.2.1	Teste de contato 1.....	76
4.9.2.2	Teste de contato 2.....	77
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	80
5.1	Quantificação de <i>P. aeruginosa</i> em águas brutas e residuárias.....	80
5.2	Seleção das linhagens.....	81
5.3	Antibiograma.....	82
5.4	Ensaio antimicrobiano em meio sólido.....	86
5.5	Teste de contato em meio líquido.....	89
5.5.1	Teste de contato com concentrações celulares iguais.....	91
5.5.2	Teste de contato em meio líquido com vantagem de crescimento de 72h para <i>P. aeruginosa</i>	94
5.5.2.1	Fenômeno do antagonismo sobre EA1.....	95
5.5.2.2	Fenômeno do antagonismo sobre EC1.....	99
7.	CONCLUSÕES.....	109
8.	SUGESTÕES.....	111
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	112
	APENDICE A	
	APÊNDICE B	

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - <i>E. coli</i> em meio EMB.....	33
FIGURA 2 - <i>E. aerogenes</i> em meio EMB.....	37
FIGURA 3 - Fotomicrografia eletrônica mostrando <i>pili</i> e flagelos.....	42
FIGURA 4 - <i>P. aeruginosa</i> em agar cetrimida com produção de piocianina.....	42
FIGURA 5 - Fórmula estrutural da piocianina.....	52
FIGURA 6 - Amostra de água sendo coletada com coletor do tipo beiler no Poço de Observação 2.....	63
FIGURA 7 - Pontos de coleta do Aterro Sanitário da Muribeca.....	64
FIGURA 8 - Meios para determinação de <i>P. aeruginosa</i>	65
FIGURA 9 - Halos de inibição formados no antibiograma.....	74
FIGURA 10 - Antibiograma da linhagem P2.....	84
FIGURA 11 - Antibiograma da linhagem P14.....	85
FIGURA 12 - Antibiograma da linhagem P16.....	85
FIGURA 13 - Antibiograma de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853.....	85
FIGURA 14 - Halos de inibição formados pela linhagem P14 no teste de contato contra a linhagem EA1.....	86
FIGURA 15 - Halos de inibição observados com os blocos de gelose.....	87
FIGURA 16 - Caldo MH10%.....	91
FIGURA 17 - Resultados expressos em log do NMP/100mL do ensaio do antagonismo entre as linhagens P16 e EC1 com inóculos iniciais cerca de 10^2 UFC/mL.....	92
FIGURA 18 - Resultados expressos em log do NMP/100mL do ensaio do antagonismo entre as linhagens P16 e EA1 com inóculos iniciais cerca de 10^2 UFC/mL.....	92
FIGURA 19 - Resultados expressos em log do NMP/100mL do teste da cultura pura (cultivada isoladamente da linhagem EA1) em caldo MH10% e com inóculo inicial cerca de 10^2 UFC/mL	95
FIGURA 20 - Resultados expressos em log do NMP/100mL do ensaio do antagonismo entre as linhagens P14 e EA1 com inóculos iniciais cerca de 10^8 UFC/mL (P14) e cerca de 10^2 UFC/mL (EA1).....	96
FIGURA 21 - Resultados expressos em log do NMP/100mL do ensaio do antagonismo entre as linhagens P2 e EA1 com inóculos iniciais cerca de 10^8 UFC/mL (P2) e cerca de 10^2 UFC/mL (EA1).....	97
FIGURA 22 - Resultados expressos em log do NMP/100mL do ensaio do antagonismo entre as linhagens P16 e EA1 com inóculos iniciais cerca de 10^8 UFC/mL (P16) e cerca de 10^2 UFC/mL (EA1).....	98

FIGURA 23 - Resultados expressos em log do NMP/100mL do ensaio do antagonismo entre as linhagens padrão de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 25783 (inóculo inicial cerca de 10^8 UFC/mL) e <i>E. aerogenes</i> ATCC 15012 (inóculo inicial cerca de 10^2 UFC/mL).....	99
FIGURA 24 - Resultados expressos em log do NMP/100mL do teste da cultura pura (cultivada isoladamente da linhagem EC1) em caldo MH10% e com inóculo inicial cerca de 10^2 UFC/mL.....	100
FIGURA 25 - Resultados expressos em log do NMP/100mL do ensaio do antagonismo entre as linhagens P14 e EC1 com inóculos iniciais cerca de 10^8 UFC/mL (P14) e cerca de 10^2 UFC/mL (EC1).....	101
FIGURA 26 - Resultados expressos em log do NMP/100mL do ensaio do antagonismo entre as linhagens P2 e EC1 com inóculos iniciais cerca de 10^8 UFC/mL (P2) e cerca de 10^2 UFC/mL (EC1).....	102
FIGURA 27 - Resultados expressos em log do NMP/100mL do ensaio do antagonismo entre as linhagens P16 e EC1 com inóculos iniciais cerca de 10^8 UFC/mL (P16) e cerca de 10^2 UFC/mL (EC1).....	103
FIGURA 28- Resultados expressos em log do NMP/100mL do ensaio do antagonismo entre as linhagens padrão de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 25783 (inóculo inicial cerca de 10^8 UFC/mL) e <i>E.coli</i> ATCC 25922 (inóculo inicial cerca de 10^2 UFC/mL).....	104

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Estimativa da disponibilidade hídrica do planeta por região.....	24
TABELA 2 - Perfil do abastecimento de água e tipo de esgoto no Brasil (2000).....	26
TABELA 3 - Contagem de <i>E. coli</i> em 1g de fezes de humanos e alguns animais.....	36
TABELA 4 - Classificação das águas próprias para recreação.....	59
TABELA 5 - Estimativa expressa em NMP/100mL da população de <i>P. aeruginosa</i> isoladas de águas brutas e águas residuárias.....	80
TABELA 6 - Antibiograma das linhagens selvagens e padrão de <i>P. aeruginosa</i>	82
TABELA 7 - Média do diâmetro dos halos (mm) no ensaio antimicrobiano em meio sólido de <i>P. aeruginosa</i> contra coliformes (linhagens selvagens e padrão).....	88

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 -	Principais patógenos comum nas águas e seus efeitos.....	27
QUADRO 2 -	Características dos microrganismos na água.....	29
QUADRO 3 -	Membros da família <i>Enterobacteriaceae</i> associados com águas naturais.....	33
QUADRO 4 -	Fatores diarréicos de virulência de <i>E. coli</i>	34
QUADRO 5 -	Características das gastroenterites por <i>E. coli</i>	35
QUADRO 6 -	Principais mecanismos de virulência da <i>P. aeruginosa</i>	49
QUADRO 7 -	Principais fatores de virulência de <i>P. aeruginosa</i> que envolvem <i>Quorum-sensing</i>	51
QUADRO 8 -	Grupos de risco para infecções oportunistas por <i>P. aeruginosa</i>	53
QUADRO 9 -	Esquema empírico de tratamento contra <i>P. aeruginosa</i>	54
QUADRO 10 -	Classificação das águas doces no Brasil e suas aplicações...	58
QUADRO 11 -	Origem das linhagens de <i>P. aeruginosa</i> e parâmetros analisados.....	69
QUADRO 12 -	Origem das linhagens dos coliformes e parametros analisados.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Agar-água
ABVB	Agar Bile Verde Brilhante
AP	Agar <i>Pseudomonas</i> que favorece produção de piocianina
AN	Agar Nutriente
ASN-D	Caldo Asparagina de concentração dupla
ASN-S	Caldo Asparagina de concentração simples
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CET	Agar cetrimida
CLBVB	Caldo Lactosado Verde Brilhante
CLD	Caldo Lactosado em concentração dupla
CLS	Caldo Lactosado em concentração simples
CT	Coliformes totais
CTT	Coliformes termotolerantes
EA1	<i>Enterobacter aerogenes</i>
EC1	<i>Escherichia coli</i>
EMB	Agar EMB (<i>Eosyn Methyl Blue</i>)
FC	Fibrose cística
IH	Infecção hospitalar
IMViC	Teste do Indol, Vermelho de metila, Vokes-Proskauer e Citrato
Meio EC	Meio para determinação de <i>Escherichia coli</i>
MH10%	Caldo Müeller-Hinton na concentração de 10%
MH	Agar Müeller-Hinton
NMP	Número mais provável
NMP/100mL	Número mais provável por 100mL da amostra
OMS	Organização Mundial da Saúde
P	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , acompanha um número arábico
PA01	Linhagem padrão do <i>Pseudomonas Genome Project</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PO2	Poço de observação número 2 do Cemitério da Várzea-PE
QS	<i>Quorum-Sensing</i>
RMR	Região Metropolitana do Recife
t	tempo
TGI	Trato Gastrointestinal
TGU	Trato Gêrito-urinário
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colônia por mililitro
UFPEDA	Departamento de Antibióticos da UFPE
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
UV	Luz ultravioleta

RESUMO

A interferência da bactéria *P. aeruginosa* sobre o grupo coliforme é conhecida nas análises de água e sua enumeração tem sido questionada durante os últimos anos por ser considerada apenas um patógeno oportunista não habitante do trato intestinal de animais de sangue quente. No entanto, a grande versatilidade metabólica, daria vantagens à bactéria *P. aeruginosa* sobre outros microrganismos presentes na água. Neste trabalho, foi investigada a ação antagonista de 16 linhagens da bactéria *P. aeruginosa*, isoladas de diferentes amostras de águas de consumo humano e águas residuárias, contra bactérias do grupo coliforme. A existência de antagonismo foi observada em todas as linhagens no teste em meio sólido. As três linhagens mais agressivas foram submetidas ao teste em meio líquido. O contato se deu entre a bactéria *P. aeruginosa* com 72h de vantagem de crescimento, contra bactérias do grupo coliforme com inóculo inicial cerca de 10^2 UFC/mL em caldo Müeller-Hinton em uma concentração de 10% da composição original. Entre 24h e 96h após o contato, o NMP/100mL das duas populações foi estimado utilizando a técnica dos tubos múltiplos em série de cinco. O fenômeno de antagonismo foi observado quando os inóculos iniciais partiram de 10^2 UFC/mL e evidenciado quando a piocianina estava presente. *E. aerogenes* se mostrou mais sensível que *E. coli*. Este trabalho reascende uma discussão sobre a inclusão da bactéria *P. aeruginosa* como uma ferramenta adicional nas análises de água de consumo.

Palavras chave: *P. aeruginosa*, grupo coliforme, antagonismo, piocianina, qualidade de água.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa's interference against the coliform group in water analysis is known. Its enumeration has been questioned through the years because it is considered an opportunistic pathogen not inhabitant of intestinal tract of warm-blooded animals. Due to its metabolic versatility, it would have advantages under other organisms in water. In this work, 16 strains of *P. aeruginosa* isolated from water and wastewater samples, towards coliform bacteria were investigated. On solid medium all strains had antagonistic activity. The three most harmful strains from the qualitative test were chosen to be studied towards coliform bacteria (initial inoculum about 10^2 CFU/mL) in 10% Müeller-Hinton broth. It was given to *P. aeruginosa* 72h of growth advantage. The test was carried out between 24h and 96h after the contact. Most-Probable-Number per 100mL of both populations was enumerated by using the multiple tube technique. The antagonistic phenomenon was observed when the initial inoculum was established at 10^2 CFU/mL. It also was evidenced when pyocyanin were present. *E. aerogenes* has been more sensitive than *E. coli*. This study reinforces the discussion about the inclusion of *P. aeruginosa* as an additional tool to drinking water analysis.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, coliform group, antagonism, pyocyanin, water quality.

1 - INTRODUÇÃO

A água é essencial para a vida e todos os esforços devem ser feitos para garantir sua qualidade, do contrário, a população estará exposta ao risco de doenças, principalmente indivíduos mais jovens, os mais idosos, os doentes e todos aqueles que vivem em condições sanitárias inapropriadas (GLEESON & GRAY, 1997).

O século XXI reconhece a água como um bem econômico assim como admite uma crise no planejamento do uso dos recursos hídricos. O maior desafio da humanidade neste século será como manter estes recursos e como garantir uma qualidade da água, pois com o crescimento e desenvolvimento das cidades, o impacto ambiental é inevitável (COSGROVE & RIJSBERMAN, 2000).

A preocupação com a água como um bem universal e que medidas urgentes devem ser tomadas para sua preservação e planejamento, pode ser exemplificado com a designação do ano 2003 como o Ano Internacional da Água e da campanha da fraternidade de 2004 com o tema “Fraternidade e Água” e como lema “água, fonte de vida” (CNBB, 2003).

A resolução A/RES/47/193 da ONU de 22 de dezembro de 1992 declara 22 de março como o dia mundial da água e é recomendado aos países, celebrarem este dia com atividades concretas como premiações públicas, publicações, conferências, entre outros sobre conservação e desenvolvimento das fontes de água. Desde 1993 são lançados temas anuais ligando a água às ações humanas: *Water for thirsty cities* (1996) ou da preocupação com futuro das fontes e gerenciamento do produto, *The world's water: Is there enough?* (1997). Com o início do século XXI, os temas se voltaram para a saúde (2001), desenvolvimento (2002) e futuro (2003) e desastres naturais (2004) (UNESCO, 2004).

O tema do ano 2005: *Water for life*, abriu uma década dedicada às questões da água como elemento essencial para o desenvolvimento sustentável, incluindo integridade ambiental e erradicação da pobreza e da fome, indispensáveis para a saúde e bem estar do homem. O fim deste período

coincide com o ano onde se acredita que grande porção da população mundial não terá acesso ou poderá consumir água potável de qualidade (UNITED NATIONS, 2004).

A preocupação com a preservação do planeta, mais acentuada durante a última década, objetiva garantir a qualidade de vida da atual e de futuras gerações. Essa situação levou a ONU criar mais duas datas importantes sobre o tema: 08 de junho como dia mundial dos oceanos e 17 de junho como dia mundial de combate à desertificação (UNITED NATIONS, 2004).

O ano de 2004 foi proclamado como ano internacional da água doce e com a publicação do *World water development report* que abrange mapas, gráficos e dados estatísticos, foi realizado o mais abrangente e detalhado documento sobre recursos de água doce no mundo e conclui que por ter ciclo fechado e estável, a água não vai acabar. A falta de cuidados diminui o volume de água doce superficial exigindo soluções de alto custo como a dessalinização de águas oceânicas e a emergente preocupação com guerras futuras entre países, tendo a água como estopim do conflito (CARVALHO, 2004).

Dados da organização mundial de saúde indicam que milhões de vidas são perdidas no curso de um ano, por doenças provenientes da água, tais como cólera e diarreia infantil. A maior parte da contaminação é proveniente da ação humana, onde somente 30% da população mundial têm acesso à água tratada e os 70% restantes, dependem de poços e outras fontes de abastecimento sujeitos à contaminação (GUILHERME & SILVA, 2000).

As infecções são veiculadas de quatro formas pela água: quando o patógeno é transmitido pela ingestão de água contaminada, por contaminação oro-fecal quando não existe um adequado suprimento e saneamento, por organismos que a utilizam em pelo menos uma parte no seu ciclo de vida e por insetos vetores que depositam seus ovos na superfície. As doenças estão relacionadas ao uso de águas não tratadas ou tratadas de uma forma inadequada, como desinfecção mal planejada, filtração deficiente, outras causas desconhecidas ou um conjunto de vários fatores. Há conhecimento também do risco de infecção na ingestão durante o banho ou em piscinas como

também por aves e mamíferos aquáticos que contaminam a água (GLEENSON & GRAY, 1997).

A prevenção da qualidade da água é um dever e uma necessidade universal. Com esta finalidade, padrões de qualidade devem ser criados e pesquisados para garantir o bem estar de toda a população.

Microbiologicamente, a contaminação da água, por organismos patógenos ou não patógenos, pode acontecer na fonte, durante o tratamento ou dentro do sistema de distribuição (GLEENSON & GRAY, 1997). Dos indicadores de contaminação conhecidos, o grupo coliforme é o mais pesquisado (GUILHERME & SILVA, 2000). O grupo coliforme compreende um conjunto de vários gêneros bacterianos da família *Enterobacteriaceae* de origem fecal ou não, sendo os gêneros *Escherichia* e *Enterobacter* os mais representativos.

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* é um microrganismo oportunista encontrado em qualquer *habitat*, incluindo águas e sistemas de distribuição, solo, ar e o próprio homem. No Brasil, este microrganismo é considerado padrão de qualidade para águas minerais e águas minerais naturais (BRASIL, 2000) e a OMS não recomenda sua pesquisa em águas de consumo humano (SANCHEZ & RUOCCO Jr., 2004). Deveria ser considerado o fato da bactéria *P. aeruginosa* ser um patógeno oportunista, podendo oferecer risco à saúde de indivíduos sadios e imunocomprometidos (TANCREDI *et al.*, 2002).

Não consta na literatura disponível sobre o tema, a quantificação do número mais provável de tais microrganismos capazes de inibir o grupo coliforme. Sabe-se apenas que a bactéria *P. aeruginosa* promove sua inibição (GUILHERME & SILVA, 2000).

O entendimento de fenômenos como o antagonismo entre a bactéria *P. aeruginosa* e o grupo coliforme, poderá auxiliar na compreensão e conscientização das autoridades para a necessidade do monitoramento da sua presença em determinados corpos de água ou águas de abastecimento tratadas.

A partir de um estudo mais detalhado sobre a forma ou situações em que o fenômeno do antagonismo ocorre, seria possível e com mais segurança,

considerar ou não a inclusão da bactéria *P. aeruginosa* nos padrões de potabilidade de águas.

Como forma de garantir a qualidade da água que será consumida pela atual e por futuras gerações, estas regras deverão atender aos principais objetivos propostos para o século XXI que valoriza a água como um bem necessário.

A partir desse princípio, a água recebe um novo valor prático que simboliza a garantia da vida do planeta ainda por muitas gerações (COSGROVE & RIJSBERMAN, 2000).

2 - OBJETIVOS

2.1 – Objetivo geral

- Verificar as interações antagônicas entre *P. aeruginosa* com o grupo coliforme.

2.2 – Objetivos específicos

- Realizar ensaios presuntivos e confirmativos para verificar qualitativamente e quantitativamente a presença de coliformes e da bactéria *P. aeruginosa* em amostras de águas de abastecimento e residuárias.
- Pesquisar a existência do antagonismo entre *P. aeruginosa* com o grupo coliforme.
- Selecionar as linhagens mais agressivas da bactéria *P. aeruginosa* contra o grupo coliforme.
- Padronizar os inóculos das culturas e estabelecer os limites de concentração celular a partir do qual o fenômeno de antagonismo se verifica.
- Testar a sensibilidade a antibióticos utilizados no esquema empírico da terapia antipseudomonas.

3 - REVISÃO DA LITERATURA

3.1 - Etiologia e simbolismos da água

A origem da palavra água na língua portuguesa e nos demais idiomas latinos é a palavra *aqua*. O prefixo *hidro* veio do grego *hýdor* que junto ao latim, formam as raízes de todo o vocabulário médico, legal e técnico modernos e que foram emprestadas para línguas da família indo-européia, alterando o som *dar* para *var* originando, por exemplo, *water*, *wasser*, *vatten*, *vesi*, *vand* e *voda*. Certamente todas as mais de seis mil línguas faladas pelo mundo reservam um vernáculo para este precioso líquido que tantos significados recebeu e recebe ao longo da história da humanidade (PAPAVERO, 1994).

Para filósofos como Tales de Mileto, a água é o princípio da natureza úmida e continente de todas as coisas, sendo assim o princípio de tudo. Aristóteles diz que a água da superfície surge da chuva e dos lençóis subterrâneos, bem como da umidade do ar no interior das cavernas. Numa visão poética sobre o assunto, um copo de água trás mais de dez milhões de moléculas que estiveram em contato com nossos ancestrais (DUNCAN, 1999).

Os antigos, na obsessão de contar o tempo, vendo a imprecisão do relógio solar ou gnômon, criaram um recipiente de paredes graduadas feito de couro, pedra, madeira ou argila contendo água e que posicionado em um ângulo, indicava o escoar do tempo. Júlio César trouxe a novidade para o ocidente e os gregos o batizaram de clepsidra, que depois inspiraria as ampulhetas no deserto e por fim o relógio que conhecemos na atualidade (DONATO, 1993; DUNCAN, 1999).

Antes mesmo das clepsidras, a água foi fundamental em muitas culturas antigas. Na Grécia, por exemplo, Hidros, a água salva Gaia, a terra que estava sendo queimada por Piros, o fogo e por isto, é levada por Zeus ao Olimpo. O senhor das águas era Poseidon, apesar de não exercer plenos

poderes porque a água surgiu antes mesmo deste deus existir. Aos gregos a água estava ligada à força, pureza e renovação. Como uma entidade simbolizava a continuidade, a fertilidade e a proteção materna. O rio era uma figura masculina que engravidava as ninfas quando se banhavam e tinham num único parto, mais de uma centena de filhos (THOMAS, 2001).

Para os egípcios, o rio tinha maior importância. O Nilo era adorado e tido como o pai de todas as águas doces e como uma espécie de relógio na contagem dos seus anos e colheitas. Sobek-Ré, representado parte homem parte crocodilo, é o senhor das águas, pântanos, rios e canais. Outra lenda egípcia narra a cura de Horos de uma doença contraída nas águas do Nilo onde o deus foi escondido da fúria de seu tio e ficou doente (BORGES & GUERRERO, 2000).

Aos gregos, o mar sempre foi mais importante, e o oceano é o maior símbolo da água na visão mitológica. Foi lá que Afrodite, deusa da beleza e do amor, nasceu do encontro do céu e do mar. Outras divindades femininas estão associadas ao oceano, como as sereias, as plêiades e as nereides (THOMAS, 2001).

A água também representa purificação dos homens que se banhavam nos rios após lutas, guerras e mortes injustas. Os unicórnios foram tidos como purificadores de rios e mananciais quando esses animais fantásticos encostavam os chifres na superfície das águas que usavam para beber (BORGES & GUERRERO, 2000).

Praticamente todas as culturas antigas vêem a água como entidade. Para os sumérios era Namu, na China representa o primeiro elemento que corresponde o norte e simboliza o difícil, o envolvente, o perigoso, o melancólico, o inverno, a nuvem, o vermelho, o porco, a orelha e a percussão. Na Índia, Indra, deus das tempestades, protege todos os outros deuses, o rio Ganges é considerado sagrado e purificador. O maori Tangaroa governava o mar e todos os seus habitantes. Para os celtas, Danu é a deusa das águas do céu, mãe de todos os deuses e seu nome batizou o rio Danúbio (BORGES & GUERRERO, 2000).

Na mitologia africana tão bem recebida no imaginário brasileiro, Iemanjá reina nos mares. A lenda conta que a deusa é perseguida pelo exército do rei de Ifé e escapa quando quebrou uma garrafa presenteada por seu pai, devendo ser usada no momento de apuro. A água transformou-se em rio que a levou ao mar. Iemanjá casou com Oxalá, senhor dos mundos e entre seus filhos estão: Oxum, deusa das águas doces, cachoeiras e fontes e Nanã, das lamas e mangues (CASCUDO, 2000).

Na Bíblia Sagrada, a água é bastante citada, só os mares aparecem em 822 passagens. O Gênesis narra a separação das águas com a criação dos seres vivos no mar, assim como apresenta a destruição através dos 40 dias do dilúvio. A água também está presente em muitas cerimônias e rituais cristãos, como o batismo e a água benta. A idéia da água benta e outras cerimônias ligadas à água propriamente dita são encontradas também no Judaísmo e no Islamismo que vê a chuva como símbolo divino e tem o Paraíso um cenário de águas cristalinas.

Os índios brasileiros representavam Amana-manha, deusa da chuva e protetora das nascentes na forma de uma rã que canta enquanto a chuva molha a floresta. O panteão brasileiro é formado por vigilantes dos rios, do boto, de deuses protetores de fontes e nascentes e outros que defendem águas doces e salgadas. Provavelmente a deusa mais conhecida é Iara, senhora das águas, espécie de sereia das águas doces brasileiras (CASCUDO, 2000).

Na astrologia, representa a introspecção, cautela e ponderação e é o quarto elemento da medicina antiga, o fleumático (frio e úmido), que concentra energia e estabelece uma conexão entre a alma, a emoção e o corpo. Câncer, escorpião e peixes são os signos que representam este elemento e estão associados à sensibilidade e vulnerabilidade. É creditada ao pentagrama formado por triângulos equiláteros entrelaçados que unem o espírito à matéria e que representam as quatro energias formadoras do planeta, a origem do símbolo mais conhecido para a água: um triângulo equilátero negativo, isto é, com o vértice voltado para baixo simbolizando a

matéria e a mãe. Cada um dos vértices simboliza as três características da matéria: inércia, movimento e equilíbrio (WHITE, 1986).

3.2 - Qualidade da água: o ouro azul

A água é encontrada em cerca de 70% do planeta, sendo que 97,4% do total são formadas por águas salgadas, 1,8% estão congeladas e 0,8% correspondem às águas doces (TANCREDI *et al.*, 2002) desta parcela, cerca de 97% se encontra em aquíferos subterrâneos e 3% em superfície (NASCIMENTO *et al.*, 2000).

Desde os tempos antigos, a humanidade se instala próximo às fontes de água e desenvolve estratégias para garantir a qualidade assim como penalidades aos que danificassem suas fontes. Platão já considerava a necessidade de disciplinar o uso da água e formulou alguns tipos de punição para quem fizesse mau uso. Entre os documentos mais famosos que tratam do assunto estão: o código de Manu de recomendações de práticas higiênicas, na Índia; o código do rei Amurabi na Babilônia; o Talmude dos hebreus; o Alcorão dos muçulmanos e a própria Bíblia (REBOLÇAS, 1998).

As civilizações antigas além de terem a água como divindade, eram preocupadas com sua qualidade. Os egípcios recomendavam uso de vasos de cobre, exposição ao sol, filtração com carvão ou imersão de ferro aquecido para prevenir doenças. Em Nippur, Índia, por volta de 3750a.C. havia galerias de esgotos com canais cobertos de tijolo e aberturas para inspeções, as casas possuíam banheiras e latrinas que lançavam efluentes nesses canais (SILVA, 1998).

Na Pérsia e na Grécia foram desenvolvidos sistemas que traziam águas de longas distâncias. Roma possuía adutoras e um sistema de esgotos que culminavam na *cloaca máxima*. As casas possuíam castelas que são uma versão antiga das atuais caixas d'água (SILVA, 1998).

A importância da qualidade da água não era compreendida e não era bem documentada apesar de textos antigos se referirem a problemas estéticos e organolépticos (DANIEL, 2001).

Muitos fatos durante a idade média na Europa giraram em torno da água. As navegações que transportavam as mercadorias, desenvolviam as cidades portuárias. As epidemias, veiculadas pela água por conta da falta de educação da população e de instalações sanitárias apropriadas, mataram milhões de pessoas. Data de 1388 o documento britânico mais antigo sobre poluição de águas (SILVA, 1998).

Com o renascimento, a água é dominada pela tecnociência e as artes hidráulicas com preocupações arquitetônicas e mecânicas nas projeções dos moinhos, chafarizes, máquinas a vapor, bombas e desenvolvimento industrial, principalmente os setores que mais demandavam água como a indústria têxtil (SILVA, 1998).

No século XIX a filtração lenta foi usada regularmente na Europa e Paris, parece ser a primeira cidade com sistema de coleta de água residuária (DANIEL, 2001). O Rio de Janeiro foi a quinta cidade no mundo a adotar um sistema de coleta de esgoto baseado no modelo inglês de 1864 (SILVA, 1998). Data da mesma época o entendimento da transmissão de doenças veiculadas pela água que o século XX herdou e transformou em ações práticas como a implantação das primeiras estações de tratamento e a utilização do cloro nos Estados Unidos e do ozônio na mesma época, na Europa (EPA, 2000).

Durante os anos da idade de ouro da microbiologia, vários métodos eram conhecidos e utilizados por sanitaristas para análise de águas. O conceito de doenças por ela veiculadas já era aceito e muitos mecanismos de transmissão de doenças eram conhecidos e entendidos. Em 1899, a APHA, *American Public Health Association*, formou um comitê para uniformizar a metodologia das análises, como resultado foi lançado em 1905 a primeira edição de *Standard Methods of Water Analysis* (APHA, 1998).

A água usada para consumo deve atender às características fundamentais, a primeira delas: ser doce e atender a parâmetros físico-químicos, microbiológicos e radiológicos adequados à saúde. Cada país adota

seus próprios padrões de potabilidade, portanto, o conceito de água própria para o consumo é variável (REBOUÇAS, 1998).

A população do planeta triplicou em número durante o último século enquanto que a utilização da água multiplicou em seis vezes, principalmente no consumo doméstico, na indústria e na irrigação, provocando impactos ambientais através do uso desenfreado dos aquíferos e poluição dos rios, mares e lençóis freáticos (COSGROVE & RIJSBERMAN, 2000). O maior causador da degradação dos corpos hídricos está originado no binômio industrialização-urbanização (SILVA, 1998). A Tabela 1 apresenta a estimativa da disponibilidade hídrica no mundo.

Tabela 1 -Estimativa da disponibilidade hídrica do planeta por região

Região	Recursos hídricos disponíveis anuais	
	Total (10 ³ /Km ³ /ano)	Per capita (10 ³ m ³ /hab/ano)
África subsaariana	3,8	7,1
Leste asiático e Pacífico	9,3	5,3
Sul da Ásia	4,9	4,2
Europa oriental e ex-URSS	4,7	11,4
Outros países da Europa	2,0	4,6
Oriente médio e África do norte	0,3	1,0
América latina e Caribe	10,6	23,9
Canadá e EUA	5,4	19,4
Mundo	40,9	7,7

Fonte: Silva (1998)

O Brasil possui 12% da água doce de todo território mundial e 35% da América do Sul sendo o único país continental onde chove durante todo o ano. Cerca de 3% da água doce do Brasil encontra-se na região Nordeste, mesmo assim, é o semi-árido mais chuvoso do planeta. Pernambuco é o estado com a menor disponibilidade de água doce por pessoa (CNBB, 2003) com 1,234m³/hab/ano, que representa 0,1% do potencial hídrico brasileiro (SILVA, 1998). Recife encontra-se na bacia costeira do nordeste oriental (0,3% da água doce do Brasil), com bacias hidrográficas conjugadas do rio Capibaribe onde a

irrigação, o abastecimento público e a indústria são os maiores consumidores em uma área com potencial de impacto poluidor sobre mananciais com lançamentos de efluentes de esgoto e lodos (IBGE, 2004).

Até 1920, a seca no Nordeste foi a maior preocupação com relação à água no Brasil, também é dessa época o surgimento da cultura de sua abundância em nosso país. Até a metade do último século, a água foi usada como fonte de geração de energia e teve seu uso ampliado a partir da segunda metade, com a industrialização e crescimento das cidades (GARRIDO, 2000). Em 2000, a irrigação representou 56% do consumo no país, seguido do abastecimento e da Indústria com 21% e 12%, respectivamente (IBGE, 2004).

Planejar, limitar o uso, estocar, modificar o manejo para aumentar a produtividade e valorizar os ecossistemas serão os maiores desafios para o século XXI, escolhido como o século da água (COSGROVE & RIJSBERMAN, 2000).

A falta de saneamento básico é responsável pelo óbito de milhões de crianças por ano na faixa etária de 0 a 5 anos (GUILHERME & SILVA, 2000) e estima-se que 80% das doenças no mundo são atribuídas ao uso inadequado da água ou falta de saneamento básico (GLEENSON & GRAY, 1997). Em países em desenvolvimento, as enterites são a principal causa de morbimortalidade em crianças de 0 a 4 anos, representando de 3 a 4% da causa de óbito nesses países, no Brasil, é a primeira causa de óbito em todas as idades (D'ÀQUILA *et al.*, 2000).

A UNESCO, *United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization*, aliada aos governos e comunidade científica, patrocina o IHP, *International Hydrological Programme* formado por vários órgãos e dividido em fases pré-estabelecidas, focalizando temas e desenvolvendo programas, atividades e metodologias baseados no princípio de que o desenvolvimento humano e social é impossível sem suprimento de água. Atualmente, vivemos a fase VI que começou em 2002 e vai até 2007. Esta fase investiga as águas superficiais e subterrâneas, doces e salgadas dando continuidade aos estudos do ciclo hidrológico e qualidade de ecossistemas aliados à ciência e política social (UNESCO, 2004).

Os principais objetivos da fase VI concentram atenção em 21 áreas de focos divididos em 5 temas principais sobre mudanças globais e recursos de água, dinâmica dos aquíferos, secas e participação da sociedade nesses processos (UNESCO, 2004).

Segundo o IBGE, o Nordeste apresenta um perfil preocupante com respeito à água que é consumida e o destino dos rejeitos como mostra a Tabela 2 que por vezes se distancia muito da realidade brasileira. A região metropolitana do Recife, RMR, está localizada em uma zona de racionamento de água de frequência constante, independente da época do ano e tendo como principais causas a estiagem, problemas no reservatório e tratamento insuficiente.

Tabela 2 - Perfil do abastecimento de água e tipo de esgoto no Brasil (2000)

	Brasil	Nordeste
População atendida		
Rede de abastecimento de água		63,9%
Rede de esgoto sanitário		27,7%
Abastecimento por poço ou nascente		
Geral	77,8%	48%
Poço	15,6%	39,4%
Outros	6,6%	12,6%
Tipo de esgoto		
Rede geral	<50%	25%
Fossa séptica	15%	≈10%
Fossa rudimentar	22%	+30%
Jogados em corpos d'água	5%	<5%

Fonte: Atlas do saneamento, IBGE (2004)

Cerca de 82,7% da região Nordeste possui rede geral de abastecimento, as regiões que não possuem tal sistema, utilizam como soluções alternativas o chafariz (55%), poços particulares (15%) e carros pipa (10%). Outras fontes alternativas de abastecimento na região como chuvas, poços e nascentes representam 12,6%, quase o dobro se comparado ao Brasil (6,6%). Na RMR, os poços representam até 14,9% do abastecimento (IBGE, 2004).

Na água, as bactérias são os principais agentes biológicos como fonte de morbidade no mundo. O Quadro 1 apresenta alguns desses microrganismos. Outros patógenos também se reproduzem em alimentos e bebidas o que aumenta ainda mais o risco de infecção (DANIEL, 2001).

Quadro 1 - Principais patógenos humanos comuns em águas e seus efeitos

Tipo e agente	Doenças
Protozoários	
<i>Cryptosporidium</i>	Gastroenterite
<i>Entamoeba histolytica</i>	Amebíase
<i>Giardia lamblia</i>	Giardíase
Bactérias	
<i>Escherichia coli</i>	Diarréias
<i>Legionella pneumophila</i>	Pneumonia e febre
<i>Leptospira interrogans</i>	Leptospirose
<i>Salmonella typhi</i>	Febre tifóide
<i>Salmonella paratyphi A, B e C</i>	Febre paratifóide
<i>Shigella dysenteriae, Shigella sp.</i>	Gastroenterites
<i>Proteus sp.</i>	gastroenterite
<i>Vibrio cholerae</i>	Cólera
Virus	
Adenovirus	Infecções respiratórias
Agente Norwalk	Gastroenterites
Coxsackie humano A1-A22, A24, B1-B6	Doenças respiratórias, meningite, Miocardite Doenças associadas
Echo humano 1-27, 11-27, 29-33	associadas
Hepatite A	Hepatite e gastroenterite
Poliovírus 1,2 e 3	Poliomielite
Reovírus 1, 2 e 3	Infecções respiratórias e enterites
Rotavírus grupo B	Gastroenterite

Fonte: D'áquila *et al.* (2000) e Matos (2001)

A qualidade da água deve ser garantida ao consumidor. Esta qualidade pode ser determinada através da leitura dos níveis de nutrientes na tubulação. Uma comunidade de bactérias heterotróficas se desenvolve em biofilmes e o crescimento está relacionado com a temperatura, material dos canos e corrosão entre outros e é limitado pela concentração de matéria orgânica biodegradável presente (VOLK & LeCHEVALLIER, 1999).

O tratamento com cloro, hipoclorito ou ozônio quebra compostos orgânicos de alto peso molecular em ácidos orgânicos que agem como fatores de crescimento, fazendo do carbono orgânico o principal nutriente em sistemas de distribuição. Para considerar uma água de qualidade, a concentração de carbono orgânico deve ser menor que 10µg/L (MIETTINEN *et al.*, 1997).

Não se conhece a qualidade da água nos domicílios de onde o produto tratado é realmente consumido, agravando mais o quadro quando se conclui que os consumidores não estão informados da necessidade da limpeza e manutenção dos reservatórios. Em um estudo realizado no município de Nova Iguaçu, Rio de Janeiro, verificou-se que 61,51% dos pontos de coleta apresentavam contaminação o que indica uma ineficiência no sistema de desinfecção na estação de tratamento que garantiria cloro livre para manter a potabilidade nos domicílios (D'ÁQUILA *et al.*, 2000).

Os microrganismos do grupo coliforme foram os primeiros indicadores de contaminação associada com fezes na água e são ainda os mais utilizados. A bactéria *P. aeruginosa* é usada como controle de qualidade e não como rotina para análise apesar de muitas pesquisas sugerirem tratá-la como um microrganismo de risco à saúde e não apenas complemento de rotina laboratorial (HARDALO & EDBERG, 1997).

Esta tendência foi mais acentuada no final da década passada quando a bactéria foi tratada como agente de contaminação primária por ser um organismo oportunista, causador de doenças veiculadas tanto por água quanto por alimentos e também considerada indicativa da presença de outros patógenos oportunistas (MORAIS *et al.*, 1996).

O Quadro 2 faz uma relação entre *P. aeruginosa* e *E. coli* apresentando a idéia que a bactéria também é indesejada e seu crescimento está associado à diminuição da qualidade como cor, turbidez, sabor e odor (STANDING COMMITTEE OF ANALYSTS, 2002).

Quadro 2 - Características dos microrganismos na água

	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
Significância à saúde	Moderada	Alta
Detenção em água a 20°C	Pode multiplicar	Moderada (1 semana-1mês)
Resistência ao cloro	Moderada	Baixa
Dose infectiva relativa	Alta (?)	Alta
Fonte animal	Não	Sim

Fonte: WHO (2003)

Sejam bactérias do grupo coliforme seja *P. aeruginosa*, a presença na água destes microrganismos representa risco para a população em geral e em especial nos locais de grande concentração ou isolamento de pessoas como creches, escolas, condomínios, asilos, hospitais, *shopping center*, rodoviárias, presídios, entre outros (D'ÀQUILA *et al.*, 2000).

3.3- Águas residuárias e tratamento

Água residuária é o conjunto de águas provenientes do uso doméstico, industrial e agrícola com ou sem a presença da água da chuva. As características físico-químicas e microbiológicas de águas de origem doméstica e industrial são muito complexas e o resíduo líquido deve sofrer tratamento para ser reutilizado ou ser lançado, após monitoramento, nos corpos de água (KIELY & VEZA, 1999).

No passado, os resíduos eram lançados ao mar ou em corpos de água doce por se acreditar que a grande massa de água disponível dispensaria o oneroso processo de depuração. O local escolhido era afastado e pouco habitado. Com o século XX, o despejo de resíduos em corpos de água tornou-se um grave problema de saúde pública, saúde ambiental e estética. Somente a partir dos anos 50, estudos de impacto assumiram caráter científico (LIMA, 1996).

Cada habitante de uma cidade saneada contribui com 1,5Kg em média, de dejetos proveniente de fezes e urina. Após tratamento, o resíduo seco resultante varia de 40 a 60g/hab/dia (LIMA, 1996). No Brasil há geração de 1,35Kg/hab/dia de lixo, sendo 0,87Kg/hab/dia na região Nordeste (IBGE *apud* JUCÁ, 2003). Na RMR, são coletadas mais de 3.000 toneladas ao dia de lixo e cerca de 5 a 10% é despejado em rios ou no mar (IBGE, 2004).

O principal destino dos resíduos sólidos praticamente em todo o mundo são os aterros sanitários. No Brasil, apesar de ainda não ser o destino mais comum, desde a última década, vem sendo melhorado pelos cuidados com tratamento e destino final (JUCÁ, 2003).

O lixo colocado em aterros de resíduos sólidos está sobre fortes condições anaeróbias, apresentando alta atividade de bactérias metanogênicas. A produção de chorume e posterior tratamento e lançamento em corpos de água são as ações mais importantes nos aterros. As lagoas de estabilização são sistemas de tratamento biológico do chorume e se caracterizam pela simplicidade, eficiência e baixo custo (JUCÁ *et al.*, 2002).

O aterro da Muribeca se encontra em um terreno formado por uma camada de rocha impermeável e abrange uma área de 62ha no município de Jaboatão dos Guararapes. O local recebe diariamente cerca de 3000 toneladas de resíduos domésticos e industriais e somente a partir de 1994, um processo de recuperação foi iniciado com a construção de nove células com 40Km² de área, cada. O sistema de tratamento abrange recirculação do chorume no interior das células, tratamento biológico através de lagoas de estabilização, sendo uma anaeróbia seguida de três facultativas e tratamento através de fitorremediação (JUCÁ *et al.*, 2002).

O tratamento primário do efluente dura 30 dias e é feito nas lagoas de decantação de 4m de profundidade, que recebem por gravidade, o chorume gerado. O tratamento secundário é feito em tanques menores: uma lagoa anaeróbia e três lagoas facultativas, onde ocorre oxidação aeróbica na superfície, auxiliada por fotossíntese e na parte mais profunda aonde a luz não chega, os sedimentos sofrem decomposição lenta pelos microrganismos antes do efluente ser lançado no Rio Jaboatão (JUCÁ, 2002).

3.4 - Microrganismos do grupo coliforme

A exposição à água acontece por três mecanismos: ingestão, contato e inalação de aerossóis (WHO, 2002). A relação entre a qualidade da água e doenças foi observada desde os tempos antigos, mas foi somente em 1854 que John Snow demonstrou durante um episódio de epidemia que atingiu Londres, que a água pode ser um veículo para doenças (GUILHERME & SILVA, 2000), confirmando sua teoria formulada cinco anos antes do episódio (DANIEL, 2001). No Quadro 3 estão apresentados alguns gêneros dos microrganismos do grupo coliforme associados às águas naturais. Por critérios taxonômicos o grupo coliforme é heterogêneo e inclui também microrganismos de origem não fecal e fermentadores de lactose (GLEESON & GRAY, 1997).

Quadro 3 - Membros da família *Enterobacteriaceae* associados com águas naturais (* fermentam lactose com produção de gás)

Gêneros	Espécies
<i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i> *
<i>Shigella</i>	<i>S. dysenteriae</i> , <i>S. flexineri</i> , <i>S. Boydii</i> , <i>S. sonnei</i>
<i>Edwardsiella</i>	<i>E. tarda</i>
<i>Salmonella</i>	<i>S. cholerae</i> , <i>S. typhi</i> , <i>S. enteritidis</i>
<i>Arizona</i>	<i>A. hinshawii</i> *
<i>Citrobacter</i>	<i>C. freuneii</i> *, <i>C. diversus</i> *
<i>Klebsiella</i>	<i>K. pneumoniae</i> , <i>K. ozaenae</i> , <i>K. rhinoscleromatis</i> *, <i>K. oxytoca</i>
<i>Enterobacter</i>	<i>E. cloacae</i> *, <i>E. aerogenes</i> *, <i>E. Agglomerans</i>
<i>Serratia</i>	<i>S. marcescens</i> , <i>S. liquefaciens</i> , <i>S. rubidaea</i>
<i>Hafnia</i>	<i>H. alvei</i> *
<i>Proteus</i>	<i>P. vulgaris</i> , <i>P. mirabilis</i>
<i>Providencia</i>	<i>P. alcalifaciens</i> , <i>P. stuartii</i> , <i>P. rettgeri</i>
<i>Morganella</i>	<i>M. morganni</i>
<i>Erwinia</i>	Grupos <i>amylovora</i> , <i>herbicola</i> , <i>caratova</i>
<i>Pectobacterium</i>	
<i>Yersinia</i>	<i>Y. pestis</i> , <i>Y. enterocolitica</i> , <i>Y. pseudotuberculosis</i> , <i>Y. ruckeri</i> , <i>Y. intermedia</i> , <i>Y. fredericksonii</i>

Fonte: Gleenson and Gray (1997)

Desde 1895, a bactéria *Bacillus coli*, posteriormente conhecida como *Escherichia coli*, foi isolada em fezes humanas por Escherich em 1880 e proposta como indicador de contaminação fecal. Verificou-se mais tarde que não se tratava de uma única espécie, mas de um grupo, denominado coliforme compreendendo vários gêneros (GUILHERME & SILVA, 2000).

Na microbiologia de água, a maioria dos casos, não é importante identificar os organismos envolvidos. Faz-se urgente a identificação dos grupos de significado sanitário, por exemplo, o grupo coliforme e principalmente sua enumeração na determinação da qualidade e liberação do produto (SANCHEZ & RUOCCO Jr., 2004).

As águas para consumo humano devem estar livres de patógenos. A Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica as águas de consumo em dois tipos: canalizadas, que sofrem captação, tratamento e distribuição e as águas não canalizadas, que incluem as fontes, poços comunitários, engarrafados em geral, águas minerais e gelo (WHO, 2002).

O grupo coliforme é universalmente utilizado como indicador de poluição de água por estar presente no trato intestinal de animais de sangue quente, chegando a representar de 25 a 30% do peso total das fezes, entre células vivas e mortas. Todos os representantes deste grupo são bacilos Gram-negativos da família *Enterobacteriaceae*, não esporulados, aeróbios ou anaeróbios facultativos e que fermentam a lactose com produção de gás dentro de 48 horas à 35°C (APHA, 1998).

O capítulo II, artigo 4º, parágrafo VI da portaria 518/04 complementa a definição de bactérias do grupo coliforme como organismos que podem apresentar atividade da enzima beta-galactosidase (BRASIL, 2004).

Dentre as espécies do grupo mais frequentemente isoladas, *E. coli* e *E. aerogenes* se destacam e ambas são capazes de proliferar em condições de concentração de carbono orgânico muito baixas. Na metade do século passado, esta característica foi descrita quando coliformes cresceram em agar contendo 0,1mg/L de glicose (CAMPER *et al.*, 1991).

O crescimento em baixas concentrações de carbono orgânico está associado com consórcios bacterianos sobre biofilme. O biofilme e produtos

associados a ele, permitem crescimento em baixas temperaturas. Um estudo identificou a interrupção do crescimento de *E. coli* com 0,1mg/L de extrato de levedura em 3 semanas à 10°C. Uma população de 10⁵UFC/mL foi atingida por *E. aerogenes* em 10 dias. Quando foi aumentada a fonte de carbono, a população atingiu o mesmo patamar em 5 dias para *E. coli* inclusive linhagem enterotóxica e 8 dias para *E. aerogenes* (CAMPER *et al.*, 1991).

3.4.1- *Escherichia coli*

A bactéria *E. coli* representada na Figura 1, crescida em EMB, é bastante estudada em microbiologia. Recebeu essa denominação em homenagem ao seu descobridor, Theodor Escherich que por regra, teve seu nome latinizado para *Escherichia*. A palavra *coli* vem de *colon* (intestinos). É um bacilo Gram-negativo, simples ou em pares e encapsuladas e com flagelo peritríquio (SHORTER BERGEY'S MANUAL, 1994).

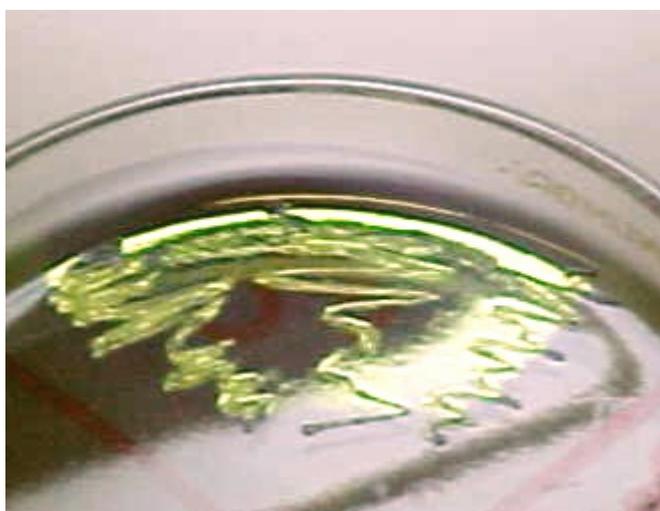


Figura 1 - *E. coli* em meio EMB
Fotografia: Ulrich Vasconcelos

A bactéria faz parte da flora normal da parte mais baixa do intestino de animais de sangue quente (BERGEY'S MANUAL, 1984) e pode também ser

isolada do solo e outros materiais no ambiente, fato de grande significância em águas de consumo e de recreação (STANDING COMMITTEE OF ANALYSTS, 2002).

A bactéria *E. coli* é móvel e anaeróbia facultativa (MIGULA, 1895 *apud* BERGEY'S MANUAL, 1984). Sua temperatura ótima é de 37°C e por fermentação, produz ácidos mistos e gás, em proporções iguais à 44,5°C±0,2°C em 24-48 horas. Além disso, oxida manitol, lactose e outros açúcares, realiza nitrificação, é capaz de produzir indol a partir do triptofano e muitas cepas produzem beta-glucuronidase, usada na identificação com substrato cromogênio (BROCK, 2000).

E. coli é considerada o único coliforme fecal verdadeiro por ser encontrado apenas no trato intestinal de animais de sangue quente (GLEENSON & GRAY, 1997) e, normalmente, é inofensiva. Certas linhagens produzem enterotoxinas que causam diarreia e doenças de origem alimentar chamadas gastroenterites por *E. coli*. Das seis enterotoxinas identificadas, quatro são mais importantes do ponto de vista epidemiológico (Quadro 4). Os fatores enteroagregativo (EAEC) e aderente difuso (DAEC) não têm significância clínica.

Quadro 4 - Fatores diarréicos de virulência em *E. coli*

Fator	Denominação	Aspectos clínicos
EHEC	Entero-hemorrágico	Diarreia sem sangue, colite hemorrágica e síndrome urêmica hidrolítica.
ETEC	Enterotóxico	"Diarreia dos viajantes", dor abdominal, colite hemorrágica, náuseas, cefaléia.
EPEC	Enteropatogênico	Vômitos, diarreia severa e crônica, febre.
EIEC	Enteroinvasivo	Diarreia com sangue, linhagens invadem células do cólon por mecanismo semelhante à <i>Shigella</i> .

Fonte: Standing committee of analysts (2002)

Todas as linhagens causadoras de gastroenterites possuem fímbrias especializadas para se ligarem ao epitélio intestinal. As linhagens com o fator ETEC não são invasivas e as que possuem o fator EHEC (Quadro 4) são as mais agressivas e provocam a síndrome hemoliticourêmica em 90% dos casos. A síndrome hemoliticourêmica é caracterizada por hemonúria, complicações renais, cardíacas e neurológicas, acometendo principalmente crianças e idosos, apresentando uma taxa de mortalidade entre 3 e 10% (TORTORA *et al.*, 2000). O Quadro 5 resume as principais características das gastroenterites por *E. coli*.

Quadro 5 - Características das gastroenterites por *E. coli*

Fator	Reservatório	Transmissão	Tempo de incubação
EHEC	Bovinos e homem	Pessoa-pessoa, alimentos contaminados, água e sucos.	3-8 dias
ETEC	Homem	Alimentos e água	10-12 horas
EPEC	Homem	Mãos contaminadas com fezes	9-12 horas
EIEC	Homem	Alimentos e água	10-18 horas

Fonte: anônimo, Revista Farmácia & Química (2003)

E. coli assim como os demais coliformes, crescem em meios enriquecidos, e podem apresentar contagens acima de 10^9 UFC por grama de fezes de humanos, sendo os bovinos seu principal reservatório. A Tabela 3 apresenta uma relação de animais de sangue quente onde foi realizada uma contagem de *E. coli* em um grama de fezes.

Tabela 3 - Contagem de *E. coli* em 1g de fezes de humanos e alguns animais

Fonte das fezes	Número de amostras	Contagem (UFC/mL)
<u>Mamíferos</u>		
Cachorro	6	4.530 – 1.150.000
Gato	7	330 – 370.000
Porco	10	180 – 410.000
Humanos	12	103 – 827.000
Ratos (em cativeiro)	4	63 – 215
Ovelha	6	60 – 24.300
Gado (no pasto)	6	2 – 817
Cavalo	5	0.6 – 161
Gado (isolado)	4	0.07 – 2
<u>Aves</u>		
Pato	6	33 – 9.000
Galinha	5	17 – 507

Fonte: Wheeler *et al.* (1980)

As reprovações das águas estão relacionadas com a presença das bactérias do grupo coliforme que pode sugerir ou não contaminação de origem fecal. Alguns coliformes podem estar presentes por práticas inadequadas de sanitização e processamento dos produtos ou por re-contaminação (TANCREDI *et al.*, 2002).

A rota de exposição principal é a comida embora a transmissão aconteça por outras vias como contato direto com animais, água ou comida infectadas, pessoa-pessoa em comunidades fechadas ou indivíduos como babás e cozinheiros. *E. coli* é encontrado em tubulações domésticas e em pias de cozinha, sua presença tem grande significância na saúde pública (STANDING COMMITTEE OF ANALYSTS, 2002).

A presença do grupo coliforme e em especial, *E. coli*, indica contaminação recente da água e em geral, não são esperados serem encontrados em águas não poluídas. Mesmo em águas poluídas, com o tempo ocorre um decréscimo na população semelhante ao que acontece com bactérias intestinais patogênicas, o inverso ocorre quando a carga de nutrientes é alta (SANCHEZ & RUOCCO Jr., 2004).

E. coli continua sendo o principal microrganismo responsável por infecções urinárias e está sempre entre os três primeiros organismos encontrados em outros tipos de infecções hospitalares (TORTORA *et al.*, 2000).

3.4.2- *Enterobacter aerogenes*

A bactéria *E. aerogenes* apresentada na Figura 2, crescida em EMB, tem seu nome originado do latim, *énteron* (intestino), *bacter* (bactéria), *aéros* (ar), *gennario* (que gera), isto é, *pequena bactéria do intestino que produz gás*, foi primeiramente denominado *Bacillus aerogenes* (KRUSE, 1896, HORMAECHE E EDWARDS, *et al.*, 1960; 1972 *apud* BERGEY'S MANUAL, 1984). É um bacilo Gram-negativo, com flagelo peritríquio, muito distribuído na natureza; está presente na água, solo e rejeitos (BERGEY'S MANUAL, 1984) e ocasionalmente aparece nas fezes e trato respiratório de humanos (LOIWAL *et al.*, 1999).



Figura 2 - *E. aerogenes* em meio EMB
Fotografia: Ulrich Vasconcelos

Esta bactéria cresce em temperaturas entre 30 e 37°C, é anaeróbia facultativa, fermenta glicose com produção de gás, ácidos mistos e 2,3-butenodiol. A produção de gás e ácidos é na proporção 5:1. A formação de 2,3-butenodiol é uma característica do gênero sendo identificada pelo teste de Voges-Proskauer positivo (SHORTER BERGEY'S MANUAL, 1994).

O gênero *Enterobacter* compreende 15 espécies, tendo *E. aerogenes* como o segundo membro mais encontrado na natureza, perdendo apenas para *E. cloacae* (JALALUDDIN *et al.*, 1998). Nos últimos anos, membros do grupo coliforme vêm sendo responsáveis por infecções hospitalares principalmente do TGI, TGU e do trato respiratório. A resistência a antibióticos vem crescendo causando preocupação no meio médico. Membros do gênero *Enterobacter* causam infecções menos freqüentes e estão principalmente relacionados a neonatais, chamando atenção aos prematuros abaixo do peso normal (LOIWAL *et al.*, 1999).

3.5 - Indicadores de contaminação da água

Além de todas as fontes de contaminação mais conhecidas, a água também pode ser contaminada por pessoas doentes, por animais e por pessoas aparentemente saudáveis (FALCÃO *et al.*, 1993). A qualidade da água que sai das torneiras e bebedouros de residências é semelhante podendo ser contaminada pelo menos com um organismo indicador ou outro organismo patógeno qualquer (LEVESQUE *et al.*, 1994).

As torneiras são um dos maiores fatores de infecções, particularmente por bactérias Gram-negativas. A concentração de cloro ativo encontrado está na faixa de 0,4 e 1,5ppm e se não houver aumento da temperatura ou mudança de pH, não existe atividade bactericida (NAKAJIMA *et al.*, 2003). As enterobactérias são os microrganismos mais comuns e os patógenos oportunistas representam mais de 30% da população encontrada nos sistemas

de distribuição (BARBEAU *et al.*, 1998) em concentrações variando de 10^2 até 10^7 UFC/mL (FERNANDÉZ *et al.*, 2000, MOYES, 2000).

A maioria dos microrganismos presentes na água é inofensiva e a transmissão de doenças por veiculação hídrica está primeiramente relacionada com as características físicas, químicas e biológicas das águas naturais para depois se relacionar com o estado de saúde, idade e condição de higiene dos indivíduos expostos (DANIEL, 2001). As doses infectantes de bactérias entéricas estão entre a faixa de 10^2 a 10^8 UFC/mL (HURST *et al.*, 1997).

A fonte de contaminação também pode ser natural como o clima, topografia, geologia do terreno e incêndios que não poluem propriamente, mas contribuem para sua manutenção. A precipitação de chuvas é talvez a causa mais importante porque concentra e isola as águas nos lagos e reservatórios durante a estiagem e suspende sedimentos na estação chuvosa (DANIEL, 2001).

Para ser considerado como microrganismo indicador de contaminação fecal, devem ser considerados alguns parâmetros (GLEENSON & GRAY, 1997):

- Ser membro exclusivo da flora intestinal normal em indivíduos sadios;
- Ser membro exclusivo de origem fecal quando encontrado no ambiente;
- Ser organismo prevalente em esgotos;
- Ser incapaz de se multiplicar no ambiente aquático ou se multiplicar menos que bactérias entéricas;
- Ser fácil de isolar, identificar e numerar;
- Não deve ser patogênico.

É uma preocupação universal a busca do microrganismo indicador ideal. O controle microbiológico da água na maioria dos países incluindo o Brasil, se baseia na presença de bactérias do grupo coliforme, tendo como princípio que sua ausência garante qualidade e segurança em termos de saúde pública, embora outros organismos mais resistentes podem estar presentes e o exame do grupo coliforme não garantiria a ausência de outros agentes patogênicos.

A contagem de coliformes como indicador de poluição marinha é controvertida porque em águas tropicais, a temperatura média de 35°C é seletiva, além da forte incidência de luz solar que favorece o crescimento de outros patógenos mesmo quando na ausência de coliformes (HAGLER *et al.*, 1986).

Outros microrganismos são propostos como indicadores de poluição com destaque para *Clostridium perfringens* que indica contaminação fecal associada a dejetos humanos. Algumas legislações propõem pesquisa para *P. aeruginosa* como análise complementar (DANIEL, 2001).

Patógenos de origem não fecal como *P. aeruginosa*, são propostos como indicadores da qualidade de águas recreacionais. As fontes de poluição não são resultados apenas de contaminação fecal, a origem pode se dar através da flora presente na urina, pele, nariz e garganta. De acordo com a OMS, *P. aeruginosa* não é transmitida por ingestão e sim por contato (WHO, 2002). Não existe método padronizado para níveis da bactéria como contaminante, sua presença em altas concentrações representa alto risco (FALCÃO *et al.*, 1993).

A bactéria *P. aeruginosa* é utilizada na Europa, como padrão para avaliar controle de qualidade de origem e processo de águas minerais, águas potáveis de mesa, controle de águas tratadas, controle de qualidade de águas recreacionais, principalmente piscinas e avaliação de condições higiênicas de sistemas industriais (SANCHEZ & RUOCCO Jr., 2004).

No Brasil, de acordo com a resolução número 54/00 (BRASIL, 2000) a espécie só é mencionada como parâmetro para aprovação de águas minerais naturais e águas naturais. O consumo de águas minerais aumentou em todo mundo pela preocupação da contaminação e para evitar o gosto e odor desagradável das águas de torneiras (TAMAGNINI & GONZALES, 1997). O crescimento da população e a preocupação com a qualidade da água elevaram o consumo em vários setores da população brasileira chegando a dobrar no final da década de 90. Isto foi reflexo da associação feita ao grau de pureza elevado e por sua aplicação terapêutica e medicinal (TANCREDI *et al.*, 2002).

As águas minerais não são estéreis, porém perdem grande parte das bactérias presentes quando atravessam a superfície de rochas e do solo. Dois

tipos de flora podem ser encontradas nessas águas: os organismos autóctones que estão presentes na fonte e que incluem *P. aeruginosa* e os organismos alóctones, não provenientes da fonte e que aparecem nas etapas de pré-engarrafamento e processamento (TANCREDI *et al.*, 2002).

P. aeruginosa já foi encontrada em águas minerais de vários países incluindo o Brasil. A análise da presença desta bactéria é recomendado na rotina, sendo considerado um bom indicador de que as boas práticas do processo estão sendo cumpridas (RAMALHO *et al.*, 2002).

A presença de *P. aeruginosa* indica que a fonte está poluída por material orgânico ou que a água mineral foi contaminada durante o processo. No período de estoque, o crescimento do microrganismo atinge altos níveis acarretando risco para consumidores, principalmente mais jovens e mais idosos. Em um estudo realizado durante cinco anos com águas minerais de concentrações 72,5mg/L e 382mg/L de sais foi verificado que *P. aeruginosa* atingiu a fase estacionária em aproximadamente 7 dias e permaneceu com células viáveis por todo o período do estudo nos dois casos, confirmando sua incrível capacidade de adaptação a ambientes com poucos nutrientes e indicando sua ocorrência, em altos níveis, entre o 7^o e o 70^o dias, coincidindo com o período onde as garrafas são normalmente compradas e consumidas (LEGANI *et al.*, 1999).

3.6 - *Pseudomonas aeruginosa*

3.6.1 – Características gerais

P. aeruginosa é um bacilo aeróbio estrito Gram-negativo, oxidase positiva, móvel, apresentando um ou mais flagelos polares monotríquios, apresentado na Figura 3. Quando cultivado em meio sólido, apresenta três tipos de colônias: grandes, lisas com centro elevado e bordas lisas; planas ou

pequenas, rugosas e convexas e as do tipo mucosa (BERGEY'S MANUAL, 1984; KONEMAN *et al.*, 2001).

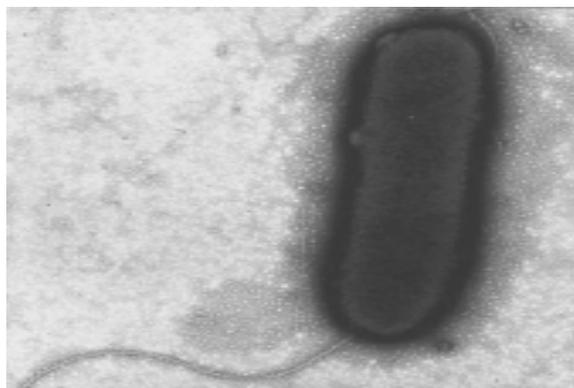


Figura 3 - Fotomicrografia eletrônica mostrando *pili* e flagelo monotríquio
fonte: Tredget *et al.* (2004)

A cor das colônias em meio sólido varia de acordo com o tipo de pigmento produzido, geralmente são azul-esverdeadas, podendo também ser marrom ou mesmo não produzir pigmento (FREITAS & BARTH, 2004).

A colônia possui um odor bem característico, adocicado e semelhante à uva e em meio contendo ceftriaxona produz piocianina, como mostra a Figura 4. Sob UV, produz fluorescência de comprimento de onda de 360 ± 20 nm (HPA, 2003).



Figura 4 - *P. aeruginosa* em agar CET com produção de piocianina.
Foto: Ulrich Vasconcelos

No passado, foi descrita como *Pseudomonas pyocyanea*, *Bacillus pyocyaneus* e também *Bacterium aeruginosarum* (SCHROETER, 1972; MIGULA, 1894; 1900 *apud* BERGEY'S MANUAL, 1984). Seu nome atual, é resultado da junção das palavras grega *pseudés* (falsa) e da latina *monas* (unidade). A denominação *aeruginosa* deriva de *aeruginosus* palavra latina que está relacionada à cor verde escura com algo de azul (PAPAVERO, 1994).

Esta bactéria causa preocupação na comunidade científica por sua extrema versatilidade, poder de adaptação e resistência a vários ambientes e antibióticos. No passado, a partir de observações feitas em 1899, a piocianase, um de seus metabólitos, foi utilizada no tratamento tópico de infecções na forma de colírios e compressas ou como injetáveis e *spray* no tratamento da difteria e na erradicação de *meningococo* na garganta. Mais tarde, por sua elevada toxicidade para uso sistêmico, foi abandonada (TAVARES, 2001).

Wheater *et al.* (1980) isolaram cerca de 3×10^4 colônias de *P. aeruginosa* por 100ml em resíduos domésticos aquosos enquanto que observaram contagem acima de 5×10^5 colônias em resíduos hospitalares sem observar altas contagens para *E. coli*.

Hardalo & Edberg (1997) sugerem a pesquisa de métodos mais sensíveis e específicos para detecção e identificação de *P. aeruginosa* em solo, por conta do risco da transmissão de doenças em pessoas mais susceptíveis como imunocomprometidos e ao público em geral, sujeito também às infecções.

Tamagnini & Gonzales (1997) isolaram *P. aeruginosa* em águas de garrafas plásticas estocadas por 30 dias, verificando ausência de *E. coli* e coliformes totais. Observaram também uma competição entre *P. aeruginosa* e a flora presente na água, ocorrendo um alto crescimento de *P. aeruginosa* quando esta flora não era encontrada.

Sibillea (1998) mostrou que a dinâmica bacteriana em sistemas de distribuição de água é complexa e está relacionada a diversos parâmetros como carbono orgânico dissolvido, presença de resíduos, natureza e estado das tubulações e biomassa livre relativa.

Guilherme & Silva (2000) identificaram a presença de *P. aeruginosa* em 8,9% das amostras de águas de consumo analisadas, sendo 11,6% do total, em águas de hemodiálise; indicando a resistência da bactéria ao cloro e sugere uma inibição do grupo coliforme.

Nascimento *et al.* (2000) verificaram que em 50% das amostras de águas minerais analisadas, a contagem de *P. aeruginosa* foi maior que 1600 UFC/mL e os coliformes totais e fecais apresentaram menos de 3UFC/mL.

D'Áquila *et al.* (2000) observaram que a bactéria *P. aeruginosa* causava interferências nas análises de coliformes e inibição do crescimento dos mesmos em meios de cultura.

De Victorica e Galvan (2001) verificaram que os maiores níveis de risco e poluição estão associados com a estocagem em tanques e com colonização de bactérias nas tubulações e filtros onde altas concentrações de *P. aeruginosa* foram determinadas.

Banning *et al.* (2003) observaram em estudo comparativo de microrganismos que crescem em comunidades mistas nos biofilmes de águas subterrâneas, que a bactéria *P. aeruginosa* possui vantagem sobre *E. coli* e demais membros do gênero *Enterobacteriaceae*, representando portanto, risco à saúde pública.

Sanchez e Ruocco Jr. (2004) afirmam que os coliformes estão sujeitos a interferentes como *P. aeruginosa* que em altas concentrações é responsável por resultados falso-negativos das análises colimétricas.

Espíndola (2004) no estudo de contaminação de aquíferos por necrochorume, observou durante o monitoramento de poços de observação no cemitério da Várzea, em Recife-PE, que as contagens máximas do NMP/100mL foi 23 para coliformes e maior ou igual a 1600 para *P. aeruginosa*, sugerindo uma pesquisa mais aprofundada para verificar o provável antagonismo.

3.6.2 - Ocorrência

A bactéria *P. aeruginosa* encontra-se difundida na natureza e recebeu por vários autores, a definição de bactéria ubíqua. Suas melhores estratégias são a capacidade de metabolizar independente do suprimento de nutrientes e possuir um poderoso arsenal de estratégias de sobrevivência como pigmentos e produção de biofilme (DE VOS *et al.*, 1997).

P. aeruginosa é um organismo que predominantemente tem na água fresca o seu reservatório ideal (WHO, 2003) habitando regiões superficiais a médias da zona limnética, onde pode sobreviver por vários meses à temperatura ambiente (STANDING COMMITTEE OF ANALYSTS, 2002). A vida de uma comunidade aquática depende de vários fatores: concentração de hidrogênio, temperatura, pressão, oxigênio, concentração de íons, fontes de energia, matéria orgânica, fatores de crescimento e moléculas a serem utilizadas como receptores de elétrons e com potencial redox (HUST *et al.*, 1997).

Além da água, a bactéria pode ser encontrada também no solo, plantas e dejetos (DUBOIS, 2001). A incidência em fezes humanas em adultos saudáveis é de 12%. Funcionários de clínicas e hospitais chegam a produzir mais de 10^5 UFC por grama de fezes (WHEATER *et al.*, 1978). Em hospitais, representa um grande fator de risco por conseguir sobreviver em superfícies de materiais inertes e seus reservatórios podem ser pias, equipamentos de ventilação, soluções detergentes, instalações de banheiro e até mãos dos profissionais (DUBOIS, 2001).

Já foi descrita sua presença em alimentos (TSORAEVA & MARTINEZ, 2000), banheiras (HIGHSMITH *et al.*, 1985; HOLLYOAK, 1995), plantas (TODAR, 2002), folhagens (ZAGO *et al.*, 2001), rizosfera (PIRNAY *et al.*, 2002), contaminando canos e sistemas de aquecimento (WHO, 2003), piscinas (BORGMANN-STRAHSEN, 2003), saunas (McNEIL, 2003), aquíferos de cemitérios (MATOS, 2001; ESPÍNDOLA, 2004), água destilada para diluir drogas administradas por via intravenosa (KAYSER *apud* LEGANI *et al.*, 1999),

soluções salinas e água mineral, entre outros (LEGANI *et al.*, 1999; RAMALHO, 2001) onde é considerado um agente infeccioso primário.

A bactéria *P. aeruginosa* pode ser isolada como flora normal da pele, garganta e fezes de indivíduos saudáveis (SHRIVASTAVA *et al.*, 2004) enquanto que em ambientes hospitalares pode ser isolada de aspirado traqueal, escarro, pus, TGU, TGI, entre outros (ERGIN & MUTLU, 1999).

É praticamente encontrada em todos os ambientes aquáticos naturais e artificiais, doces e salgados como também é encontrada em águas poluídas. Os rejeitos de fábricas lançados em corpos de água, principalmente da indústria de papel e têxtil, representam um meio apropriado para seu crescimento. Em um estudo realizado no Canadá, verificou-se que de 96 a 98% das bactérias do gênero *Pseudomonas* isoladas de um rio que recebia esses rejeitos eram *P. aeruginosa* (HENDRY *et al.*, 1982).

Alguns autores classificam as linhagens como clínicas e selvagens, de acordo com os diferentes ambientes onde a bactéria *P. aeruginosa* é isolada (RENDERS *et al.*, 1996), apesar de todas terem origem comum e por condições ambientais desenvolverem certos fenótipos. Alguns autores não fazem a distinção, apoiados pelo mapeamento completo do genoma de *P. aeruginosa* PA01 que serve como referência para examinar diversidade e verificar semelhanças entre isolados (GOODMAN & LORY, 2004).

As linhagens provenientes de águas de esgotos, rios e lagos quando comparadas com linhagens de origem clínica, mostram similaridade e indicam que as características que as tornam virulentas estão mais relacionadas com o estado imunológico do paciente e ao ambiente hospitalar. Desta forma, a bactéria *P. aeruginosa* é um modelo de organismo essencialmente oportunista (ROMLING *et al.*, 1994).

Mesmo tida como modelo de bactéria oportunista, uma teoria sugere que todas as propriedades que fazem a bactéria sobreviver no solo ou água são fatores de seleção natural e não necessariamente para colonizar seres humanos e animais, fazendo da bactéria *P. aeruginosa* uma bactéria extremamente adaptável (ALONSO *et al.*, 1999).

3.6.3 - Versatilidade metabólica, virulência e aspectos clínicos

P. aeruginosa é uma bactéria heterotrófica proteolítica, utiliza a via de Entner-Doudoroff no catabolismo da glicose e tem o oxigênio, e às vezes, nitrato como receptores de elétrons (BROCK, 2000).

A versatilidade nutricional e metabólica é uma de suas principais características. Este microrganismo é capaz de utilizar vários compostos orgânicos em meios desprovidos de fatores de crescimento e até tolerar temperaturas altas como 42°C embora a faixa de temperatura de crescimento esteja compreendida entre 25 e 37°C (SHORTER BERGEY'S MANUAL, 1994, TODAR, 2002).

A bactéria é capaz de resistir às altas concentrações de sais, corantes, antissépticos fracos e aos antibióticos mais utilizados (SHRIVASTAVA *et al.*, 2004). Por serem oligotróficas, têm a capacidade de crescer até em águas minerais (LEGANI *et al.*, 1999) e água destilada onde é evidente a quantidade mínima nutricional (TODAR, 2002) sendo considerada um indicador de baixa concentração de nutrientes (SANCHEZ & RUOCCO Jr., 2004).

Há relatos da capacidade da bactéria utilizar mais de 90 compostos orgânicos diferentes como fonte de energia. Desde compostos alifáticos (BAKER & HERSON, 1994) até compostos aromáticos como o fenol (WRENN, 1998). A habilidade de transformar em energia as moléculas orgânicas por vias metabólicas faz da bactéria *P. aeruginosa* um bom agente de biorremediação (ALEXANDER, 1999).

P. aeruginosa também é resistente a metais pesados, considerados os maiores poluentes da água. Ela utiliza vias como sistema de efluxo, formação de biofilme e reações de oxido-redução com vantagem para as linhagens que vivem em comunidades. A bactéria é menos resistente ao cobre, porém, é capaz de crescer em altas concentrações de cádmio, mercúrio, cobalto, lantânio, lítio e zinco (FILALI *et al.*, 2000; GAIL *et al.*, 2003).

É capaz de multiplicar em grande quantidade de substâncias e prolifera utilizando nutrientes derivados de materiais usados na construção do sistema

de distribuição de água e de instalações domésticas, permanecendo viável e cultivável por longo período mesmo em condições adversas de exposição (TSORAEVA & MARTINEZ, 2000).

Em ambientes artificiais, a contaminação está associada à temperatura e à umidade (WHO, 2003), a água faz os folículos pilosos da pele do homem dilatarem e facilita a entrada das bactérias (TORTORA *et al.*, 2000). Saunas e banheiras quentes garantem as duas exigências necessárias para contaminação e proliferação (McNEIL, 2003). Piscina e outras águas recreacionais são contaminadas por uma grande quantidade microrganismos da pele, saliva e da flora intestinal e genital dos banhistas (BORGMANN-STRAHSEN, 2003).

A análise de *P. aeruginosa* PA01 no chamado de *Pseudomonas Genome Project* concluiu que a bactéria possui um genoma formado por 6.264.403 pares de base, reguladores de funções conhecidas e desconhecidas que preocupam os cientistas por sua grande habilidade metabólica (BOTES *et al.*, 2003).

A versatilidade metabólica promove grande arsenal de mecanismos de virulência que auxiliam a colonização e proliferação no tecido pela bactéria (DEVOS *et al.*, 1997). Tais mecanismos, expressados por 5% dos genes conhecidos (AREVALO-FERRO *et al.*, 2003) estão apresentados no Quadro 6.

Quadro 6 - Principais mecanismos de virulência de *P. aeruginosa*

Adesinas	<i>Pili</i> , Cápsulas de polissacarídeo (glicocálix), biofilme.
Invasinas	Elastase, Protease alcalina, Hemolisinas (fosfolipase e lectinase), Citotoxina, Piocianina, Sideróforos.
Motilidade/ Quimiotaxia	Flagelos.
Toxinas	Exoenzima S, Exotoxina A, Lipopolissacarídeos.
Propriedades anti-fagocitose	Cápsulas, lipopolissacarídeos e biofilme.
Defesa contra reações bactericidas e imunológicas	Biofilme, cápsulas, lipopolissacarídeos e proteases.
Atribuições genéticas	Transdução e conjugação, defesa natural, plasmídios.
Fatores ecológicos	Versatilidade metabólica e nutricional, capacidade de adaptação a qualquer ambiente.

Fonte: Todar (2002)

P. aeruginosa é capaz de produzir diversos fatores de virulência que por vezes estão envolvidos em um sistema de sinalização coordenado célula a célula e de densidade celular dependente, chamado de *Quorum-sensing*, QS (SMITH & IGLEWSKI, 2003). A bactéria sente o ambiente e reage apropriadamente. O sistema de QS foi primeiro descrito no fenômeno de bioluminescência regulado pelo sistema *lux* da bactéria marinha *Vibrio fischeri* (VAN DELDEN & IGLEWSKI, 1998).

A comunicação depende de moléculas auto-indutoras do tipo homoserina-lactona (HSL). Em baixas concentrações celulares, o auto-indutor é secretado em níveis basais se difundindo no meio. Quando a população cresce, sua concentração intracelular aumenta até níveis críticos. O auto-indutor se liga à proteína R específica, formando um complexo que irá

reconhecer seqüência própria do DNA e facilitar a transcrição. Há pelo menos dois sistemas conhecidos não dependentes um do outro que interagem em hierarquia para *P. aeruginosa*. O primeiro sistema conhecido por *las*, é composto de *lasI*, 3-oxo-C12HSL (N-[3-oxo-dodecanoil]-L-homosserina lactona) e o gene *lasR* que codifica a proteína transcripcional. O gene *lasI* é ativado pelo complexo *lasR*/3-oxo-C12HSL e regula formação de elastase LasB, proteinase LasA e exotoxina A (VAN DELDEN & IGLEWSKI, 1998).

O segundo sistema conhecido por *rhl*, é composto de *rhlI*, C4-HSL (N-butiril homosserina lactona) e o gene *rhlR*. Este sistema regula a expressão do operon *rhlAB* que codifica ramnosiltransferases para produção de ramnolipídios e participa da produção de elastase LasB, protease LasA, pirocianina e protease alcalina. O complexo *lasR*/3-oxo-C12HSL ativa a expressão de *rhlR* se ligando a ele e bloqueando a sua ligação a C4-HSL, assim, permite que *P. aeruginosa* ultrapasse defesas específicas do hospedeiro. Quando em alta densidade celular, libera fatores de virulência e alteram o equilíbrio entre defesa do hospedeiro e produção de toxinas (VAN DELDEN & IGLEWSKI, 1998).

São identificados mais de 50 genes regulados pelos sistemas *las* e ou *rhl*. O Quadro 7 apresenta os principais fatores de virulência da bactéria *P. aeruginosa* que envolvem QS.

Quadro 7 – Principais fatores de virulência de *P. aeruginosa* que envolvem *Quorum-Sensing*

Fator de virulência	Referência
<i>Pili</i> tipo IV e flagelos	Goldberg, 2000, Tredget <i>et al.</i> , 2004
Exotoxina A	O'malley <i>et al.</i> , 2003
Hemolisinas	Van Delden & Iglewski, 1998
Exoenzima S	Todar, 2002
Porteases	Van Delden & Iglewski, 1998
Produção de alginato	Van Delden & Iglewski, 1988; Tredget <i>et al.</i> , 2004
Piocinas tipo: R, F e S	Michel-Briand & Baysse, 2002; Parret & De Mot, 2002
Piocianina	Smith & Iglewski, 2003

Acredita-se que o pigmento formado exclusivamente pela *P. aeruginosa* esteja envolvido com as interferências nas análises colimétricas (GUILHERME & SILVA, 2000; TANCREDI *et al.*, 2002). A piocianina, do latim *pio* (pus) e do grego *kýanos* (relativo ao azul escuro), é um pigmento solúvel em água e sua principal função é extrair íon ferro e nutrientes para a sobrevivência da bactéria *P. aeruginosa* (TREDGET *et al.*, 2004).

Há produção de outros pigmentos como pioverdina (amarelo-esverdeado), piomielina (marrom) e aeruginosina (vermelho) (RAMALHO *et al.*, 2002). A Figura 5 apresenta a estrutura molecular da piocianina (hidróxido de 1-hidróxi 5-metil fenazina), um composto fenazínico, biologicamente ativo e funcional na competição entre os organismos. A biossíntese da piocianina ainda não é totalmente compreendida e estudos sugerem uma complexa via de biossíntese de fenazinas com dois *loci* homólogos: *phzA1B1C1D1E1F1G1* e *phzA2B2C2D2E2F2G2* para síntese e de três genes adicionais, *phzM*, *phzS* e *phzH* para conversão dos compostos secundários em piocianina. A regulação

envolve o fenômeno de QS com pelo menos a atuação de dois circuitos, *las* e *rhl*, (MAVRODI *et al.*, 2001).

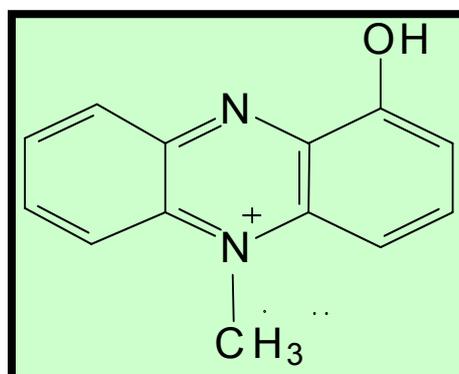


Figura 5 - Fórmula estrutural da piocianina

O mecanismo de ação da piocianina em células procariotas e eucariotas está ligado à capacidade de produzir reações de óxido-redução e formação e acúmulo de superóxido e peróxido de hidrogênio. A piocianina se difunde passivamente pela membrana celular e tanto NADH e NADPH são reduzidos sob condições aeróbicas. Os elétrons são transferidos da forma reduzida da piocianina para superóxido gerando O_2 e H_2O_2 (O'MALLEY *et al.*, 2003).

A depleção de ATP na célula inibe a aconitase, sensível ao superóxido. Tanto aconitase citosólica e mitocondrial são afetadas e diminuem significativamente, a atividade da succinato desidrogenase provocando uma falha no ciclo do ácido cítrico ou na cadeia transportadora de elétrons. As células A549, mais resistentes à ação oxidante, são capazes de metabolizar a piocianina (O'MALLEY *et al.*, 2003).

A maioria dos estudos sobre *P. aeruginosa* e a presença da piocianina se deu com células eucariotas, principalmente nos episódios hospitalares de infecções respiratórias (ERGIN & MUTLU, 1999; LOUREIRO *et al.*, 2002; TODAR, 2002; PAVIANI *et al.*, 2004).

P. aeruginosa é considerada uma bactéria oportunista (DUBOIS *et al.*, 2001), no entanto, não é infecciosa se ingerida, e causa infecções cutâneas e respiratórias através do contato ou inalação de gotículas de água (WHO, 2003),

onde os principais fatores de risco são a idade, sexo, estado imune e estado nutricional (TULLU *et al.*, 1998) assim como duração de catéter (mais de sete dias), duração em UTI (maior de três dias) (POLLACK, 2003) e pacientes hospitalizados mais de uma semana e que utilizam equipamentos por longo período de tempo, o Quadro 8 apresenta as possíveis populações mais atingidas pela bactéria.

Quadro 8 - Grupos de risco para infecções oportunistas por *P. aeruginosa*

Pacientes	Referência
Queimados	De vos <i>et al.</i> (1997), Barbeau <i>et al.</i> (1998), Belba (2002) Audette <i>et al.</i> (2003), Erol <i>et al.</i> (2004). Todar (2002), Brito <i>et al.</i> (2003)
Que necessitam de ventilação artificial	
Imunocomprometidos	
<ul style="list-style-type: none"> • Portadores de câncer • Neonatais • Transplantados • AIDS • Que usam quimioterápicos • Usuários de drogas IV 	<ul style="list-style-type: none"> • Barbeau <i>et al.</i> (1998), • Dubois <i>et al.</i> (2001), Todar (2002) • Loureiro (2002) • Todar (2002), WHO (2003) • Van Delen & Iglewski (1998) • Pollack (2003), Knouse <i>et al.</i> (2002); Hsu (2003) • Pollack (2003), Todar (2002) • Pollack (2003) • WHO (2003), Montelli (2001) • Montelli & Sadatsune (2001) • Montelli & Sadatsune (2001) • Sanchez & Ruocco Jr. (2004)
Diabetes	
Leucemia	
Idosos	
Usuários de corticóides	
Radioterapia	
Lupus eritematoso	
Bronquite crônica	Barbeau <i>et al.</i> (1998)
Pacientes com sonda ou cateter	Tullu (1998), Montelli (2001), Pollack (2003), Knouse <i>et al.</i> (2002)
Pós-operatório	
Diálise	Hsu (2002)
Usuários de lentes de contato	Bharathi <i>et al.</i> (2003)
Fibrose cística	Barbeau <i>et al.</i> (1998), Lyczak <i>et al.</i> (2002), Pollack (2003)
Trauma em geral	Pollack (2003)
Pacientes que sofreram traqueotomia	Pollack (2003)
Estado nutricional	Montelli & Sadatsune (2001)
Nadadores e banhistas	Fields (2002)

3.6.4- Sensibilidade e resistência aos antibióticos

Várias classes de antibióticos são utilizadas no esquema empírico de tratamento conforme mostra o Quadro 9. Esquemas empíricos devem ser evitados em casos de epidemias da bactéria antes de completar um estudo de tipagem genética aliada ao antibiograma (TAVARES, 2001).

A bactéria *P. aeruginosa* é intrinsecamente resistente a antibióticos e a resistência surge durante o tratamento e a terapia combinada apresenta bons efeitos e previne a emergência da resistência (PAVIANI *et al.*, 2003).

Quadro 9 - Esquema empírico de tratamento contra *P. aeruginosa*

Doença	1 ^a . escolha	2 ^a . escolha	3 ^a . escolha
Infecções das vias urinárias	<ul style="list-style-type: none"> • Penicilina de amplo espectro • Cefalosporina • Quinolona 	<ul style="list-style-type: none"> • Aminoglicosídeo • Monobactâmico 	<ul style="list-style-type: none"> • Carbapenema
Pneumonia bacteriana	<ul style="list-style-type: none"> • Penicilina de amplo espectro + Aminoglicosídeo 	<ul style="list-style-type: none"> • Ceftazidima + Aminoglicosídeo • Ciprofloxacina + Penicilina de amplo espectro 	<ul style="list-style-type: none"> • Aztreonam + Aminoglicosídeo • Imipenem

Fonte: Goodman & Gilman (1996)

Empiricamente, o tratamento contra a bactéria *P. aeruginosa* utiliza várias classes de antibióticos: dentre as penicilinas de amplo espectro, a ticarcilina obtém atualmente os melhores resultados. Sua ação bactericida, inibe a síntese da parede celular por se ligar à proteínas específicas que atuam na biossíntese do peptidoglicano (TAVARES, 2001). A bactéria desenvolve resistência cruzada por modificação no sistema de permeabilidade e por produzir beta-lactamases de várias classes contra penicilinas e outros agentes beta-lactâmicos (PANZIG *et al.*, 1999; PELLEGRINO *et al.*, 2002).

A ceftadizima, uma cefalosporina de terceira geração, foi considerada por muito tempo, o antibiótico mais eficaz. A sua ação bactericida é pela inibição da síntese dos peptidoglicanos formadores da parede celular

(TAVARES, 2001). O sistema de resistência à cefalosporinas segue a produção de beta-lactamases, penicilinases de amplo espectro (PELLEGRINO *et al.*, 2002).

Dentre os aminoglicosídeos, os antibióticos mais utilizados são a gentamicina, tobramicina e amicacina. A ação é bactericida, por alterar as proteínas formadoras da célula bacteriana quando o antibiótico se liga à subunidade 30S do ribossomo bacteriano. Também pode ser bacterioestática por inibir síntese protéica. A crescente resistência à gentamicina é adquirida por transferência de fatores R por conjugação, provocando impermeabilização à droga e por mutação ocorrendo produção de enzimas inativadoras e alterações no ribossomo. O sistema de efluxo MexXY-OprM tem papel importante na resistência a aminoglicosídeos (HOCQUET *et al.*, 2003).

O imipenem, uma carbapenema, tem por propriedade inibir a síntese da parede celular. A resistência acontece por desenvolvimento de carbapenemases, de origem cromossômica ou plasmidial (PAVIANI *et al.*, 2003) e também está relacionada com modificações no canal porínico D2 que impede a penetração da droga (TAVARES, 2001).

Dentre as fluorquinolonas, o norfloxacin e o ciprofloxacino são as drogas de escolha em septicemias, infecções respiratórias e urinárias provocadas por *P. aeruginosa* (TAVARES, 2001). Acredita-se que a resistência às quinolonas ocorre por super expressão dos sistemas de efluxo Mex-CD-OprJ e MexEF-OprN. Outras mutações em regiões dos genes que determinam resistência a quinolonas como os genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE* são um fenômeno crescente em todo mundo (HOCQUET *et al.*, 2003).

3.7 - Relações de antagonismo

A competição é um processo natural onde organismos sofrem tentativas de coexistir dentro de um mesmo nincho ecológico e acontece quando o número da população é muito elevado para que possam habitar o mesmo local.

As interações entre espécies não são fixadas na natureza e geralmente a relação é benigna (HURST *et al.*, 1997).

O antagonismo acontece quando se pode artificialmente, limitar o processo de crescimento por esterilização ou desinfecção microbiológica ou quando dois microrganismos vivem em um mesmo ambiente e um deles produz alguma substância que inibe o crescimento do outro. Essas substâncias podem ser de várias naturezas: enzimas, ácidos orgânicos ou antibióticos, entre outros (BROCK, 2000).

Geralmente o antagonismo não está ligado a um único mecanismo de ação e sim com associações de mecanismos como antibiose, competição por nutrientes, interação direta com o patógeno, predação ou indução de resistência (MENDES, 1999).

Em um ambiente aquático são vários os fatores que permitem a caracterização do fenômeno, tais como: temperatura, pH, nível de nutrientes, presença de oxigênio, atividades predatórias e concentração da população (BENNING *et al.*, 2003).

Em comunidades mistas que vivem em competição em águas subterrâneas sob biofilmes, em certas condições, ocorre uma limitação do potencial de sobrevivência de enterobactérias patógenas enquanto que a bactéria *P. aeruginosa* leva vantagem sobre *E. coli* pela sua grande versatilidade metabólica (BENNING *et al.*, 2003).

O fenômeno de antibiose pode ser bacteriostático, bactericida ou bacteriolítico. A produção de bacteriocinas também está relacionada com a defesa do microrganismo num fenômeno conhecido como resistência à colonização, principalmente em biofilmes. Pouco ainda se conhece sobre este tipo de interação porque até hoje, as relações benéficas entre microrganismos foram mais estudadas (TAIT & SUTHERLAND, 2002).

3.8 - Sobre legislação

A organização mundial de saúde utiliza parâmetros microbiológicos, químicos e radiológicos para a qualidade da água e serve de base para as demais legislações no mundo. O *Guidelines for drinking water quality* divide as análises em quatro grupos de monitoramento para amostragem: análises constantes, análises periódicas, análises ocasionais e para situações especiais em caso de acidentes. São recomendadas pesquisas de 17 parâmetros inorgânicos, 27 orgânicos, 33 pesticidas e 17 desinfetantes e correlatos sem especificar pesquisa para vírus e parasitas porque considera o alto custo em uma rotina para laboratórios (GLEENSON & GRAY, 1997).

Na Europa, a água de consumo é definida pela diretiva 98/83/EC como sendo toda água em seu estado natural ou quando tratada, usada para beber, cozinhar ou qualquer outro uso doméstico originada ou não de sistema de distribuição e também qualquer água para uso de produção de alimentos ou qualquer outro produto que o homem seja o consumidor final.

Como padrão microbiológico, a bactéria *E. coli* é o principal indicador, outros microrganismos aparecem com a sugestão de inclusão se o país membro identificar como apropriado. Aparecem nesta lista entre outros, *C. perfringens* e *P. aeruginosa*, indicada para águas envasadas conforme norma da ISO 12780 (COUNCIL OF THE EUROPEAN UNION, 1998).

A legislação americana, também aplica os coliformes como indicadores de poluição e sugere como métodos de pesquisa a técnica dos tubos múltiplos, membrana filtrante e a técnica da presença e ausência (GLEENSON & GRAY, 1997).

No Brasil, desde 1907, o código das águas foi apresentado e levou 30 anos para ser sancionado no decreto lei nº 24.643 de 1937 durante período de extremo nacionalismo. O código era moderno e previa responsabilidade criminal e custeamento dos infratores para reparos aos danos causados além da preocupação com habitantes de regiões onde a água seria aproveitada

como fonte de energia. O poder era centralizado e não havia planejamento para combate à poluição, desconforto hídrico e conflitos de uso (IPB, 2004).

O código das águas deu como frutos como a criação do Conselho Nacional das Águas, o Ministério das Minas e Energia e a atual lei nº 9.433/97 que descentralizou as responsabilidades e instituiu a política nacional dos recursos hídricos, criando conselhos e agências, entre elas a Agência Nacional da Água em 2000 (BRASIL, 1997).

A resolução nº 20/86 do CONAMA classifica as águas no Brasil e agrupa as águas doces em cinco classes, conforme mostra o Quadro 10. São consideradas águas doces, as que apresentarem salinidade igual ou menor que 0,5% (CONAMA, 1986).

Quadro 10 - Classificação das águas doces no Brasil e suas aplicações

Classe	Abastecimento doméstico	Proteção de comunidades aquáticas	Recreação	Irrigação	Aqüicultura	Outros
Especial	Sem prévia ou com simples desinfecção	Sim				
1	Após tratamento simplificado	Sim	Contato primário*	Hortaliças cruas e frutas rentes ao solo	Sim	
2	Após tratamento convencional	Sim	Contato primário*	Hortaliças e plantas frutíferas	Sim	
3	Após tratamento convencional			Culturas arbóreas, cerealíferas e forrageiras		Dessedentação de animais
4						Navegação, harmonia paisagística e outros usos.

* Natação, esqui aquático e mergulho
Fonte: CONAMA (1986)

De acordo com o artigo 2 da resolução 274/00 do CONAMA, a balneabilidade das águas é classificada em duas categorias: próprias e impróprias. *E. coli* e enterococos são utilizados como parâmetros de poluição. A Tabela 4 apresenta a classificação das águas próprias para recreação

quando em 80% ou mais das amostras coletadas 5 semanas anteriores são semelhantes à novas amostras colhidas no mesmo local.

Tabela 4 - Classificação das águas próprias para recreação

Denominação	<i>E. coli</i> /100mL	Enterococos/100mL
Excelente	200	25
Muito boa	400	50
Satisfatória	800	100

Fonte: CONAMA (2000)

São consideradas impróprias quando não se enquadram nos valores da Tabela 4, ou quando existirem incidências de enfermidades, recebimento de valas de esgoto, resíduos sólidos e líquidos, pH menor que 6 ou maior que 9 e presença de parasitas ou hospedeiros intermediários (CONAMA, 2000).

De acordo com a Portaria n° 518/04 é dever do nível federal promover e acompanhar a vigilância da qualidade da água de consumo humano. São estabelecidos padrões microbiológicos, físico-químicos e radiológicos. Como padrão microbiológico de potabilidade de água para consumo humano, isto é, fontes naturais, poços, nascentes entre outros, é exigida a ausência de coliformes termotolerantes em 100mL de amostra. A detecção de *E. coli* é preferencialmente adotada.

Para as águas de fontes alternativas como carros-pipa, deve-se realizar tratamento de desinfecção e filtração além de garantir exclusividade do veículo para transporte do produto. A portaria também recomenda pesquisa por outros organismos patogênicos como enterovirus, cistos de *Giardia ssp.* e oocistos de *Cryptosporidium sp.* (BRASIL,2004).

Já a Resolução n° 54/00 que regulamenta a qualidade da água mineral e natural exige como limites mínimos a ausência de *E. coli* em 100mL da amostra e menos que 1UFC, menos que 1,1NMP/100mL ou ausência de

coliformes totais, enterococos, *P. aeruginosa* e clostrídios em 100mL da amostra como características microbiológicas.

A quarta edição da Farmacopéia brasileira classifica as bactérias *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella sp.* como patógenos que devem estar ausentes em produtos farmacêuticos não estéreis e matérias-primas de uso direto na fabricação. De acordo com a via de administração do insumo, os gêneros *Pseudomonas*, *Escherichia* e *Enterobacter* são citados, entre outros, como indesejáveis (F. BRAS. IV, 1988).

A lei estadual nº 11.426/97 dispõem a política de recursos hídricos no estado e está fundamentada nos princípios da lei federal nº 9.433/97 em todos os seus aspectos legais. A lei nº 11.427/97 rege a conservação e proteção das águas subterrâneas assim como concessão de uso, gestão e cadastros de poços com fiscalizações e penalidades para garantir a vigilância e a interação entre os municípios que têm por obrigação sistematizar análises e interpretar os dados gerados por responsáveis pelo controle, seja na forma de auditorias, fiscalizações, amostragens e outros para garantir a qualidade da água de consumo humano, alertando a população e fornecedores dos possíveis riscos que venham a acontecer e participando ativamente do processo de correção das anomalias e não conformidades detectadas (PERNAMBUCO, 1997).

São consideradas as metodologias para análises de parâmetros microbiológicos da água no Brasil, as que contam na edição mais recente do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* ou das normas publicadas pela ISO, *International Standardization Organization* (BRASIL, 2004).

Segundo relatório da OMS, a bactéria *E. coli* é o parâmetro primário de importância no monitoramento microbiológico da água e admite que a contagem de bactérias heterotróficas pode indiretamente servir de alerta de contaminação se a contagem for muito alta (WHO, 2002).

De acordo com o mesmo relatório, a bactéria *P. aeruginosa* deve ser usada como controle de qualidade para águas envasadas porque de acordo

com levantamentos bibliográficos e ensaios, não foram encontradas evidências entre a bactéria e infecções gastrointestinais usando a água como rota de exposição (WHO, 2002).

Um ano antes, cinco casos de gastroenterite secundária por *P. aeruginosa* tendo a água como veículo, foram relatados no México. Na ocasião, sugeriu-se inclusão da bactéria como indicadora de contaminação naquele país (DE VICTORICA & GALVAN, 2001).

O próprio relatório da OMS reconhece o relato e confirma que espécies inclusas no grupo das bactérias heterotróficas, causam infecções em populações vulneráveis. O aumento de imunocomprometidos no mundo é motivo de preocupação e a água não está livre de bactérias não intestinais e oportunistas como *P. aeruginosa* (WHO, 2002).

A bactéria *P. aeruginosa* deve estar ausente em hospitais, centros médicos, centros de diálise e clínicas odontológicas. É recomendado que estes locais possuam um sistema de tratamento. A OMS sugere que investigações futuras devem ser realizadas principalmente com relação à exposição por aerossóis e que bactérias como *P. aeruginosa*, comuns ao ambiente e ocasionalmente encontradas em corpos de água, estão relacionadas com infecções de alto risco para a população (WHO, 2002).

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – Coleta e amostragem

Foram estudadas linhagens de *P. aeruginosa* e do grupo coliforme isoladas de amostras de águas brutas (sem tratamento), águas residuárias e águas tratadas do sistema de abastecimento. As amostras de águas cloradas ou que sofreram algum tipo de tratamento, foram coletadas em frascos estéreis contendo 0,1mL de uma solução de tiosulfato de sódio 10%. Para as amostras de águas residuárias, os frascos continham 0,3mL de uma solução de EDTA 15% (APHA, 1998).

As amostras de águas tratadas foram coletadas em torneiras de escolas, creches e residências, pelos alunos da disciplina Análises Bacteriológicas da Água.

As amostras das águas brutas foram coletadas em poços de observação (PO) construídos entre fevereiro e abril de 2003 no interior do Cemitério da Várzea, Recife-PE (ESPÍNDOLA, 2004). Fisicamente, os poços de observação são tubulações profundas, revestidas de PVC de duas polegadas, com bases fechadas e elevação de 60cm acima do nível do solo.

O PO1, está localizado na quadra 12 do cemitério onde a idade dos sepultamentos varia de um ano ou menos. Possui 8m de profundidade e se encontra em terreno arenoso constituído de matéria orgânica por todo o trajeto. O PO2 está localizado na quadra 1, reservada para sepultamentos realizados há dois ou mais anos e agrega compartimentos pré-moldados, possui 9,5m de profundidade e está sobre terreno silte-arenoso nos primeiros metros e arenoso siltoso em sua grande parte, sendo encontrada pouca matéria orgânica. O PO3 está localizado na quadra 02, destinada ao sepultamento de crianças, possui 9m de profundidade e está localizado em solo arenoso. Por conta da baixa freqüência de sepultamentos, apresenta pouca matéria orgânica disponível no solo.

As amostras de águas nos poços de observação no Cemitério da Várzea foram coletadas com o auxílio de coletores plásticos do tipo beiler (Figura 6), previamente lavados e desinfetados com álcool 70%. Para que houvesse homogeneização da amostra, o coletor, amarrado a um cordão de nylon de 5m, foi introduzido por cinco vezes no Poço de Observação, sendo a água coletada, descartada. A coleta se deu na sexta vez quando a amostra de água foi transferida para frascos de vidro esterilizados, com capacidade de 500mL da amostra (ESPÍNDOLA,2004).



Figura 6 - Amostra de água sendo coletada com coletor do tipo beiler no Poço de Observação 2

As amostras de águas residuárias foram coletadas em três pontos das lagoas de tratamento do Aterro Sanitário da Muribeca no município de Jaboatão dos Guararapes-PE: na entrada do chorume na lagoa de decantação, no poço que recebe material das lagoas facultativas 1 e 2 e no ponto de intercessão das lagoas de tratamento bioquímico como mostra a Figura 7.

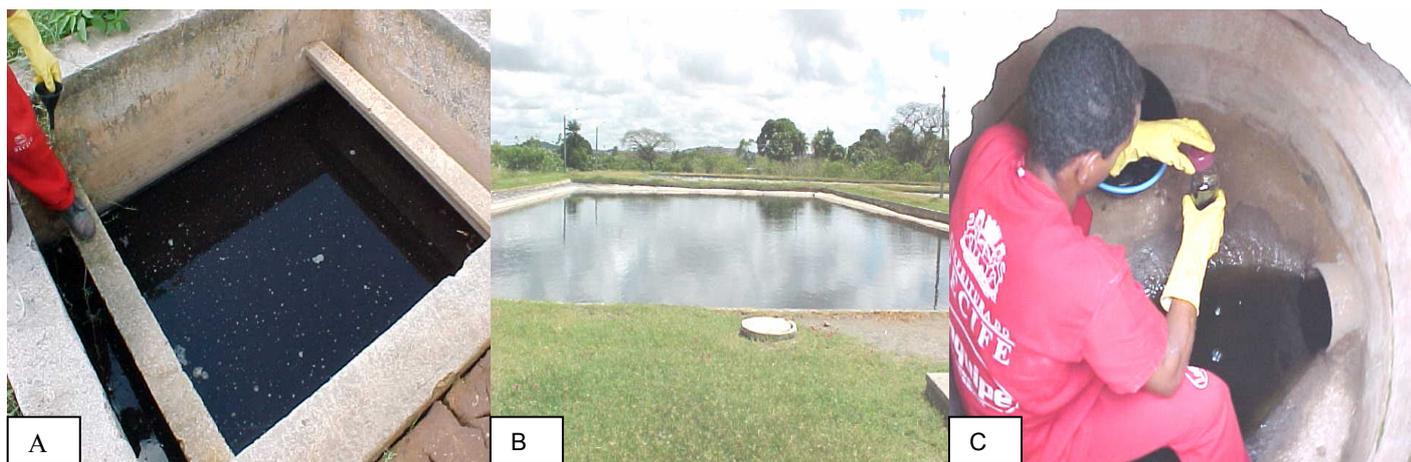


Figura 7 -Pontos de coleta no Aterro Sanitário da Muribeca: poço de entrada do efluente (A), lagoa facultativa F1 (B) e poço de encontro das saídas das lagoas de tratamento bio-químico que desembocam no Rio Jaboatão (C).

4.2 – Isolamento de *P. aeruginosa* de águas brutas e residuárias

O teste foi realizado em duas etapas denominadas: ensaio presuntivo e ensaio confirmativo. O ensaio presuntivo foi realizado com tubos contendo caldo asparagina (Figura 8A) o qual se baseia no crescimento do microrganismo com a formação de fluorescência vista sob UV ($360\pm 20\text{nm}$), como mostra a Figura 8B, após incubação à $35\pm 2^\circ\text{C}$ por 24-48h. O ensaio confirmativo foi realizado a partir dos resultados da fase presuntiva. O teste se baseia na capacidade da bactéria produzir amônia e ácido acético a partir de acetamida e a mudança do pH do meio, a qual é evidenciada pela alteração da cor de laranja para rosa intenso no resultado positivo como mostrado na Figura 8C.

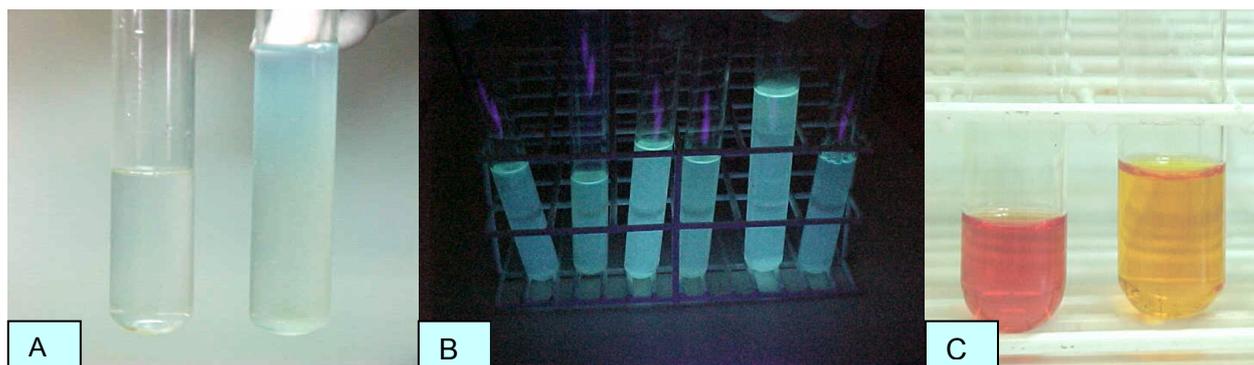


Figura 8 - Meios para determinação de *P. aeruginosa*: A- Caldo asparagina estéril (à esquerda) e caldo asparagina positivo (à direita); B- Fluorescência dos caldos asparagina, observada sob UV e em C- caldo acetamida positivo (à esquerda)

Com auxílio de uma alça de inoculação, foram aplicadas duas alçadas a partir de uma profundidade de 2,5cm dos tubos positivos do teste presuntivo para tubos contendo caldo Acetamida. A incubação foi realizada em estufa à $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24-48h.

4.3 – Quantificação de *P. aeruginosa* em águas brutas e residuárias

A quantificação de *P. aeruginosa* nas amostras de águas dos poços de observação do Cemitério da Várzea e do Aterro Sanitário da Muribeca, foi realizada utilizando a técnica dos tubos múltiplos para determinação do número mais provável. O NMP/100mL é uma estimativa de densidade de uma população em uma amostra, calculada a partir da combinação de resultados positivos e negativos obtida mediante método com base no número de diluições necessárias para fornecer uma estimativa de 95% de probabilidade de uma população bacteriana conter um número de indivíduos estatisticamente mais provável, expresso em uma Tabela (ANEXO A). A técnica empregada utilizou uma série de 5 tubos contendo alíquotas de 10, 1 e 0,1mL da amostra diluída em 10mL dos meios presuntivos e confirmativos

para a bactéria *P. aeruginosa* de acordo com o recomendado pelo *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 1998).

As amostras das águas residuárias foram diluídas em uma solução tampão de potássio e magnésio, para aplicação das alíquotas aos tubos e realização da leitura do NMP. Foram realizadas diluições decimais na maioria das amostras para que a estimativa do NMP fosse um valor numérico menor que o valor máximo da tabela de Hoskins (≥ 1600).

4.4 – Microrganismos teste

O estudo compreendeu ao todo, 16 linhagens de *P. aeruginosa*, e duas linhagens de coliformes, sendo uma de *E. coli* e uma de *E. aerogenes*. Foram utilizadas como culturas padrão, *P. aeruginosa* ATCC 2853, *E. coli* ATCC 25922 e *E. aerogenes* ATCC 15012 da coleção UFPEDA.

4.4.1 - Caracterização bioquímica das linhagens de *P. aeruginosa*

Foram utilizadas 20 linhagens de *P. aeruginosa*, isoladas de águas tratadas de abastecimento, águas brutas e águas residuárias. A seleção das linhagens se deu de acordo com a definição da bactéria *P. aeruginosa* pela HPA (2003), descritas nas seções 4.4.1.1 a 4.4.1.3.

4.4.1.1 – Caracterização bioquímica de *P. aeruginosa* em cetrimida com produção de pigmento

O brometo de cetiltrimetilamônio é um detergente catiônico que inibe o crescimento das bactérias por destruir sua parede celular. A especificidade do meio para *P. aeruginosa* é de 95% (TSORAEVA & MARTÍNEZ, 2000). O agar CET (Acumedia manufactures, Maryland) é um meio seletivo, na forma de pó fino, amarelo claro e odor característico. A reconstituição foi realizada em frasco Erlenmeyer conforme recomendação do fabricante e depois de autoclavado, foram distribuídas porções de 10mL em placas de Petri. Além do poder inibitório para as bactérias em geral, o agar CET, por conta de sua composição, permite o desenvolvimento de piocianina e fluoresceína.

Para todas as linhagens o teste foi realizado semeando-se a cultura por esgotamento sobre a superfície do agar CET partindo-se de uma alíquota do tubo acetamida positivo ou dos tubos contendo meio AN inclinado no caso dos isolados de doação. A cultura padrão foi igualmente testada. As placas foram incubadas à 35°C por 24h para verificação da formação do pigmento amarelo esverdeado.

4.4.1.2- Teste da oxidase

Foram utilizadas fitas para o teste de oxidase (Probac do Brasil, São Paulo). Este teste é baseado na presença de citocromo-oxidase, enzima oxidativa da cadeia respiratória necessária para a reação:



O citocromo C pode ser substituído por substratos artificiais e na presença do oxigênio atmosférico são oxidados pela citocromo-oxidase

formando um composto colorido. A bactéria *E. coli* foi usada como controle negativo do teste, por não possuir tal enzima. Com auxílio de um bastão de vidro foi retirada pequena amostra da colônia crescida em AN por 24h à $35\pm 2^\circ\text{C}$ e foi tocada sobre a fita. Neste teste, a reação foi considerada positiva quando, no máximo em 2 minutos de observação, houve o aparecimento de coloração rosa.

4.4.1.3- Fluorescência em UV (360 ± 20) nm

O teste é baseado na capacidade da bactéria de produzir pigmentos fluorescentes em comprimento de onda de $360\pm 20\text{nm}$. Em uma sala escura, foi aplicada radiação ultravioleta diretamente sobre os tubos contendo caldo ASN-D, ASN-S e sobre as placas de Petri contendo *P. aeruginosa* crescidas por 24h à $35\pm 2^\circ\text{C}$ em agar CET. Foi utilizada para o teste uma lâmpada UV portátil para detectar fluorescência, Mikrobiologie (Merck, modelo 13703), de 4W e comprimento de onda de 366nm.

4.5 – Seleção das linhagens de *P. aeruginosa*

As linhagens de *P. aeruginosa* foram confirmadas quando cresceram e formaram pigmento em agar CET, negativas para o teste da oxidase e produziram fluorescência em UV (366nm) e estão apresentadas no Quadro 11. As linhagens foram identificadas pela letra P, seguida de algarismo arábico e foram divididas em dois grupos de acordo com origem: selvagem (P1, P2, P3, P5, P7, P8, P9, P10, P11, P13, P14, P15 e P16) e clínica (P4, P6 e P12). Os isolados P4 a P7 correspondem a linhagens gentilmente doadas pelo Laboratório de Físico-Química e Microbiologia de Alimentos do ITEP (Instituto de Tecnologia de Pernambuco).

Quadro 11 - Origem das linhagens de *P. aeruginosa* e parâmetros analisados

Linhagem	Água de origem	Origem clínica	tratamento	Data da coleta	pH	CT ¹	CTT ²
P1	Poço de Observação 1 (Cemitério da Várzea)	Não	Não	07/01/2004	7,2	-	-
P2	Poço de Observação 2 (Cemitério da Várzea)	Não	Não	07/01/2004	6,5	+	-
P3	Poço de Observação 3 (Cemitério da Várzea)	Não	Não	07/01/2004	6,2	+	-
P4	Dialisato (saída da torneira)	Sim	Sim	18/02/2004	ND	+	ND
P5	Água mineral (saída do poço)	Não	Não	18/02/2004	ND	-	-
P6	Hospitalar (saída do poço)	Sim	Sim	18/02/2004	ND	+	ND
P7	Poço (indústria)	Não	Sim	18/02/2004	ND	NR	NR
P8	Torneira de bebedouro (escola)	Não	Sim	16/02/2004	6,9	+	-
P9	Torneira de bebedouro (escola)	Não	Sim	16/02/2004	7,1	+	+
P10	Torneira da cozinha (escola)	Não	Sim	12/02/2004	7,5	+	-
P11	Torneira da cozinha (creche)	Não	Sim	03/03/2004	6,9	+	+
P12	Hospitalar (sonda)	Sim	Sim	15/03/2004	ND	ND	ND
P13	Torneira da pia de banheiro (campus)	Não	Sim	07/06/2004	ND	ND	ND
P14	Aterro sanitário (entrada do efluente)	Não	Não	05/07/2004	ND	ND	ND
P15	Aterro sanitário (saída do efluente)	Não	Não	05/07/2004	ND	ND	ND
P16	Poço (indústria)	Não	Sim	12/07/2004	ND	ND	ND

¹ coliformes totais

² coliformes termotolerantes

NR- análise não realizada

ND- não disponível

Uma série de plaqueamentos por esgotamento em AN foram realizados com o objetivo de confirmar a pureza das culturas antes da submissão aos testes. O mesmo critério de seleção foi adotado para as demais linhagens da bactéria *P. aeruginosa* utilizadas no estudo. A manutenção foi feita com repiques mensais em tubos de ensaio contendo meio AN e estocadas à 15°C.

4.6 – Coliformes (*E. coli* e *E. aerogenes*)

Para o isolamento dos coliformes, foram utilizadas 6 amostras de águas de abastecimento, coletadas por alunos da disciplina Análises Bacteriológicas

da Água. Foi adotado para *E. coli* como critério de isolamento, quando na amostra de água, obrigatoriamente *P. aeruginosa* estivesse ausente em 100mL da amostra, evitando o contato prévio entre os dois microrganismos. Para a escolha de *E. aerogenes*, o critério considerou a amostra da água com a presença de coliformes totais e ausência de coliformes termotolerantes, assim como *P. aeruginosa* em 100mL da amostra.

4.6.1 – Caracterização bioquímica dos coliformes

A identificação dos coliformes totais foi realizada em CLBVB. O teste é baseado no princípio que os coliformes são capazes de crescer na presença de sais biliares à $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ produzindo gás, ácido e aldeído a partir da lactose entre 27 e 48h. Foram retiradas alíquotas do material positivo do teste presuntivo de uma profundidade de 2,5 cm e transferidas para tubos de ensaio contendo o meio confirmativo CLBVB posteriormente incubados por 24-48h à $35\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Para a identificação de *E. coli* termotolerante, foi utilizado o meio EC. A técnica se baseia na capacidade da bactéria utilizar sais biliares e crescer em temperatura mais elevada ($44,5^{\circ}\text{C}\pm 0,2$) em 24h. Com auxílio de uma alça de inoculação, foram transferidas alíquotas dos tubos positivos do teste presuntivo para tubos contendo o meio EC que são deixados em banho-maria para verificação do crescimento (turvação) com formação de gás.

Foram realizados ensaios complementares para confirmação em meio sólido e testes bioquímicos complementares para confirmar os gêneros *Escherichia* e *Enterobacter*, descritos nas seções 4.6.1.1 e 4.6.1.2.

4.6.1.1 – Cultivo em meio sólido diferencial EMB

O meio EMB (*Eosin Methylene Blue agar* ou agar eosina-azul de metileno) é um meio seletivo e diferencial para bactérias Gram-negativas. O azul de metileno inibe as bactérias Gram-positivas enquanto que a eosina responde à mudança de pH. Como bactérias do grupo coliforme são fermentadores e acidificam o meio, diversas colorações características são produzidas. A bactéria *E. coli*, por exemplo, forma colônias verdes metálicas de brilho intenso enquanto *E. aerogenes* forma colônias típicas, cor de rosa e com um ponto escuro ao centro (BROCK, 2000).

Com auxílio de alça de inoculação, alíquotas foram transferidas dos tubos de CLBVB ou meio EC positivos e semeados por sobre a superfície do meio EMB. Após incubação à $37\pm 2^{\circ}\text{C}$, por 24h, as linhagens foram identificadas de acordo com a característica típica de cada espécie, em estudo.

4.6.1.2 - Testes bioquímicos complementares

Foram realizados quatro testes bioquímicos: indol, vermelho de metila (*Methyl red*), Voges-Proskauer e citrato - IMViC, realizados de acordo com APHA (1998) para diferenciação dos gêneros *Escherichia* e *Enterobacter*.

O teste do Indol é baseado na capacidade de *E. coli* degradar triptofano. Cerca de 98% da espécie é indol positivo. A cultura pura foi inoculada e incubada à $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ em caldo triptofano. Após 24h, 0,3mL da solução reagente de p-dimetil aminobenzaldeído foi adicionada ao tubo que ficou em repouso por 10 minutos para verificar a formação de coloração vermelha escura na superfície do anel amílico.

O teste vermelho de metila determina a habilidade da bactéria *E. coli* produzir ácidos e outros produtos de degradação da glicose. Praticamente 100% do gênero *Escherichia* têm resultado positivo. Os tubos foram

inoculados e incubados por 5 dias à $35\pm 2^{\circ}\text{C}$. Ao final do período, foram adicionadas gotas da solução indicadora, vermelho de metila, sendo esperada uma formação de coloração vermelha como resposta positiva.

O teste Voges-Proskauer caracteriza a formação de acetoína a partir da glicose pelo gênero *Enterobacter*. As culturas foram inoculadas e incubadas à $35\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 48h. Em seguida, foi adicionada uma alíquota de 1mL da cultura as soluções indicadoras de α -naftol e KOH 40%, agitou-se bem e após 5 minutos foi observada a formação ou não de pigmentação rosa.

Para o citrato, foi utilizado o meio de Simmons em tubo. Com auxílio de alça, as culturas foram inoculadas e posteriormente incubadas por 48h à $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ para verificação da manutenção da coloração verde ou da formação de coloração azul.

4.7 – Seleção das linhagens dos coliformes

De acordo com a confirmação dos microrganismos nos testes bioquímicos e de acordo com o critério de escolha dos coliformes, isolados de amostras de água de abastecimento, uma linhagem selvagem de *E. coli* e *E. aerogenes*, respectivamente, foram selecionadas e estão apresentadas no Quadro 12. As linhagens dos coliformes selvagens são identificadas neste trabalho pelas letras maiúsculas das iniciais do gênero e da espécie seguido de algarismo arábico.

Quadro 12 - Origem das linhagens dos coliformes e parâmetros analisados

Linhagem	Água de origem	Tratamento	Data da coleta	pH	CT ¹	CTT ²	PA ³
EC1	Torneira da cozinha (creche)	Sim	03/03/2004	7,0	+	+	-
EA1	Torneira do pátio externo de uma residência	Sim	03/03/2004	6,2	+	-	-

¹ coliformes totais² coliformes termotolerantes³ *P. aeruginosa*

Uma série de plaqueamentos por esgotamento, em AN, foram realizados com o objetivo de confirmar a pureza das culturas selvagens e padrão, antes da submissão aos testes. A manutenção foi feita com repiques mensais em tubos de ensaio contendo meio AN e estocadas à 15°C.

4.8 - Antibiograma

O antibiograma foi realizado baseado no método de difusão em disco de Kirby-Bauer modificado (ACAR & GLODSTEIN, 1986). O teste utilizou discos para antibiograma (Sensidisc-DME, São Paulo), aplicados sobre o agar, onde se encontra um tapete das culturas da bactéria *P. aeruginosa* a serem testadas. A sensibilidade do organismo ao antibiótico foi indicada pela formação da zona de inibição em volta do disco como mostra a Figura 9.

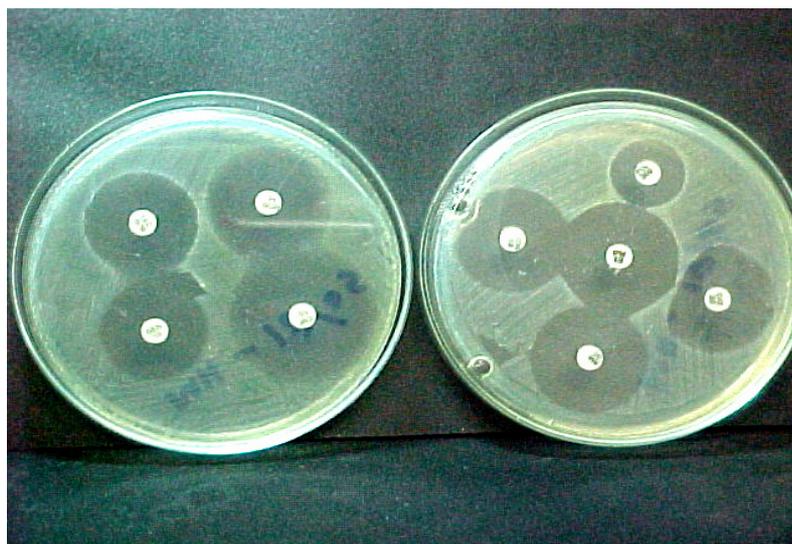


Figura 9 – Halos de inibição formados no antibiograma

A escolha dos antibióticos seguiu o esquema empírico do tratamento contra *P. aeruginosa* em infecções respiratórias e urinárias (GOODMAN & GILMAN, 1996; TAVARES, 2001). Baseado na literatura sobre os melhores agentes quimioterápicos utilizados no tratamento incluindo para cepas mais resistentes foram selecionadas as drogas: ticarcilina/clavulanato (TAC) 75/10µg, ceftazidima (CAZ) 30µg, amicacina (AMI) 30µg, gentamicina (GEN) 10µg, tobramicina (TOB) 10µg, imipenem (IPM) 10µg, ciprofloxacino (CIP) 5µg e norfloxacino (NOR) 10µg. A polimixina B (POL) 300u, foi utilizada como controle, pois todas as linhagens de *P. aeruginosa* são sensíveis à esta droga (MENON *et al.*, 2003).

Todas as 16 linhagens selvagens de *P. aeruginosa* e a linhagem padrão *P. aeruginosa* ATCC 27853 foram testadas. Inicialmente, foram repicadas para tubos de ensaio contendo meio AN inclinado e posteriormente foram incubadas por 24h à 35± 2°C.

Com auxílio de uma alça de platina, alíquotas foram retiradas e transferidas para tubos rosqueados contendo 4mL de soro fisiológico para preparação de uma suspensão da bactéria *P. aeruginosa* utilizando a escala 0,5 de MacFarland, equivalente a 1,5x10⁸UFC/mL. Com auxílio de um swab,

o tapete da suspensão preparada foi aplicado em ângulos de 60°, por todos os quadrantes da placa de Petri contendo 10mL de agar MH (Merk, Darmstadt). As placas foram postas para secar por 5 minutos e com auxílio de uma pinça estéril, os discos dos antibióticos foram aplicados.

Para cada linhagem foram realizadas duplicatas onde foram aplicados os discos e posteriormente incubadas à 37°C. Os halos e semi-halos formados foram medidos em milímetros após 18h e a verificação na Tabela de antibiograma classificou as linhagens conforme sua sensibilidade ou resistência aos antibióticos empregados.

4.9 - Determinação da atividade antimicrobiana de *P. aeruginosa* contra coliformes

4.9.1- Teste antimicrobiano em meio sólido

O objetivo deste teste qualitativo foi verificar o fenômeno do antagonismo existente entre as espécies do grupo coliforme e as linhagens de *P. aeruginosa*. O ensaio foi baseado na técnica dos blocos de gelose de Ishikawa *et al.* (1971) modificado por Araújo. Espalhou-se uniformemente uma alçada das colônias de *P. aeruginosa*, em tubos contendo AN inclinado e incubou-se por 24h à 37°C. Após o período de incubação, foi preparada uma suspensão da bactéria utilizando como base a escala 1 de MacFarland, equivalente a 3×10^8 células, em tubos rosqueados contendo 3-5mL de solução salina. Da suspensão preparada, foi retirada alíquota de 30µL e aplicada sobre blocos de agar MH (Merk, Darmstadt) de 7mm de diâmetro e 2mm de altura, previamente recortados com furador a partir de placas de Petri de 9cm de diâmetro, contendo 10mL do agar MH (Merk, Darmstadt).

Os blocos inoculados foram incubados por mais 24h à 37°C sobre uma base de AA, aplicada em placas de Petri estéreis. Com 24h, foram

preparadas suspensões padronizadas dos coliformes crescidos por 24h à 37°C em AN inclinado, da mesma forma que para *P. aeruginosa*. Com auxílio de um swab, os tapetes das suspensões preparadas dos dois coliformes foram aplicados em ângulos de 60°, por todos os quadrantes das placas de Petri contendo 10mL de agar MH (Merk, Darmstadt). Após aplicação do inóculo, com auxílio de uma alça, foram transferidos 4 blocos de gelose de cada linhagem da bactéria *P. aeruginosa* crescidos em 24h à 37°C sobre base de AA, para a placa de Petri contendo o tapete. Todas as placas foram levadas à estufa onde ficaram incubadas por mais 24h à 37°C para posterior medição em milímetros, dos halos de inibição, com auxílio de uma régua para antibiograma e cálculo da média dos valores.

4.9.2- Teste de contato em meio líquido

4.9.2.1 – Teste de contato 1

O teste de contato 1 objetivou observar o fenômeno do antagonismo quando as populações de *P. aeruginosa* e dos coliformes estão com concentrações celulares iguais. O presente ensaio pertenceu à fase de ajuste da metodologia e apenas a linhagem P16 foi selecionada para o teste. O teste foi realizado em tubos de ensaio com tampa rosqueada com capacidade de 25mL, contendo 18mL de caldo MH10%, onde inicialmente foram inoculadas 1mL, respectivamente, de suspensões de *P. aeruginosa* e dos coliformes, com concentrações celulares iguais (cerca de 10²UFC/mL). Após 24h de contato, alíquotas foram retiradas e diluídas para estimar as populações de *P. aeruginosa* e dos coliformes, utilizando a técnica dos tubos múltiplos em série de 5 tubos contendo os meios presuntivos.

As populações de *P. aeruginosa* e dos coliformes, a partir de t_{24} e até t_{120} foram quantificadas em NMP/100mL. Uma última diluição foi realizada com 10 dias seguintes à inoculação, para verificação de células viáveis após o período. Foram confeccionados gráficos onde a população está expressa como o log do NMP/100mL durante um intervalo de tempo de 240h (Figuras 17 e 18).

4.9.2.2 – Teste de contato 2

O teste de contato 2 objetivou confirmar a participação da piocianina no fenômeno do antagonismo entre *P. aeruginosa* e os coliformes. Para isto, foi dada à bactéria *P. aeruginosa* 72h de vantagem de crescimento em caldo MH10%. Foram selecionadas as três linhagens de *P. aeruginosa* mais agressivas do teste antimicrobiano em meio sólido contra os coliformes. Também foram utilizadas no teste as linhagens padrão de *P. aeruginosa* e dos coliformes.

O teste foi realizado em tubos de ensaio com tampa rosqueada com capacidade de 25mL onde inicialmente foi inoculada uma suspensão de *P. aeruginosa* em caldo MH10%.

As suspensões de cada linhagem foram preparadas a partir de colônias crescidas em AN, agar CET ou AP, por 24h à $35^{\circ}\text{C}\pm 2$. Com auxílio de uma alça de platina, as colônias isoladas foram transferidas para tubos de ensaio de base chata onde a suspensão foi preparada com 4mL de água destilada estéril com uma população inicial de aproximadamente 10^8UFC/mL . As suspensões sofreram uma série de diluições decimais até atingirem a população de 10^3UFC/mL .

A contagem das populações nesta fase se deu a partir da diluição 10^{-6} da suspensão inicial, quando uma alíquota de 10 μL foi retirada e aplicada por sobre a superfície dos meios AN, EMB, ABVB ou CET em placas de Petri (seis réplicas) para incubação em estufa à $35^{\circ}\text{C}\pm 2$ por 24h. A média do

número das Unidades Formadoras de Colônia crescidas na placa, foi utilizada para estabelecer as UFC/mL das suspensões-mãe e dos inóculos iniciais dos coliformes e da bactéria *P. aeruginosa*. A mesma forma de contagem foi utilizada para estabelecer a população da bactéria *P. aeruginosa* que cresceu no período de 72h antes do contato com os coliformes.

Durante 72h, *P. aeruginosa* cresceu isoladamente para que a piocianina estivesse presente no momento do contato com os coliformes. A presença de piocianina foi verificada com solução acidificada de permanganato de potássio (THE INDEX MERK, 1989) e fluorescência sob luz UV (360±20nm) teste deu uma vantagem de crescimento de 72h para a bactéria *P. aeruginosa* com objetivo de permitir a formação de piocianina.

Cada teste de contato em caldo MH10% durou de 8 a 10 dias e foi distribuído em duas fases distintas: do primeiro ao terceiro dia (72h), para o crescimento de *P. aeruginosa* isoladamente e do quarto ao oitavo dia e às vezes, estendendo até o décimo dia, para o contato com o coliforme e posterior estimativa do NMP.

No primeiro dia, uma alíquota de 2mL da suspensão-mãe diluída de *P. aeruginosa* foi transferida para o tubo contendo 18mL do caldo MH10%, atingindo uma população inicial de 10^2 UFC/mL e sendo levado para estufa onde ficou em incubação por 72h à $35^\circ\text{C}\pm 2$.

No quarto dia, foi retirada uma alíquota de 1mL do tubo onde *P. aeruginosa* estava crescida, sua população foi estimada em UFC/mL para conhecer os valores dos inóculos de *P. aeruginosa* (cerca de 10^8 UFC/mL) e dos coliformes (cerca de 10^2 UFC/mL), no momento do contato.

Neste mesmo dia, foi preparada uma suspensão-mãe do coliforme crescido em placas de Petri com AN e incubado em estufa à $35^\circ\text{C}\pm 2$ por 24h. A suspensão-mãe foi diluída até obter população necessária para que o inóculo inicial do coliforme fosse de 10^2 UFC/mL no momento do contato com a bactéria *P. aeruginosa*. O contato entre as duas linhagens aconteceu quando 1mL da suspensão diluída do coliforme foi transferida para o tubo onde a bactéria *P. aeruginosa* tinha 72h de vantagem de crescimento.

O tubo onde as duas linhagens estavam em contato, foi mantido em estufa à $35^{\circ}\text{C}\pm 2$ e durante um período de 96h (quinto ao oitavo dia), a partir de 24h de contato, alíquotas foram retiradas e diluídas para estimar o NMP/mL das populações de *P. aeruginosa* e dos coliformes.

Para quantificação do NMP, foi utilizada a técnica dos tubos múltiplos com a série de 5 tubos contendo apenas os meios presuntivos, em duplicata, a cada intervalo de 24h. Foram confeccionados gráficos expressos em log do NMP/mL a partir das 24h após o contato, num intervalo de 96h (Figuras 20, 21, 22, 23, 25, 26, 27 e 28).

Como controle de qualidade do teste, foi verificada a viabilidade dos microrganismos em caldo MH10% e foram realizadas contagens do NMP de todas as linhagens, selvagens e padrão, das espécies em questão, crescidas isoladamente, utilizando a mesma metodologia, para posterior comparação com o NMP encontrado durante o teste de contato em meio líquido.

5– RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – Quantificação de *P. aeruginosa* em águas brutas e residuárias

Através de diluições realizadas nas amostras, foi possível a quantificação de *P. aeruginosa* isoladas de águas dos poços de observação do Cemitério da Várzea e do Aterro Sanitário da Muribeca, como apresentado na tabela 5.

Tabela 5 – Estimativa expressa em NMP/100mL da população de *P. aeruginosa* isoladas de águas brutas e águas residuárias

Local	População
Aterro Sanitário da Muribeca (entrada do efluente)	6×10^5
Lagoas Facultativas F1→F2	2×10^4
Aterro Sanitário da Muribeca (saída do efluente)	$1,1 \times 10^5$
Poço de Observação 1 (Cemitério da Várzea)*	≥ 1600
Poço de Observação 2 (Cemitério da Várzea)*	$1,7 \times 10^4$
Poço de Observação 3 (cemitério da Várzea)*	≥ 1600

* amostras não diluídas

A estimativa do NMP/100mL permitiu que fossem encontradas populações de *P. aeruginosa* dentro da faixa reportada pela literatura. Quando isolada na natureza, sua concentração populacional varia de 10^2 a 10^5 (CARSON *et al.*, 1975; WHEATER *et al.*, 1980 e HARDALO & EDBERG, 1997).

5.2- Seleção das linhagens

O processo de isolamento de todas as linhagens de *P. aeruginosa* e dos coliformes, para os testes do antagonismo, se deu de acordo com os métodos padrões adotados (APHA, 1998). Foram selecionadas as linhagens de *P. aeruginosa* que atendiam a definição para a espécie (HPA, 2003). De 20 linhagens estudadas ou obtidas por doação, apenas 16 produziram piocianina em agar cetrimida. A produção do pigmento foi o critério mais importante para a seleção das linhagens no teste do antagonismo, visto que, a piocianina pode estar implicada neste fenômeno (GUILHERME & SILVA, 2000).

Após o teste antimicrobiano em meio sólido e do antibiograma, foram excluídas as linhagens provenientes de águas de centros médicos e de diálise: P4, P6 e P12. A exclusão das linhagens de origem clínica levou em consideração o fato de serem habitantes de ambientes hospitalares, descartando qualquer possibilidade de que alguma resistência adquirida influenciasse nos resultados (DE VOS *et al.*, 1997; PANZIG *et al.*, 1999; DUBOIS *et al.*, 2001; DI MARTINCO *et al.*, 2002; PELLEGRINO *et al.*, 2002; SHRIVASTAVA *et al.*, 2004).

O processo de escolha das espécies de bactérias para representar o grupo coliforme se deu de acordo com a legislação vigente que determina *E. coli* o principal indicador de poluição fecal (Resolução 20/86; Resolução 54/00; Resolução 274/00 e Portaria 518/04), considerada também como o principal parâmetro microbiológico sugerido pela OMS (WHO, 2002).

De acordo com Jalaluddin *et al.* (1999), a bactéria *E. aerogenes* nos últimos anos vem sendo alvo de investigação pela sua importância epidemiológica pois, apesar de não ser o principal representante do gênero *Enterobacter* (BERGEY'S MANUAL, 1984), está associado às águas naturais (GLEENSON & GRAY, 1997).

O principal critério de seleção da linhagem EA1 foi o isolamento da cultura a partir de uma amostra de água com a presença de coliformes totais sem a existência das bactérias *E. coli* e *P. aeruginosa*. Foram escolhidos

apenas os dois representantes principais do grupo coliforme para a investigação do fenômeno de antagonismo.

5.3 – Antibiograma

O antibiograma foi realizado como um teste complementar, visando identificar entre as linhagens estudadas de *P. aeruginosa*, algum representante resistente aos antibióticos utilizados na terapia convencional. O antibiograma funciona como uma ferramenta inicial para identificar linhagens resistentes e direcionar o tratamento (FREITAS & BARTH, 2004).

É conhecido que a bactéria *P. aeruginosa* é um dos principais microrganismos envolvidos em infecções hospitalares e casos de epidemias em pacientes internados (SPEIJER *et al.*, 1999; GUIMARÃES *et al.*, 2000; DUBOIS *et al.*, 2001; MONTELLI & SADATSUNE, 2001; LYCZAK *et al.*, 2002; LOUREIRO *et al.*, 2002 e TREDGET *et al.*, 2004)

O perfil obtido no teste de sensibilidade aos antibióticos pelas linhagens de *P. aeruginosa* seguiu um padrão semelhante e todas foram sensíveis aos antibióticos usados (HOCQUET *et al.*, 2003). A Tabela 6 apresenta o gráfico do antibiograma das 16 linhagens e da linhagem padrão *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Tabela 6 – Antibiograma das linhagens selvagens e padrão de *P. aeruginosa*

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	padrão
AMI	24	26	26,5	25,5	22	28,5	25,5	26	23	23	26	26	21	27	29,5	29	30
CAZ	27	30	31	34	28	30,5	30,5	27	26	26	28,5	28	27	29	36	29	30
CIP	37	39	39	40	40	43,5	36,5	38,5	38,5	39,5	41,5	39,5	26	30	40	39,5	38
GEN	21	22	23,5	22,5	19,5	26	24,5	22,5	22,5	20,5	23	22,5	22	22	25,5	23	26
IPM	30	30	30,5	35	29	35	35	29,5	29,5	29,5	30	30,5	33	32	35,5	34	30
NOR	35	37	36,5	40	34,5	40,5	36	36,5	34,5	34,5	36	38,5	19	17,5	39	37	32
POL	20	18	19	20	19	19,5	19,5	19,5	19,5	19,5	20	19,5	19,5	18	19	20	20
TAC	28	28	29,5	31	28,5	31	28,5	29	25	25	28	29	26	28,5	31,5	30	28
TOB	25	25	24,5	25,5	23	23	26	25,5	25	25	24	27,5	23	26	27,5	28,5	28

A polimixina foi utilizada como controle porque todas as linhagens da bactéria são sensíveis à droga (PANZIG *et al.*, 1999; PELLEGRINO *et al.*, 2002; MENON *et al.*, 2003).

As linhagens P13 e P14 foram as mais heterogêneas se comparadas com as demais do grupo. Mesmo tendo sido sensíveis, a todos os antibióticos utilizados, (tomando-se como base o diâmetro do halo mínimo para que se considere resistência em clínica), os perfis demonstram que P13 e P14 foram as linhagens mais resistentes que as demais quando se trata, principalmente, ao norfloxacino, NOR (diâmetro do halo mínimo= 17mm).

A linhagem P13 foi isolada de uma água tratada com cloro enquanto que P14 foi isolada de água residuária. De acordo com Romling *et al.* (1994), linhagens provenientes deste tipo de água podem assumir um perfil de resistência, semelhante aos encontrados em isolados hospitalares. O que reforça as observações feitas nesse trabalho.

O antibiograma de P14 influenciou na escolha desta linhagem, evidenciando tendência de resistência à drogas entre as culturas para os testes de antagonismo. P14 foi isolada do poço de entrada do chorume na lagoa de estabilização do aterro sanitário da Muribeca.

Várias são as classes das drogas usualmente aplicadas no tratamento empírico antipseudomonas quando a bactéria é detectada em infecções hospitalares (DANIEL, 2001). Apesar de Ergin & Mutlu (1999), Panzig *et al.* (1999), Dubois *et al.* (2001), Pellegrino *et al.* (2002) e Orrett (2004) afirmarem existir o desenvolvimento da resistência às beta-lactamases, nenhuma linhagem de *P. aeruginosa* foi sensível à ticarcilina (TAC), uma antibiótico beta-lactâmico que apresenta halos em torno de 25-31mm.

Estudos anteriores (PANZIG *et al.*, 1999; ERGIN & MUTLU, 1999; BRETT & ELLIS PEGLER, 2001 e HOCQUET *et al.*, 2003) mostraram a resistência de *P. aeruginosa* aos antibióticos de espectro maiores como carbapenemas (IPM) e quinolonas (CIP e NOR). No entanto, este comportamento não foi observado entre as linhagens estudadas neste trabalho.

Os dois grupos de antibióticos correspondem aos melhores resultados entre todos utilizados no teste e não foi registrada nenhuma resistência, apesar de P13 e principalmente P14 terem se comportado como as linhagens menos sensíveis às quinolonas (Tabela 6).

O antibiograma não tem o poder de distinguir linhagens de mesma espécie não relacionadas e envolvidas em episódios de epidemias e infecções hospitalares (FREITAS & BARTH, 2004). A ribotipagem é a mais recomendada porque é essencial no entendimento de infecções, elucidação de epidemias e das rotas de transmissão, como também estabelece correspondências entre isolados não relacionados (HERNANDEZ *et al.*, 1997; FREITAS & BARTH, 2004), além de monitorar a terapia antimicrobiana apropriada (HOCQUET *et al.*, 2003; MENON *et al.*, 2003).

As Figuras 10, 11 e 12 apresentam os antibiogramas das linhagens mais agressivas de *P. aeruginosa* (P2, P14 e P16) junto aos coliformes no teste antimicrobiano em meio sólido que posteriormente foram utilizadas no teste em meio líquido. A Figura 13 mostra o antibiograma da linhagem padrão *P. aeruginosa* ATCC 27853.

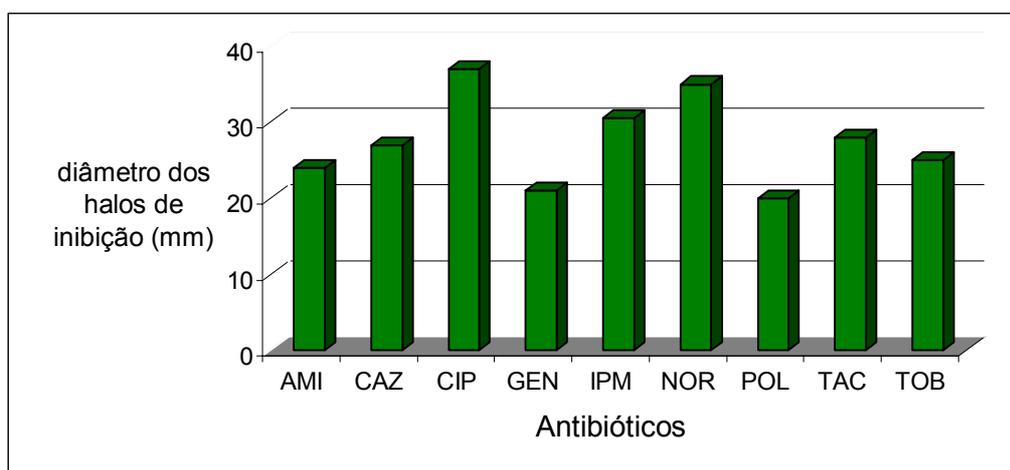


Figura 10 - Antibiograma da linhagem P2

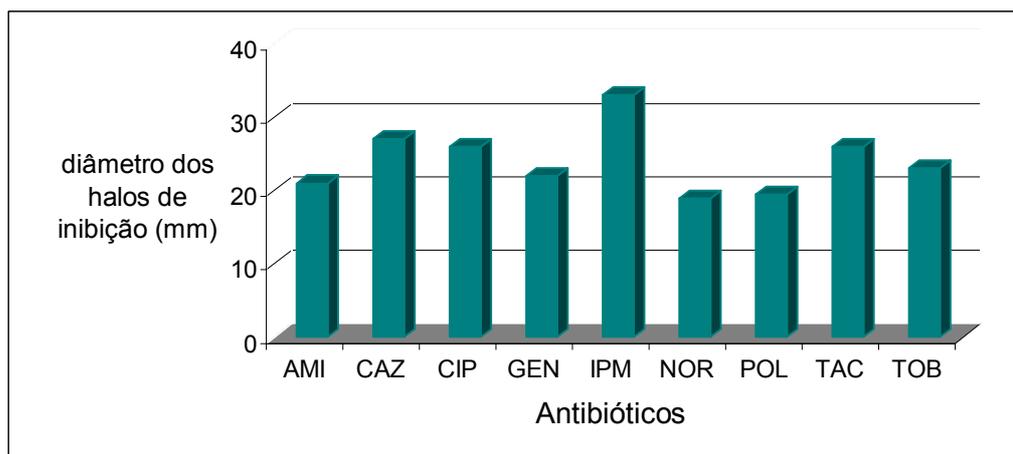


Figura 11 – Antibiograma da linhagem P14

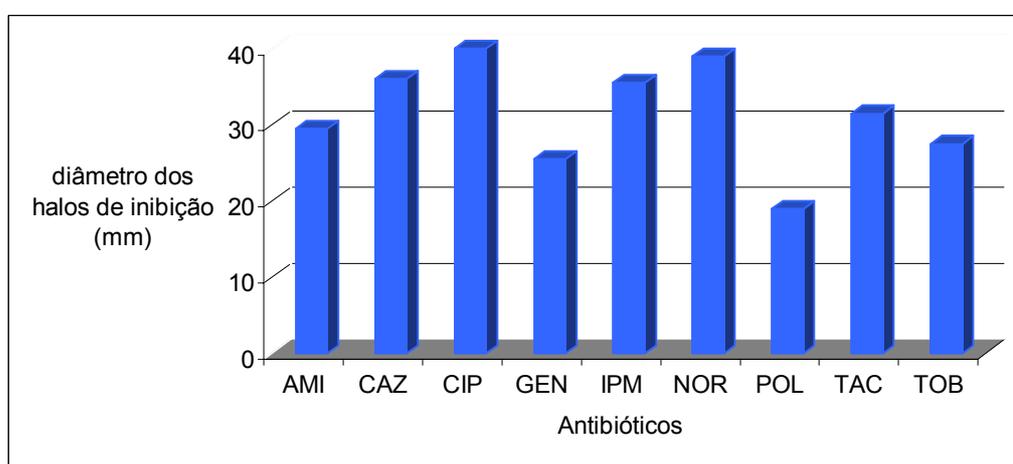


Figura 12 – Antibiograma da linhagem P16

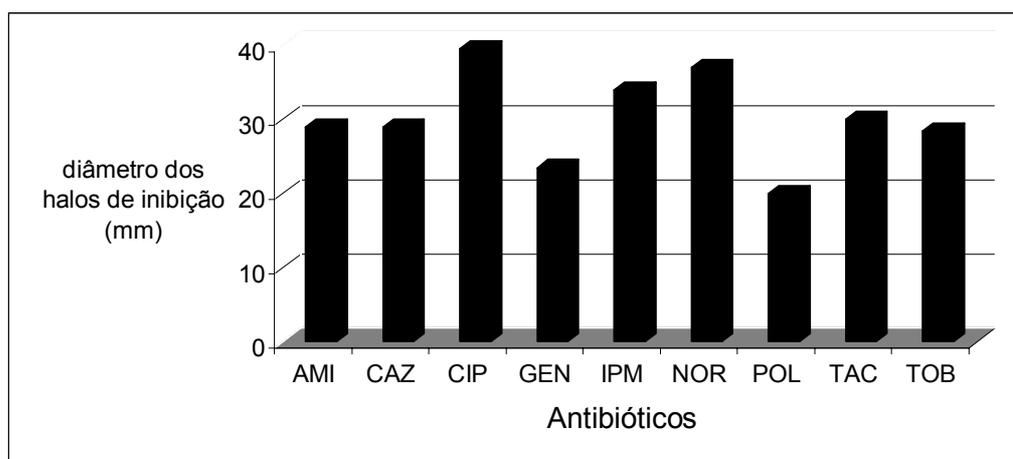


Figura 13 – Antibiograma de *P. aeruginosa* ATCC 27853

As linhagens P2 e P16 tiveram perfis do antibiograma, semelhantes e apresentam semelhanças ao resultado do teste com a linhagem padrão *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Figura 13), assim como demais linhagens estudadas com exceção de P13 e P14.

A linhagem P14 apresentou perfil diferente da linhagem padrão *P. aeruginosa* ATCC 27853 por conta principalmente da tendência de resistência ao norfloxacino (NOR).

5.4 – Ensaio antimicrobiano em meio sólido

O teste em blocos de gelose se mostrou eficiente para uma triagem inicial na primeira fase do trabalho. O resultado do teste em meio sólido utilizando a técnica empregada por Ishikawa *et al.* (1971) e modificada por Araújo, comprovou a existência do fenômeno do antagonismo entre *P. aeruginosa* e as bactérias do grupo coliforme utilizadas. Houve a formação de halos de inibição (Figuras 14 e 15) pelas linhagens selvagens e padrão ATCC 27853 da bactéria *P. aeruginosa* contra EA1, EC1 e as linhagens padrão dos coliformes, *E. aerogenes* ATCC 15012 e *E. coli* ATCC 25922.



Figura 14 - Halos de inibição formados pela linhagem P14 no teste de contato contra a linhagem EA1

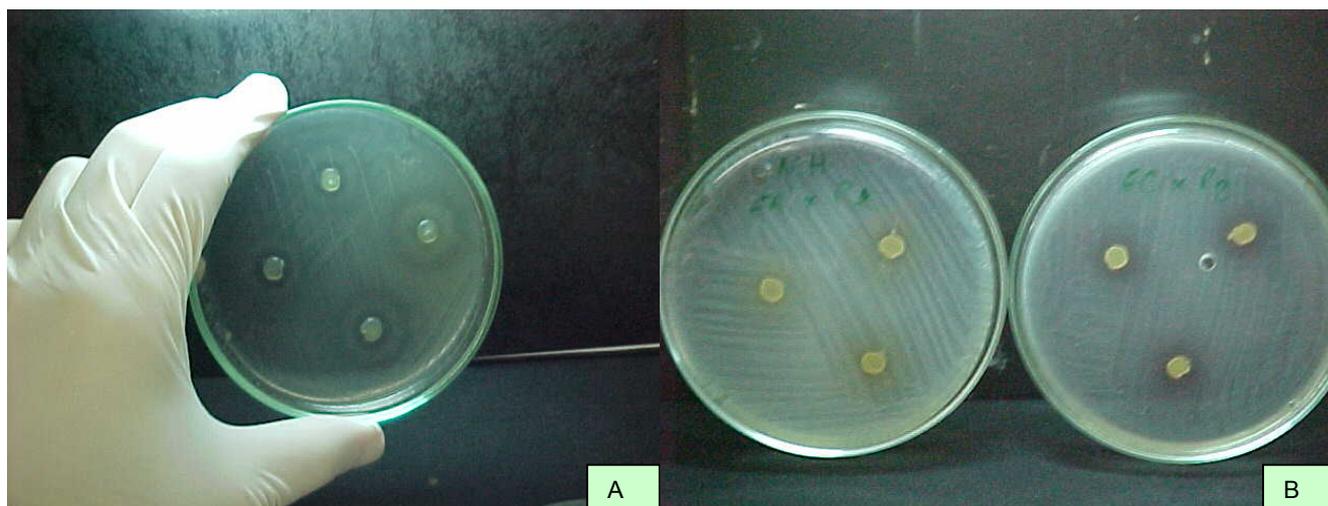


Figura 15 - Halos de inibição observados com os blocos de gelose. Em A: halos de P15 nos blocos, contra *E. aerogenes*. Em B: teste do antagonismo entre P2 com *E. coli* (à direita) e *E. aerogenes* (à esquerda).

De uma forma geral, os diâmetros dos halos de inibição exibidos pelas linhagens de *P. aeruginosa*, foram semelhantes para as diferentes linhagens de coliformes. No entanto, as linhagens de *P. aeruginosa* apresentaram maiores atividades inibitórias contra a linhagem EA1, 31% delas formaram halos entre 16 e 20mm. Por outro lado, a inibição foi menor contra a linhagem EC1. Os resultados estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Média do diâmetro dos halos (mm) no ensaio antimicrobiano em meio sólido de *P. aeruginosa* contra coliformes (linhagens selvagens e padrão)

Microrganismos	EA1 (mm)	EC1 (mm)
P1	9	10,5
P2	16	13
P3	9	15
P4	10	12
P5	18	13
P6	11	9
P7	7	9
P8	18	10
P9	9	13
P10	18	12
P11	17	10
P12	9	10
P13	14	12
P14	29	17
P15	26	15
P16	12	17
<i>P. aeruginosa</i>		
ATCC 27853	16*	11**

* medida do diâmetro do halo de inibição contra linhagem padrão de *E. aerogenes* ATCC 15012.

** medida do diâmetro do halo de inibição contra linhagem padrão de *E. coli* ATCC 25922.

O pigmento formado pelas linhagens da bactéria *P. aeruginosa* se difundiu por toda a placa, variando de um amarelo claro até verde escuro. Quanto mais intenso o pigmento formado, maior foi o halo de inibição. A partir desses resultados e de acordo com o resultado do antibiograma e do local de isolamento das culturas selvagens, foram selecionadas as linhagens P2 (Poço

de Observação 2 do Cemitério da Várzea), P14 (Aterro Sanitário da Muribeca) e P16 (Poço) para o teste de contato em meio líquido.

5.5 – Teste de contato em meio líquido

O fenômeno do antagonismo entre as linhagens da bactéria *P. aeruginosa* com bactérias do grupo coliforme já descrito por alguns autores (D'ÁQUILA *et al.*, 2000; GUILHERME & SILVA, 2000; TANCREDI *et al.*, 2002), ficou evidente durante os ensaios em meio líquido. A escolha do meio de enriquecimento Müeller-Hinton preparado em uma concentração de 10% do meio tradicionalmente usado, objetivou criar uma situação limitante de nutrientes, simulando um estresse ambiental para forçar a predominância do microrganismo melhor adaptado. Inicialmente, era esperado que a bactéria *P. aeruginosa* fosse o microrganismo predominante por conta da sua versatilidade metabólica (LEGANI *et al.*, 1999; TSORAEVA & MARTÍNEZ, 2000; TODAR, 2002; PIRNAY *et al.*, 2002). A quantificação da população foi realizada por um período de 96h, durante a segunda fase do teste, compreendendo do quarto ao décimo dia. Foram confeccionados gráficos (Figuras 20,21,22,23,25,26,27 e 28) que mostram curvas de crescimento com perfis semelhantes, com o NMP das populações de *P. aeruginosa* e dos coliformes em torno de 10^8 - 10^9 após 24h de contato, iniciadas por inóculos com cerca de 10^2 UFC/mL.

Embora a metodologia empregada, tenha evidenciado o fenômeno do antagonismo entre as linhagens da bactéria *P. aeruginosa* contra bactérias do grupo coliforme, houve problemas de diversas naturezas para a montagem e adequação da mesma. A escolha da técnica dos tubos múltiplos para determinação do NMP se deu depois de se constatar que a contagem das colônias dos representantes do grupo coliforme, não seria exequível por conta da capacidade de utilização das mais várias fontes de carbono. A bactéria *P.*

aeruginosa é capaz de crescer em EMB ou ABVB e se sobrepôr aos coliformes.

A partir dessa observação, todos os microrganismos teste foram contados e expressos em UFC/mL (antes de serem inoculados no caldo MH10%) e em NMP/100mL, a partir de 24h após o contato ter acontecido. Os resultados estão, assim, representados nas Figuras 17, 18, 20, 21, 22, 23, 25, 26, 27 e 28.

Os meios presuntivos para *P. aeruginosa* e coliformes, se mostraram eficazes para a contagem do NMP durante o teste antimicrobiano em meio líquido. Algumas vezes a pigmentação verde mais intensa foi evidenciada na parte superior dos tubos de ambos os meios. Não foram utilizados os meios confirmativos por se partir do princípio de que se trabalhava com culturas puras de microrganismos identificados.

Todas as linhagens estudadas da bactéria *P. aeruginosa* e dos coliformes foram hábeis em crescer no caldo MH10% (pH 7,3±0,1) e a enumeração da população foi possível a partir das diluições realizadas. Foi observado entre 48-72h depois da inoculação das linhagens da bactéria *P. aeruginosa*, o caldo MH10% de amarelo pálido, tornou-se verde (Figura 16). O caldo apresentava odor adocicado semelhante a aromatizante de uva. Foram também observados em alguns ensaios, formação de espuma, odor de sabão e que o pH encontrava-se próximo a 8.



Figura 16 - Caldo MH10%. Da esquerda para direita pode ser observada a mudança na coloração de um amarelo pálido do caldo estéril passando por um amarelo esverdeado (48h de inoculação) até atingir um tom de verde escuro e com fluorescência intensa sob UV.

5.5.1 – Teste de contato com concentrações celulares iguais

Os primeiros testes de contato entre *P. aeruginosa* e os coliformes foram realizados partindo-se do mesmo inóculo inicial em t_0 (cerca de 10^2 UFC/mL). Dentre as linhagens selecionadas para o teste de contato em meio líquido, (P2, P14 e P16), a linhagem P16 foi eleita para este ensaio, por ter sido isolada de uma amostra de água de poço.

Como colonizadora de águas de poços, *P. aeruginosa* tem vantagens para sobrevivência em ambientes com baixa concentração de nutrientes, temperatura e pH (BANNING, 2003) e essa vantagem daria como certa a observação do fenômeno do antagonismo. A enumeração de *P. aeruginosa* e dos coliformes foi realizada em intervalos regulares de 24h, durante 120h e uma última leitura com 240h de contato. Estes resultados estão apresentados nas Figuras 17 e 18.

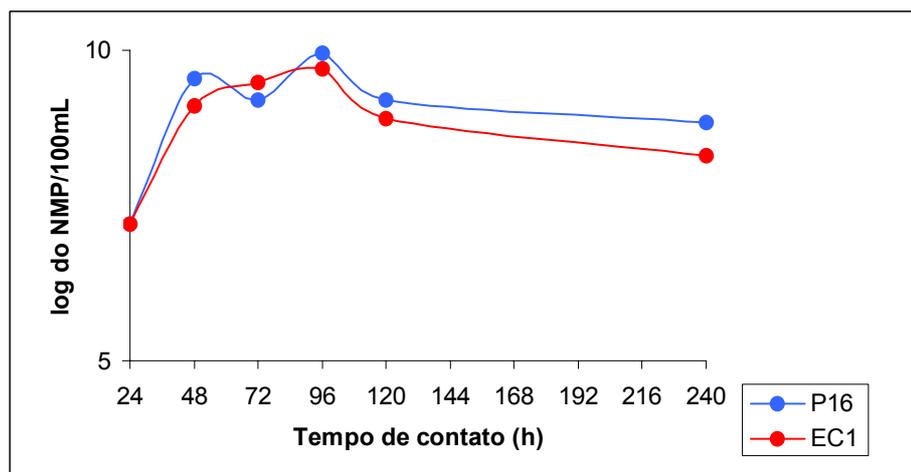


Figura 17 – Resultados expressos em log do NMP/100mL do ensaio do antagonismo entre as linhagens P16 e EC1 com inóculos iniciais cerca de 10^2 UFC/mL.

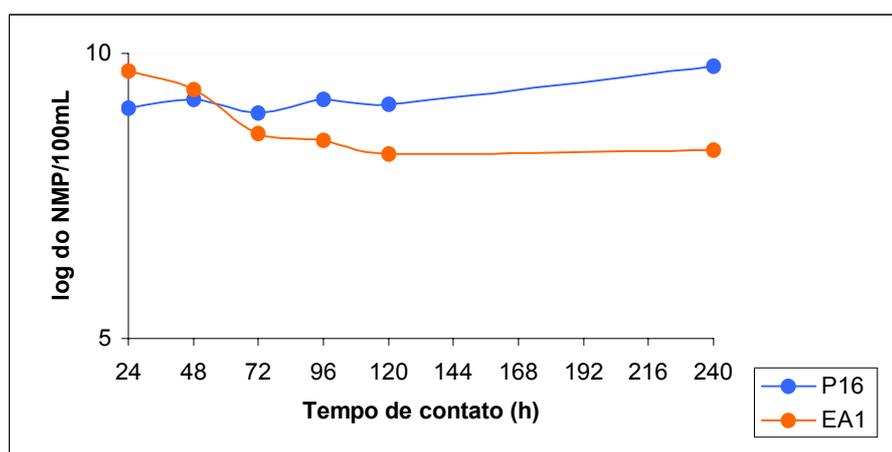


Figura 18 - Resultados expressos em log do NMP/100mL do ensaio do antagonismo entre as linhagens P16 e EA1 com inóculos iniciais cerca de 10^2 UFC/mL.

Com inóculos com concentrações celulares iguais (cerca de 10^2 UFC/mL), no ensaio entre P16 contra EC1 (Figura 17), as duas linhagens alcançaram após 24h de contato, o NMP igual ($1,6 \times 10^7$). Em nenhum intervalo, apesar de ter uma população elevada, EC1 não ultrapassou a população de P16 e ambas chegam no último intervalo, maiores (P16= 7×10^8 EC1= 2×10^8) e uma pequena vantagem para EC1.

O fenômeno ficou evidente no ensaio entre P16 e EA1 (Figura 18). Partindo de inóculos iguais (cerca de 10^2 UFC/mL), com 24h de contato entre os dois microrganismos, a população de EA1 atingiu um valor 5 vezes maior (5×10^9) que o de P16 ($1,1 \times 10^9$). A partir de 24h de contato, a população de EA1 começou a cair, coincidindo com o momento da formação de piocianina ($t_{48-t_{72}}$). É provável que a produção de piocianina tenha influenciado nestes resultados. Existe uma suspeita de que o pigmento é se não o único, pelo menos, um dos fatores responsáveis pelo fenômeno de antagonismo (GUILHERME & SILVA, 2000).

Em ambos os testes, o valor máximo atingido pelas populações de P16, EA1 e EC1 foi 10^9 , com 48h de contato. Na Figura 17 é possível observar que não houve declínio das populações de P16 (de $1,6 \times 10^7$ para 7×10^8) e EC1 (de $1,6 \times 10^7$ para 2×10^8). O contrário foi observado no teste entre P16 e EA1 (Figura 18). Enquanto a população de P16 ao final, aumentou 5,5 vezes em relação ao t_{24} (de $1,1 \times 10^9$ para 6×10^9), EA1 caiu 25 vezes (de 5×10^9 para 2×10^8), evidenciando morte celular e que a piocianina teve importante papel no fenômeno do antagonismo.

Este ensaio entre P16 e os coliformes teve como objetivo mostrar o que poderia acontecer quando as populações estivessem presentes na água, simultaneamente, sem que nenhuma das espécies tivesse vantagem em termos de tempo de crescimento.

A linhagem EA1 quando comparada à EC1, mostrou-se mais sensível, principalmente no momento da formação de piocianina pela *P. aeruginosa* (t_{48-72}), comprovando o observado no ensaio antimicrobiano em meio sólido. A Figura 18 apresenta uma evidente morte celular com favorecimento de P16 e uma tendência a um ponto de equilíbrio nas duas populações após 120h. O maior valor de P16, em t_{48} ($1,6 \times 10^9$), seguido por uma queda e restabelecimento do mesmo valor, pode representar o uso de outra fonte de carbono pela bactéria *P. aeruginosa*, ou seja, um fenômeno de diauxia.

5.5.2 – Teste de contato em meio líquido com vantagem de crescimento de 72h para *P. aeruginosa*

Para se tentar visualizar melhor a ação antimicrobiana de *P. aeruginosa* sobre os coliformes e confirmar a participação da piocianina em tal fenômeno, foi feito um ajuste na metodologia, visando criar um ambiente que favorecesse a síntese do pigmento e simulasse uma contaminação por coliformes em um corpo de água onde a bactéria *P. aeruginosa* já estivesse estabelecida, com uma população numerosa. Dessa forma seria possível verificar o que aconteceria, em tese, a uma população de coliformes recém-chegada, quando no ambiente prevalecesse a bactéria *P. aeruginosa*.

Para simular tal situação, onde ocorresse despejo de água contaminada por coliformes em ambiente com alta carga de bactéria *P. aeruginosa*, foi dada a esta última, 72h de vantagem de crescimento, a partir de inóculo inicial em torno de 10^2 UFC/mL.

No entanto, como o tempo de geração dos coliformes é de aproximadamente 20 minutos (BROCK, 2000) contra aproximadamente 3-6h da bactéria *P. aeruginosa* (TAMAGNINI & GONZALES, 1997), esperava-se uma competição por nutrientes com aparente vantagem dos coliformes a partir do momento de contato entre as duas populações.

A formação de intenso pigmento pelas linhagens P2, P14 e P16 foi o ponto mais importante na escolha das linhagens para esse teste em meio líquido. Para garantir e estimular a formação de piocianina, os isolados foram repicados em meio AP (KING *et al.*, 1954) que favorece a produção de pigmentos por que tem em sua composição, sais de potássio. O crescimento em meio AP e a vantagem de 72h de crescimento dada à bactéria *P. aeruginosa* foram suficientes para que houvesse formação de piocianina confirmada pelo teste com solução acidificada de permanganato de potássio (THE INDEX MERK, 1989) e produção de fluorescência sob UV (360 ± 20 nm) a partir de 24-48h de inoculação.

As linhagens dos coliformes nos testes do antagonismo em meio líquido contra *P. aeruginosa* entraram em contato com as mesmas, com uma população 10^6 menor e após 24h inoculação, por conta de um crescimento rápido, atingiam valores próximos ao NMP registrados das linhagens de *P. aeruginosa* quando as mesmas tinham 72h de vantagem de crescimento, por isso, todos os gráficos estão representados a partir da primeira leitura do NMP com 24h de contato (Figuras 20, 21, 22, 23, 25, 26, 27 e 28).

5.5.2.1 – Fenômeno do antagonismo sobre EA1

Dada a vantagem de 72h de crescimento para as linhagens da bactéria *P. aeruginosa*, e realizando um teste com a linhagem EA1 crescendo isoladamente no mesmo meio (Figura 19), após 24h de contato com o coliforme, o fenômeno do antagonismo sobre a linhagem EA1 foi mais evidenciado entre P14, P2 e P16, respectivamente (Figuras 20, 21 e 22). Observam-se quedas muito acentuadas quando comparados os valores do NMP da linhagem da cultura pura cultivada isoladamente (Figura 19).

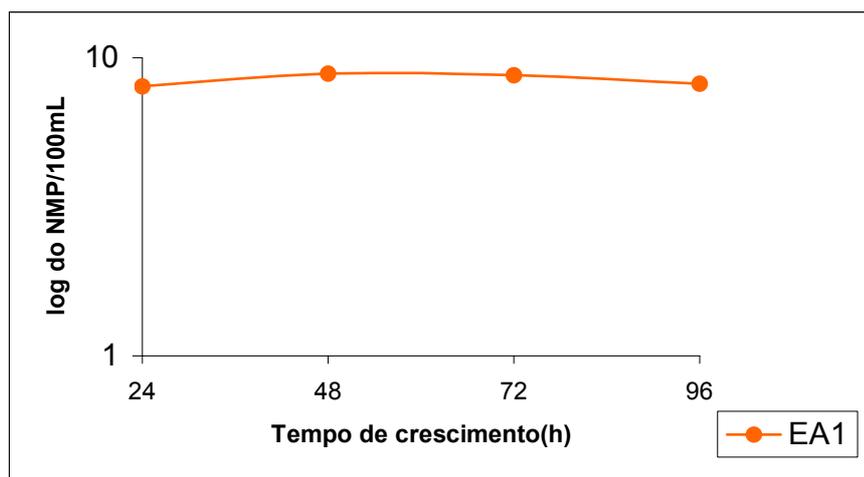


Figura 19 – Resultados expressos em log do NMP/100mL do teste da cultura pura (cultivada isoladamente da linhagem EA1) em caldo MH10% e com inóculo inicial cerca de 10^2 UFC/mL.

No teste com a cultura pura de EA1 (cultivada isoladamente), a população esteve estável entre t_{24} e t_{96} e cresceu 1,5 vez em relação ao NMP registrado no mesmo intervalo (de 1×10^8 para $1,5 \times 10^8$). O maior número de células viáveis foi registrado entre 24-48h (7×10^8), uma característica observada em todos os ensaios com as três espécies estudadas. Na maioria dos casos, as primeiras 48h após o contato foram decisivas e tiveram os maiores incrementos de crescimento da bactéria *P. aeruginosa* e os maiores índices de queda da população dos coliformes, mostrando a evidente vantagem da bactéria *P. aeruginosa* sobre os coliformes em ambientes onde há competição por nutrientes.

No teste de contato com a linhagem P14 (Figura 20), EA1 com 24h de inoculação, atingiu o NMP próximo ($2,5 \times 10^8$) ao de P14 ($1,6 \times 10^8$), no entanto, houve inibição e foi observada uma queda expressiva de 329 vezes da população de EA1 durante o intervalo de 96h (de $2,5 \times 10^8$ para $7,6 \times 10^5$). A maior queda foi registrada entre t_{24} e t_{48} (44,5), enquanto o NMP da linhagem P14 cresceu 19 vezes entre t_{24} e t_{96} (de $1,6 \times 10^8$ para 3×10^9). O valor máximo alcançado por P14 em t_{48} (5×10^9), distanciava 10^3 vezes da população de EA1 no mesmo intervalo ($5,6 \times 10^6$). Ao final, a distância entre o NMP das duas linhagens alcançou a razão de 10^4 .

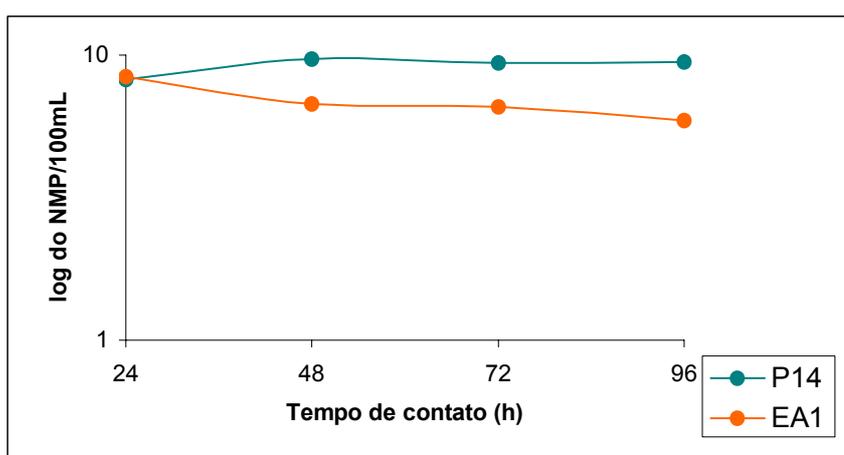


Figura 20 – Resultados expressos em log do NMP/100mL do ensaio do antagonismo entre as linhagens P14 e EA1 com inóculos iniciais cerca de 10^8 UFC/mL (P14) e cerca de 10^2 UFC/mL (EA1).

No teste contra linhagem P2 (Figura 21), os valores do NMP em t_{24} estavam próximos como no teste anterior ($P2=1,9 \times 10^9$ e $EA1=8 \times 10^8$) e como esperado, o fenômeno de antagonismo foi observado. A linhagem EA1 apresentou uma queda de 80 vezes entre os valores do NMP durante o intervalo de 96h (de 8×10^8 para 1×10^7), enquanto P2 cresceu 4 vezes no mesmo período (de $1,9 \times 10^9$ para $7,7 \times 10^9$). A maior queda da população da linhagem EA1 também foi observada entre t_{24} e t_{48} (de 8×10^8 para $7,9 \times 10^7$), embora seu menor valor tenha sido registrado em t_{96} (1×10^7) quando distanciava 100 vezes de P2.

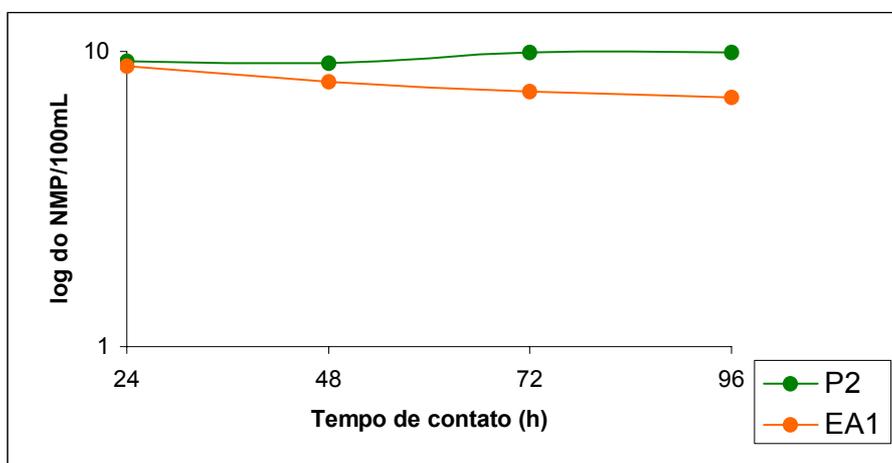


Figura 21 – Resultados expressos em log do NMP/100mL do ensaio do antagonismo entre as linhagens P2 e EA1 com inóculos iniciais cerca de 10^8 UFC/mL (P2) e cerca de 10^2 UFC/mL (EA1).

O fenômeno de antagonismo foi claramente observado também no teste de contato entre as linhagens P16 e EA1 (Figura 22). Com 24h de contato, a população de EA1 partida de cerca de 10^2 cresceu rapidamente, apesar disso, o NMP registrado foi 10 vezes menor que de P16 ($P16=1,7 \times 10^9$ e $EA1=1,6 \times 10^8$). Mesmo a linhagem EA1 tendo a população em desvantagem em relação a P16, se comparada aos ensaios anteriores, neste teste, houve uma queda de 35 vezes do NMP de EA1 (de $1,6 \times 10^8$ para $4,6 \times 10^6$). Em t_{48} , como nos testes anteriores, foi o intervalo onde se deu o maior decréscimo do NMP de EA1 (de $1,6 \times 10^8$ para $1,5 \times 10^7$). A linhagem P16 cresceu 3,5 vezes

entre t_{24} e t_{96} e o valor máximo do NMP foi alcançado em t_{96} (6×10^9) com uma distância da razão de 10^3 do NMP de EA1 ($4,6 \times 10^6$).

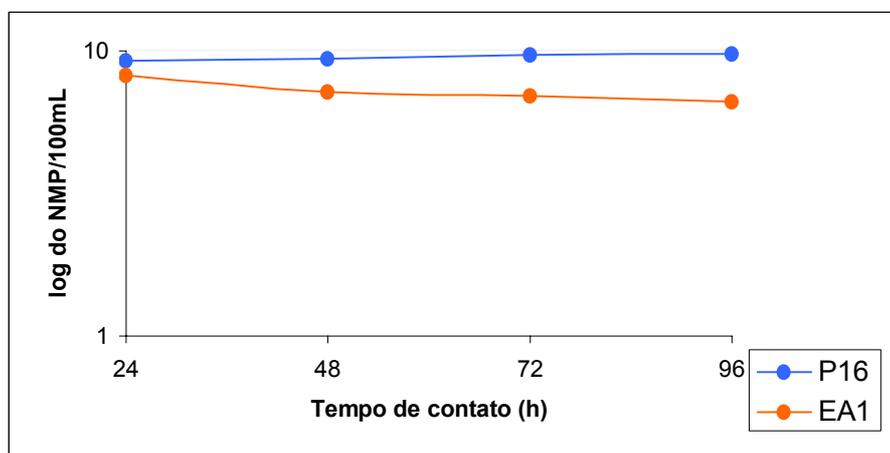


Figura 22 – Resultados expressos em log do NMP/100mL do ensaio do antagonismo entre as linhagens P16 e EA1 com inóculos iniciais cerca de 10^8 UFC/mL (P16) e cerca de 10^2 UFC/mL (EA1).

A distância da razão de 10^2 também foi observada no teste com as linhagens padrão (Figura 23) e o fenômeno do antagonismo também pode ser observado. Os resultados se aproximaram dos encontrados no teste de contato entre P16 e EA1 (Figura 22). A linhagem padrão obteve uma redução de 368 vezes na sua população (de 7×10^8 para $1,9 \times 10^5$) com o maior índice registrado de queda acontecendo, diferentemente das linhagens selvagens, entre t_{72} e t_{96} (de $2,3 \times 10^6$ para $1,9 \times 10^5$). A distância de 10^4 do NMP da população entre t_{24} e t_{96} de *E. aerogenes* ATCC 15012 foi a mesma do ensaio P14 x EA1 (Figura 20).

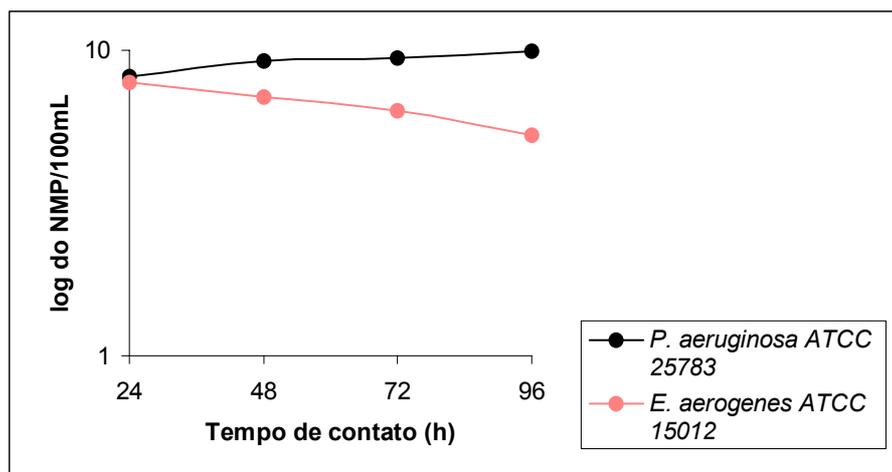


Figura 23 - Resultados expressos em log do NMP/100mL do ensaio do antagonismo entre as linhagens padrão de *P. aeruginosa* ATCC 25783 (inóculo inicial cerca de 10^8 UFC/mL) e *E. aerogenes* ATCC 15012 (inóculo inicial cerca de 10^2 UFC/mL).

5.5.2.2 – Fenômeno do antagonismo sobre EC1

Os testes com a linhagem EC1 foram conduzidos da mesma forma que os realizados com a linhagem EA1. foi dada uma vantagem de 72h de crescimento para as linhagens da bactéria *P. aeruginosa* sobre a bactéria *E. coli* e foi realizando em paralelo o crescimento isolado de EC1 em caldo MH10% (Figura 24).

O fenômeno do antagonismo sobre a linhagem EC1 foi igualmente pronunciado e evidenciado entre P14, P2 e P16, respectivamente (Figuras 25, 26 e 27). Se comparado aos valores de NMP alcançados pela cultura pura cultivada isoladamente (Figura 24), as quedas foram igualmente muito acentuadas.

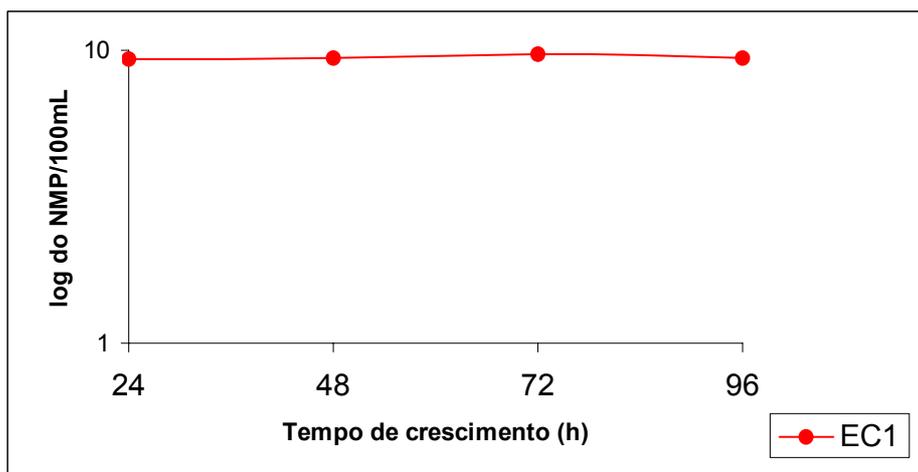


Figura 24 – Resultados expressos em log do NMP/100mL do teste da cultura pura (cultivada isoladamente da linhagem EC1) em caldo MH10% e com inóculo inicial cerca de 10^2 UFC/mL.

A Figura 24 mostra que a população de EC1 cultivada isoladamente esteve estável entre t_{24} e t_{96} (de 2×10^9 para $2,4 \times 10^9$) e cresceu 1,5 vez em relação ao NMP registrado em t_{24} . O maior incremento de crescimento ocorreu entre 48-72h (2 vezes). Em todos os testes de contato com EC1, o NMP em t_{24} era praticamente igual entre as linhagens da bactéria *P. aeruginosa* e EC1.

No ensaio com a linhagem P14 contra EC1(Figura 25), ocorreu um pronunciado efeito antimicrobiano de P14 sobre o coliforme, que sofreu um decréscimo de 1300 vezes na sua população (de $5,2 \times 10^7$ para 4×10^4), ao passo que a população da linhagem P14 aumentou 39 vezes entre t_{24} e t_{96} (de $1,6 \times 10^8$ para $6,2 \times 10^9$). A maior queda no NMP de EC1 foi registrada entre t_{48} e t_{72} (de 3×10^5 para 4×10^4). Os valores máximos alcançados pelas duas linhagens ocorreram em t_{96} , representando, entretanto, uma distância 10^5 vezes entre as mesmas.

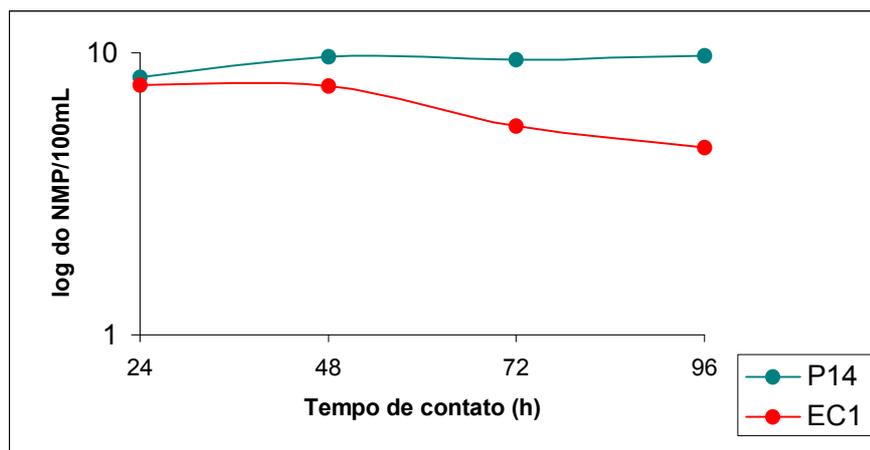


Figura 25 – Resultados expressos em log do NMP/100mL do ensaio do antagonismo entre as linhagens P14 e EC1 com inóculos iniciais cerca de 10^8 UFC/mL (P14) e cerca de 10^2 UFC/mL (EC1)

No teste contra linhagem P2 (Figura 26), como esperado, houve um efeito antagônico sobre a linhagem EC1, que apresentou uma queda de 38,5 vezes entre os valores do NMP entre 24 e 96h (de 1×10^9 para $2,6 \times 10^7$) do teste, enquanto P2 cresceu 3 vezes, no mesmo período (de $2,7 \times 10^9$ para $8,7 \times 10^9$). Houve semelhança com o teste entre P2 e EA1 (Figura 21). O intervalo onde se registrou a maior queda da população da linhagem EC1 foi t_{24} e t_{48} (de 1×10^9 para $1,3 \times 10^8$). A distância entre os NMP das duas populações em t_{96} foi de 100 vezes, observando-se uma queda de EC1 durante todo o teste numa razão de 10^2 .

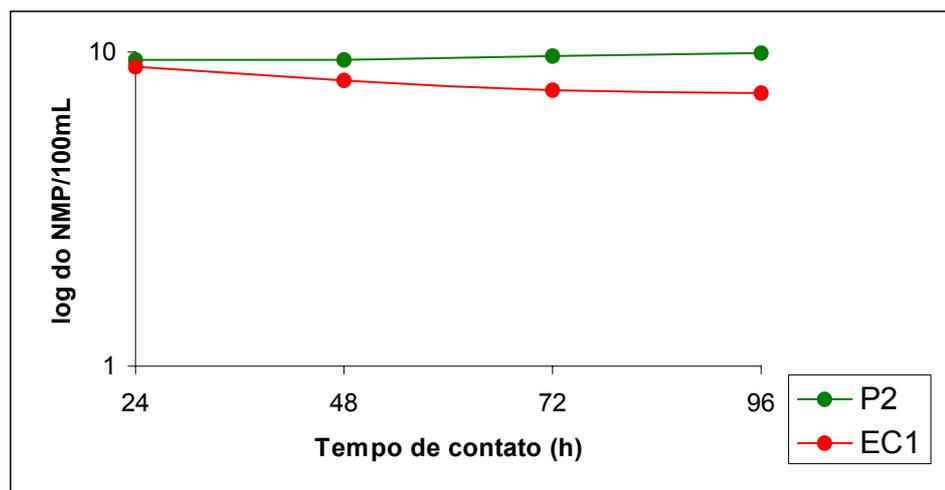


Figura 26 – Resultados expressos em log do NMP/100mL do ensaio do antagonismo entre as linhagens P2 e EC1 com inóculos iniciais cerca de 10^8 UFC/mL (P2) e cerca de 10^2 UFC/mL (EC1).

No teste de contato entre a linhagem EC1 e a linhagem P16 (Figura 27), houve um crescimento de 56 vezes de P16 (de $1,6 \times 10^8$ para 9×10^9) em contraste com uma queda de 10 vezes do NMP de EC1 no intervalo de 96h (de $1,6 \times 10^9$ para $2,7 \times 10^7$). O decréscimo mais acentuado da população de EC1 ocorreu entre t_{48} e t_{72} (de $2,4 \times 10^8$ para $5,1 \times 10^7$). Como no teste anterior, os valores máximos do NMP das linhagens P16 e EC1 foram alcançados em t_{96} , com uma distância, numa razão de 10^2 entre ambas.

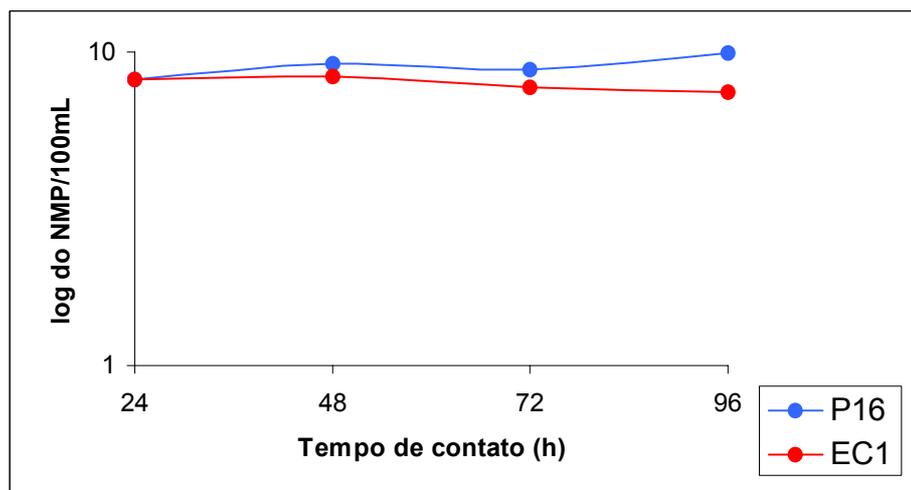


Figura 27 – Resultados expressos em log do NMP/100mL do ensaio do antagonismo entre as linhagens P16 e EC1 com inóculos iniciais cerca de 10^8 UFC/mL (P16) e cerca de 10^2 UFC/mL (EC1).

O teste com as linhagens padrões ATCC (Figura 28) apresentou o mesmo perfil do teste com a linhagem EC1 (Figura 23). Houve uma distância da razão de 10^2 entre as linhagens padrão de *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *E. coli* ATCC 25922, com uma queda 3,5 vezes do coliforme (de $1,6 \times 10^8$ para $4,5 \times 10^7$) e aumento de 3 vezes no NMP para *P. aeruginosa* (de $1,6 \times 10^8$ para 5×10^9). Observa-se no perfil das curvas, uma tendência de aumento da população da bactéria *P. aeruginosa* a partir de t_{72} com o início da fase de morte de *E. coli*. O intervalo onde se registrou a maior queda da população de *E. coli* ATCC 25922 (5,5 vezes) foi entre t_{72} e t_{96} (de $2,4 \times 10^8$ para $4,5 \times 10^7$).

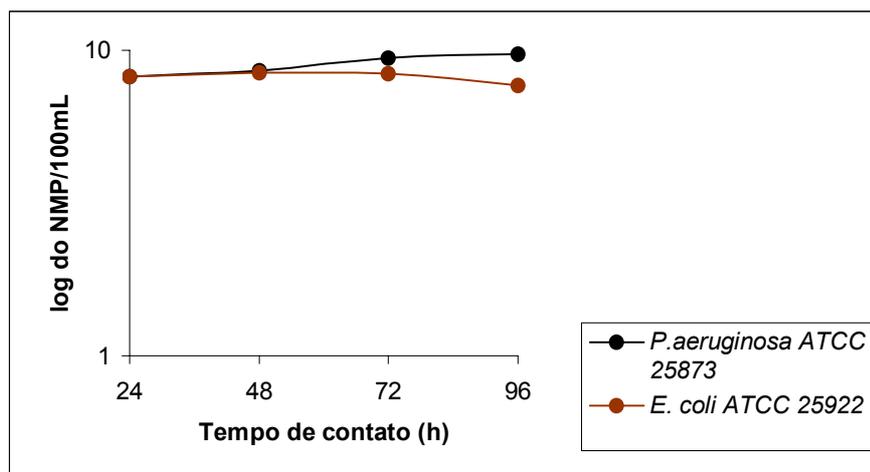


Figura 28– Resultados expressos em log do NMP/100mL do ensaio do antagonismo entre as linhagens padrão de *P. aeruginosa* ATCC 25783 (inóculo inicial cerca de 10^8 UFC/mL) e *E. coli* ATCC 25922 (inóculo inicial cerca de 10^2 UFC/mL).

Comparando-se os resultados de todos os testes de contato realizados, a linhagem EA1 mostrou ser a linhagem mais sensível à bactéria *P. aeruginosa*, confirmando o resultado obtido no ensaio antimicrobiano em meio sólido. Vale salientar, no entanto, que também EC1 apresentou-se bastante susceptível à inibição por P14 (Figura 25). De acordo com Camper *et al.* (1991), geralmente *E. aerogenes* em baixas concentrações de carbono, tem o menor crescimento se comparada a outro coliforme. Os membros do grupo coliforme com exceção de *E. coli*, não crescem à temperatura de $44,5^{\circ}\text{C}$ e não são exclusivos da flora intestinal de animais de sangue quente (BERGEY'S MANUAL, 1984; BRASIL, 2004), provavelmente por isso, EA1, membro dos coliformes totais, seja mais sensível quando comparada à EC1, um microrganismo termotolerante e talvez mais adaptado às elevações de temperatura, comuns em climas tropicais.

A pesquisa da bactéria *P. aeruginosa* em amostras de água, vem sendo questionada ao longo dos anos por ser a mesma, considerada uma bactéria oportunista de origem não fecal (POLLAK, 2003; SHRIVASTAVA *et al.*, 2003). A discussão a respeito da sua inclusão nas análises de águas deve ser reascendida no momento em que é confirmado um fenômeno de antagonismo e interferência contra um grupo considerado indicador universal

de contaminação e potabilidade. A afirmação da influência negativa da bactéria *P. aeruginosa* sobre os coliformes tem suporte nos resultados apresentados nesse presente trabalho.

Não é recente o conhecimento do fenômeno do antagonismo entre *P. aeruginosa* e o grupo coliforme (D'ÁQUILA *et al.*, 2000; NASCIMENTO *et al.*, 2000; TANCREDI *et al.*, 2002), apesar do mesmo ainda não estar elucidado. A hipótese mais aceita é a inibição do crescimento causada pela produção de piocianina (GUILHERME & SILVA, 2000). Além disso, a piocianina está envolvida com a inibição da oxidação de cetó-ácido em *E. coli* e ao sinergismo com citocinas, entre outros fenômenos (DENNING *et al.*, 1998).

Cerca de 90-98% das linhagens da bactéria *P. aeruginosa* produzem tal pigmento (REYES *et al.*, 1981; MAVRODI *et al.*, 2001; FREITAS & BARTH, 2004) e esta característica torna-se um indicador complementar nas análises de água (REYES *et al.*, 1981). A razão de a piocianina interferir nas análises colimétricas e ser a principal responsável pelo fenômeno do antagonismo contra os coliformes, é justificada pelo conhecimento do seu mecanismo de ação (O'MALLEY *et al.*, 2003). Estudos futuros que extraíam o pigmento e quantifiquem a concentração mínima para o fenômeno começar a ser observado, poderão elucidar esta questão.

Estudos futuros poderão também esclarecer se a liberação de bacteriocinas produzidas pela *P. aeruginosa* (piocinas), produzida por mais de 90% das linhagens, está relacionada com o fenômeno. As piocinas são liberadas no momento da lise celular e encontram receptores em células susceptíveis, causando sua morte (MAVRODI *et al.*, 2001). Isto ocorreria justo ao final da fase logarítmica da bactéria *P. aeruginosa* e durante a fase estacionária, principalmente. O que pode justificar a redução da população de coliformes, observada neste trabalho, justo a partir de 48h de contato.

Outro fator de virulência importante, a exotoxina-A, por estar ligada à despolarização da membrana (O'MALLEY *et al.*, 2003) e à inibição da síntese protéica (VAN DELDEN & IGLEWSKI, 1998), é provável que possa estar envolvida com fenômenos como o antagonismo entre células mais

sensíveis. As proteases e a formação do alginato que tornam a bactéria *P. aeruginosa* ainda mais adaptada, também podem ser sugeridos como fatores ligados ao antagonismo com o grupo coliforme (VAN DELSDEN & IGLEWSKI, 1998; ELASRI & MILLER, 1999).

Como os fatores de virulência estão agregados, provavelmente o fenômeno do antagonismo dependa não apenas de um único mecanismo, mas de vários que se interligam podendo envolver até mesmo o fenômeno de *Quorum-sensing* (VAN DELDEN & IGLEWSKI, 1998).

As linhagens P2, P14 e P16 assim como a padrão *P. aeruginosa* ATCC 25873, apresentaram um crescimento muito rápido logo nas primeiras 24-48h, como já foi descrito. Um rápido crescimento inicial pode ser em função de uma adaptação à baixa concentração de sais. Nesta condição, o crescimento é rápido no início e torna-se mais lento entre o terceiro e quinto dia e atinge o máximo em sete dias (LEGANI *et al.*, 1999).

O tempo de geração das linhagens estudadas de *P. aeruginosa*, crescidas sem competição foi de 4,4h, 4,2h, 4,8h e 3,9h, respectivamente. Estes valores foram coerentes com o tempo de geração relatado por Tagmanini & Gonzáles (1997) de 3 a 6h, em uma situação semelhante de baixa concentração de nutrientes. Provavelmente o tempo de geração das linhagens P2, P14, P16 e da linhagem de referência, aumentou quando a bactéria se encontrava em competição com os coliformes.

Os coliformes não são hábeis para proliferar com baixas concentrações de carbono orgânico (STANDING COMITEE OF ANALYSTS, 2002), sendo a temperatura, seletiva para seu crescimento. A luz solar diminui a sobrevivência dos coliformes e aumenta a probabilidade de patógenos oportunistas estarem presentes na ausência de coliformes (HAGLER *et al.*, 1986). Desta forma, *P. aeruginosa* tem todos os atributos e características para sobreviver e competir com qualquer microrganismo mais sensível.

Mesmo considerando a piocianina possuidora apenas de um efeito bacteriostático sobre o grupo coliforme (GUILHERME & SILVA, 2000), existe o risco de se aprovar uma água para consumo humano, onde os níveis dos

indicadores microbiológicos (coliformes) seriam ditos em acordo com a legislação, sem que isto traduzisse, na verdade, uma boa qualidade e segurança da água, ou seja, apesar de não terem sido tais coliformes, capazes de serem detectados e crescerem nas condições descritas, demais bactérias, vírus e parasitos patogênicos, com ciclo intestinal no homem, continuariam presentes na água e sem probabilidade de serem presumidos.

Em águas residuárias tratadas para posterior despejo em leitos de rios, o risco de tal fenômeno ocorrer é alto e preocupante, por conta da adaptação de *P. aeruginosa* à elevada oferta de nutrientes, aos níveis de metais pesados, ao pH, à luminosidade, à temperatura, à concentração de oxigênio, registrados em tais águas, que poderão favorecer à citada bactéria, em particular. Outras bactérias, mais susceptíveis a tais variações de condições ambientais, sofreriam com a competição nas lagoas de estabilização quando encontrassem corpos de água onde uma alta carga da bactéria *P. aeruginosa* desfavorecesse o crescimento das populações, por exemplo, de coliformes.

É sabido que a bactéria *P. aeruginosa* persiste na água por mais tempo, podendo diminuir o potencial de sobrevivência da bactéria *E. coli* por aumentar a competição por nutrientes e, finalmente, antagonizar a microbiota indígena (BANNING, 2003). A presença de *P. aeruginosa* quando as contagens de *E. coli* são menores de 1000/100mL não necessariamente leva a falha do grupo como indicador (HAGLER *et al.*, 1986), mas é um fato que deve ser considerado.

Os resultados aqui apresentados mostraram que *P. aeruginosa* partindo de uma população aproximadamente de 10^2 UFC/mL atingiu uma concentração celular cerca de 10^8 UFC/mL em 72h, momento em que se inicia o contato com uma população de cerca de 10^2 UFC/mL dos coliformes, valor que corresponde ao t_0 do teste de contato quando as populações distanciavam 10^6 UFC/mL (Figuras 20, 21, 22, 23, 25, 26, 27 e 28).

Em apenas 24h de incubação, os coliformes foram capazes de atingir uma população cerca de 10^8 em razão do tempo de geração destes ser mais curto. No entanto, a partir do contato inicial (t_0) com a população de *P.*

aeruginosa que ainda se encontrava em fase logarítmica, com piocianina presente, os coliformes sofreram uma diminuição do NMP, observada a partir de 24h de contato. A distância estabelecida entre as duas populações testadas foi da ordem de 10^2 e 10^5 no tempo t_{96} .

Isso justifica a participação da piocianina no fenômeno de antagonismo afirmada por D'Áquila *et al.* (2000) e Guilherme & Silva (2000). Considera-se que a bactéria *P. aeruginosa* pode continuar na fase logarítmica por até 7 dias desde a inoculação, em presença de baixa concentração de carbono orgânico (LEGANI *et al.*, 1999).

As diferentes situações de isolamento demonstram que freqüentemente *P. aeruginosa* se encontra na natureza numa concentração populacional variando de 10^2 a 10^5 (CARSON *et al.*, 1975; WHEATER *et al.*, 1980 e HARDALO & EDBERG, 1997), enquanto que os coliformes totais na faixa de 10^2 e 10^7 (MOYES, 2000; RIBEIRO & KJIERVFE, 2002; ZDRAGAS *et al.*, 2002). No entanto, não é excluída a possibilidade de se encontrar populações maiores ou menores. O fenômeno do antagonismo ficou evidente quando a diferença entre as populações da bactéria *P. aeruginosa* e dos coliformes foi de 10^6 vezes, entretanto, foi observado quando a população partiu do inóculo de 10^2 UFC/mL.

Mesmo que as condições do laboratório jamais reproduzam o que ocorre na natureza, este estudo alerta para o fato de que o fenômeno do antagonismo é real, passível de ser quantificado e podendo ser desencadeado quando as condições ambientais forem propícias.

Os resultados dessa pesquisa reascendem uma discussão crítica sobre tal fenômeno, assim como, o considera motivo de preocupação e sugere maiores investigações quando a presença da bactéria *P. aeruginosa* for registrada em elevadas concentrações em amostras de águas.

6– CONCLUSÕES

- O fenômeno de antagonismo entre linhagens da bactéria *P. aeruginosa* isoladas de ambientes naturais e o grupo coliforme foi comprovado tanto em testes qualitativos em meio sólido quanto em testes quantitativos em meio líquido.
- O fenômeno do antagonismo foi mais evidente quando a diferença entre as populações iniciais das linhagens de *P. aeruginosa* (cerca de 10^8) e dos coliformes (cerca de 10^2) estava estabelecida em 10^6 UFC/mL no momento do contato.
- O fenômeno do antagonismo é claramente observado a partir das primeiras 24h após o contato entre *P. aeruginosa* e coliformes.
- A produção de pigmento por *P. aeruginosa* está envolvida no fenômeno de inibição dos coliformes.
- As linhagens P14, isolada no poço de entrada da lagoa de estabilização do Aterro sanitário da Muribeca e P15, isolada da saída do efluente no Aterro Sanitário da Muribeca, se mostraram como as linhagens mais agressivas contra EA1 no ensaio antimicrobiano em meio sólido.
- As linhagens P14, isolada no poço de entrada da lagoa de estabilização do Aterro sanitário da Muribeca e P16, isolada de poço, se mostraram como as linhagens mais agressivas contra EC1 no ensaio antimicrobiano em meio sólido.
- Das linhagens isoladas nos Poços de Observação do Cemitério da Várzea, P2 (do Poço de Observação 2) foi a mais agressiva contra EA1 e P3 (do Poço de Observação 3) a mais agressiva contra EC1.
- Dentre as linhagens estudadas no teste de contato em meio líquido, P14 foi a linhagem mais agressiva contra EA1 e EC1 do que P2 e P16, respectivamente, o que demonstra existência de variabilidade na virulência entre espécies disseminadas no ambiente natural.
- *E. aerogenes* (EA1) demonstrou mais sensibilidade à bactéria *P. aeruginosa* do que a bactéria *E. coli* (EC1) no ensaio antimicrobiano em meio sólido.

- As bactérias *E. aerogenes* (EA1) e *E. coli* (EC1) tiveram redução do NMP da ordem de 10^1 a 10^3 na presença da bactéria *P. aeruginosa*, no teste de contato em meio líquido.
- A linhagem P2 obteve um aumento do NMP de 3,5 vezes entre t_{24} e t_{96} após inoculada isoladamente em caldo MH 10%. Em situação de competição com os coliformes, houve um aumento do NMP de 3-4 vezes nos mesmos intervalos.
- A linhagem P14 apresentou um aumento do NMP de 13 vezes entre t_{24} e t_{96} ao ser inoculada, isoladamente, em caldo MH 10%. Em situação de competição com os coliformes, houve um aumento do NMP de até 38 vezes nos mesmos intervalos,
- A linhagem P16 obteve um aumento do NMP de 10 vezes entre t_{24} e t_{96} ao ser inoculada, isoladamente, em caldo MH 10%. Em situação de competição com os coliformes, houve um aumento do NMP de até 56 vezes nos mesmos intervalos.
- Os resultados sugerem a existência de um estímulo de crescimento de *P. aeruginosa* provocado pela presença de membros do grupo coliforme.
- Todas as linhagens da bactéria *P. aeruginosa* foram sensíveis aos antibióticos testados e as linhagens P14 e P15 obtiveram um perfil diferente entre todas, comportando-se como as mais resistentes, apesar de terem sido consideradas sensíveis de acordo com o diâmetro do halo de inibição formado adotado na clínica para tal classificação.
- A enumeração da bactéria *P. aeruginosa* incluída na rotina de algumas classes de águas, poderá servir como uma ferramenta adicional nas análises podendo assegurar a confiabilidade de tais resultados. Mesmo não sendo indicadora de contaminação fecal, essa bactéria poderá ter um papel fundamental como indicadora de risco de resultados falso negativos.

7- SUGESTÕES

- Uma vez verificado fenômeno do antagonismo entre *P. aeruginosa* com bactérias do grupo coliforme, faz-se necessário investigar mais profundamente os mecanismos de como a inibição acontece.
- Investigar se o efeito entre a bactéria *P. aeruginosa* e os coliformes é bactericida e não somente bacteriostático.
- Investigar a partir de qual concentração de piocianina, o fenômeno de antagonismo começa a ser evidenciado.
- Relacionar a existência entre o fenômeno do antagonismo quando as linhagens da bactéria *P. aeruginosa* são multirresistentes à drogas e a desinfetantes.
- Desenvolver um estudo para verificar se o fenômeno de antagonismo entre *P. aeruginosa* e o grupo coliforme continua a ocorrer quando a concentração celular dos coliformes é maior do que *P. aeruginosa*.
- As interferências nas análises colimétricas devem ser divulgadas e consideradas. Trabalhos nesta área devem ser desenvolvidos para que os órgãos de saúde venham estabelecer padrões e alertar quais os microrganismos que podem causar estas interferências.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACAR, J. F. ; GOLDSTEIN, F. W. **Disk susceptibility test**. In: Lorian, V. ; Antibiotics in laboratory medicine, 2nd ed., Baltimore: Williams & Wilkins,p 27-63, 1986.

AGARWAL, G. ; KAPIL, A. ; KABRA, S. K. ; CHANDRA, R. ; DAS, B. ; DIWEDI, S. N. **Phenotypic & genotypic variants of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from children with cystic fibrosis in India** . Indian Journal of Medical Research, n. 116, p. 73-81, 2002.

ALEXANDER, M. **Biodegradation and bioremediation**, 2nd ed., San Diego: Academic press, 453p., 1999.

ALONSO, A. ; ROJO, F.; MARTÍNEZ, J. L. **Environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* shows pathogenic and biodegradative properties irrespective of their origin**, Environmental Microbiology, v. 1, n. 5, p. 421-430, 1999.

APHA, American Public Health Association. **Microbiological examination of water In: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**,20th ed.: Washington, part 9000,1998.

ANNAN, K. **Message on world water day 2004 “Water and disasters: Be informed and be prepared”**. Carta, disponível em <<http://www.unescap.org/unis/press/2004/mar/l09.asp>>, acesso em 22 mar 2004.

ARAÚJO, J. M. **Comunicação pessoal**. Recife: Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco.

AREVALO-FERRO, C.; HENTZER, M.; REIL, G; GÖRG, A.; KJELLEBER, S.; GIVSKOY, M.; RIEDEL, K.; EBERL, L. **Identification of quorum-sensing regulated proteins in the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* by proteomics**, Environmental Microbiology., v. 5, n. 12, p. 1350-1357, 2003.

AUDETTE, G. F. ; IRVIN, R. T.; HAZES, B. **Purification, crystallization and preliminary diffraction studies of the *Pseudomonas aeruginosa* strain K122-4 monomeric pilin**. Acta Crystallographica, section D59, p. 1665-1667, 2003.

BANNING , N.; TOZE, S.; MEE, B. J. **Persistence of biofilm-associated *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* in groundwater and treated effluent in a laboratory model system**, Microbiology, v. 149, p. 47-55, 2003.

BAKER, K. H. ; HERSON, D. S. **Bioremediation**, 1sted.: New York, McGraw-Hill, 375p., 1994.

BARBEAU, J.; GAUTHIER, C. ; PAYMENT, P. **Biofilms, infections agents and dental unit waterlines: a review**, Canadian Journal of Microbiology., n. 44, p. 1019-1028, 1998.

BELBA, M. **Complications in severely burned patients and their development according to the periods of the disease**. Annals of burns and fire disasters, v. XV, n.1, 2002.

BERGEY'S MANUAL. **Manual of systematics bacteriology**, Baltimore: Williams & Wilkins, v.1, 9th ed., 1984, p.141-165,420-22,462-3,465-9.

BHARATHI, M. J. ; RAMAKRISHNAN, R. ; VASU, S. ; MEENAKSHI, R. ; SHIVKUMAR, C.; PALANIAPPAN, R. **Epidemiology of bacterial keratitis in a referral center in south India**. Indian Journal of Medical Microbiology, v. 21, n. 4, p. 239-245, 2003.

BORGES, J. L. & GUERRERO, M. **O livro dos seres imaginários**, 1^a ed. (revisada), Rio de Janeiro: Globo, 237p., 2000.

BORGMANN-STRAHSEN, R. **Comparative assessment of different biocides in swimming pool water**, International biodeterioration & biodegradation, n. 51, p. 291-297, 2003.

BOTES, J.; WILLIAMSON, G.; SINICKAS, V.; GÜRTLER **Genomic typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates by comparison of ribotyping and PFGE: correlation of experimental results with those predicted from the complete genome sequence of isolate PA01**, Journal of Microbial Methods, n. 55, p. 231-240, 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução nº 54 de 15 de junho de 2000**, Dispõe sobre o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Água Mineral Natural e Água Natural, Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília,DF, 19 jun. 2000.

BRASIL. **Lei Federal nº9.433,de 08 de janeiro de 1997**, Institui a Política Nacional de Recursos Hídricos, cria o Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos, regulamenta o inciso XIX do art. 21 da Constituição Federal e altera o art. 1º da Lei nº 8.001, de 13 de março de 1990, que modificou a Lei nº 7.990, de 28 de dezembro de 1989. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília,DF, 08 jan. 1997

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº518 de 25 de março de 2004**, Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. Diário oficial da República federativa do Brasil, Brasília,DF, 26 mar 2004.

BRETT, M.; ELLIS PEGLER, R. **Surveillance of antimicrobial resistance in New Zealand**, New Zealand Public Health report, v. 8, n. 3, p. 17-24, 2001.

BRITO, D. V. D. ; OLIVEIRA, E. J. , MATOS, C., ABDALLAH, V. O. S.; GONTIJO FILHO, P. P. **An outbreak of conjunctivitis caused by multiresistent *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian newborn intensive care unit**. The Brazilian journal of infectious diseases, v. 7, n. 4, p. 234-235, 2003.

BROCK. **Biology of microorganisms**, 9th ed. , New Jersey: Prentice hall, 1045p, 2000.

CAMPBELL, M.; MAHENTHIRALINGAM, E.; SPEERT, D. P. **Evaluation of Random Amplified Polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa***. Journal of Clinical Microbiology., v. 38, n. 12, p. 4614-4615, 2000.

CAMPER, A. K. ; McFETERS, G. A. ; CHARACKLIS, W. G.; JONES, W. L. **Growth kinetics of coliform bacteria under conditions relevant to drinking water distribution systems**, Applied Environmental Microbiology., v. 57, n. 8, p. 2233-2239, 1991.

CARSON, L. A. ; PETERSEN, N. J. ; FAVERO, M. S. ; DOTO, I. L. ; COLLINS, D. E.; LEVIN, M. A. **Factors influencing detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* by Most-Probable-Number and membrane filtration techniques**, Applied microbiology, v. 30, n. 6, p. 935-942, 1975.

CARVALHO, V. F. **Simbolismo da água**. Disponível em <www.profios.hpg.ig.com.br/html/artigos/agua_simbolo_vida.htm> acesso em 29 jun 2004.

CASCUDO, L. C. **Lendas brasileiras**, 4^a ed., Rio de Janeiro: Ediouro, 176p., 2000.

CETESB- Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. **Determinação do NMP de *P. aeruginosa* pela técnica dos tubos múltiplos**, normatização técnica L5220, 1979.

CHEN, C. H. ; LU, J. J. ; LIU, Y. T. ; LEE, J. H. ; LEE, W. H. and LEE, C. H. **Comparison of three typing methods for *Pseudomonas aeruginosa***, Zhonghua mim guo wei sheng wu ji mian yi xue za, v. 29, n.2, p. 90-99, 1996.

CNBB. Conferencia Nacional dos bispos do Brasil. **Fraternidade e água: texto-base da Campanha da fraternidade 2004**, São Paulo: Salesiana, 1^a. ed., 2003, 153p.

CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução nº 274 de 29 de novembro de 2000**, recomenda adoção e sistemática de avaliação da qualidade ambiental das águas e revoga artigos 26 a 34 da resolução CONAMA nº 20 de 18 de junho de 1986. Diário Oficial da União, Brasília, DF,08 jan 2001.

CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução nº 20 de 18 de junho de 1986**, dispõe sobre a classificação das águas doces, salobras e salinas, em todo Território Nacional,bem como determina os padrões de lançamento. Diário Oficial da União, Brasília,DF,30 jul 1986.

COSGROVE, W .S. ; RIJSBERMAN, F. R. **Challenge for the 21st Century: Making water everybody's business**. Paris: World water council, 2000. p. 149-156.

COSTA, L. J. P. **Análise bacteriológica da água**, editora universitária UFPB, João Pessoa: 462p. , 1979.

COUNCIL OF THE EUROPEAN UNION, **Council directive 98/83/EC on quality of water intended for human consumption**, Official Journal, n. 330, p. 32-54, 05 Dec 1998.

COX, C. D. **Role of pyocyanin in the acquisition of iron from transferrin**, Infection and immunity, v. 52, n.1, p. 263-270, 1986.

DRABOWSKI, W. ; CZEKAJTO-KOLODZIEJ, U. ; MEDRALA, D.; GIEDRYS-KALEMBA, S. **Optimization of AP-PCR fingerprinting discriminatory power for clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa***, FEMS-Microbiology letters, n. 218, p. 51-57, 2003.

DANIEL, L. A. **Processos de desinfecção e desinfetantes alternativos na produção de água potável**, Projeto PROSAB- Programa de pesquisa em saneamento básico, 1^a. ed., Rio de Janeiro: ABES, 2001, 155p.

D'ÁQUILA, P. S ; ROQUE, O. C. D. ; MIRANDA, C. A S. ; FERREIRA, A P. **Avaliação da qualidade de água para abastecimento público do município de Nova Iguaçu**, caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro. v.16, n.3, p.791-798, jul-set 2000.

DE VICTORICA, J. ; GALVAN M. ***Pseudomonas aeruginosa* as an indicator of health risk in water for human consumption**, Water science technology . v.43, n.12, p.49-52, 2001.

DE VOS, D. ; LIM Jr, A. ; PIRNAY, J. P.; DUINSLAEGER, L. ; REVETS, H. ; VANDERKELEN, A. ; HAMERS, R.; CORNELIS, P. **Analysis of epidemic *Pseudomonas aeruginosa* isolates by isoelectric focusing of pyoverdine and RAPD-PCR: modern tools for an integrated anti-nosocomial infection strategy in burn wound centers**, Burns, v. 23, n. 2, p. 379-386, 1997.

DENNING, G. M. ; WOLLENWEBER, L. A. ; RAILSBACK, M. A. ; COX, C. D. ; STOLL, L.; BRITIGAN, B. E. ***Pseudomonas* pyocyanin increases interleukin-8 expression by human airway epithelial cells**, Infection and Immunity, v. 66, n. 12, p. 5777-5784, 1998.

DI MARTINCO, P. ; GAGNIÈRE, H. ; BERRY H.; BRET, L. **Antibiotic resistance and virulence properties of *Pseudomonas aeruginosa* strains from mechanically ventilated patients with pneumonia in intensive care units: comparison with Imipenem-resistents extra-respiratory tract isolates from uninfected patients**, microbes and infection, n. 4, p. 613-620, 2002.

DONATO, H. **A história do calendário**, 3^a. ed., São Paulo: Melhoramentos, 1993, 158p.

DUBOIS, V. ; ARPIN, C. ; MELON, M. ; MELON, B. ; ANDRE, C.; FRIGO, C.; QUENTIN, C. **Nosocomial outbreak due to a multiresistent strain of *Pseudomonas aeruginosa* P12: efficacy of Cefepime-Amikacin therapy and analysis of β -lactam resistance**, Journal of clinical microbiology, v. 39, n.6, p. 2072-2078, 2001.

DUNCAN, D. E. **Calendário, a epopéia da humanidade para determinar um ano verdadeiro e exato**, 1^a. ed. ,Rio de Janeiro: Ediouro, 1999, 429p.

ELASRI, M. O.; MILLER, R. V. **Study of the response of a biofilm bacterial community to UV radiation**. Applied Environmental Microbiology, v. 65, n. 5, p. 2025-2031, 1999.

EMTIAZI, F. ; SCHWARTZ, T. ; MARTEN, S. M. ; KROLLA-SIDENSTEIN, P.; OBST, U. **Investigation of natural biofilms formed during the production of drinking water from surface water embankment filtration**, Water Research., n. 38, p. 1197-1206, 2004.

EPA. United States Environmental Protection Agency. **The Story of drinking water treatment**. In: EPA. 25 years of the safe drinking water act: history and trends. Disponível em <<http://www.epa.gov/safewater/consumer/hist.pdf>> acesso em 31 out 2004.

ERGIN, Ç. ; MUTLU, G. **Clinical distribution and antibiotic resistance of *Pseudomonas* species**, Eastern journal of Medicine, v. 4, n.2, p. 65-69, 1999.

EROL, S. ; ALTOPARLAK, U. ; AKCAY, M. N. ; CELEBI, F.; PARLAK, M. **Changes of microbial flora and wound colonization in burned patients**. Burns, v. 30 , n. 4, p. 357-361, 2004.

ESPÍNDOLA, J. C. **Caracterização bacteriológica e físico-química das águas do aquífero freático do cemitério da Várzea-Recife**, dissertação de mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2004. 87f.

FALCÃO, D. P. ; LEITE, C. Q. F. ; SIMÕES, M. J. S. ; GIANINNI, M. J. S. M.; VALENTINI, S. R. **Microbial quality of recreational waters in Araraquara, SP, Brazil**, The Science of the total Environment, v. 128, p. 37-49, 1993.

FARMÁCIA & QUÍMICA: revista quadrimestral. São Paulo: Sociedade de Farmácia e Química de São Paulo, v. 36, n. 1, p. 6-11, 2003.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4^a. ed., parte 1, método geral V. 5.1.7., São Paulo: Atheneu, 1988.

FERNANDÉZ, M. C.; GIAMPAOLO, B. N.; IBAÑEZ, S. B.; GUAGLIARDO, M. V.; ESNAOLA, M. M., CONCA, L.; VALDIVIA, P; STROGNARO, S. M., CHIALE, C.; FRADE, H. ***Aeromonas hydrophila* and its relation with drinking water indicators of microbial quality in Argentina**, Genetica, v.108, n. 1, p. 35-40, 2000.

FIELDS, M. **Otitis externa**. New Zealand Medical Journal, v. 29, n. 2, 108-111, 2002.

FILALI, B. K.; TAOUFIK, J.; ZEROUAL, Y.; DZARI, F. Z.; TALBI, M.; BLAGHEN, M. **Wastewater bacterial isolates resistant to heavy metals and antibiotics**, Current Microbiology, v. 41, n. 3, p. 151-156, 2000.

FITAS PARA DETERMINAÇÃO DE OXIDASE PROBAC: fitas. Responsável técnico Rosana P. C. Fernandes. São Paulo: Probac do Brasil produtos bacteriológicos Ltda., 2004. Bula de teste de diagnóstico *in vitro*.

FREITAS, A. L.; BARTH, A. L. **Typing of *Pseudomonas aeruginosa* from hospitalized patients: a comparison of susceptibility and biochemical profiles with genotype**, Brazilian Journal of Medical Biology Research., v. 37, n. 1,p. 77-82, 2004.

GAIL, M.; PARSEK, M. A. **Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa***, Applied and environmental microbiology, v. 69, n. 4, p. 2313-2320, 2003.

GARRIDO, R. **Water Resources National Policy in Brazil. Prepared for Thematic Review V.3: River basins-institutional frameworks and management options**, 2000. disponível em: < www.dams.org/docs/kbase/contrib/ins226.pdf > acesso em 23 ago. 2003.

GLEESON, C. ; GRAY, N. **The Coliform index and wasteborne disease, problems of microbial drinking water assessment**, London: E & FN Spon, 1st ed. 1997. 194p.

GOODMAN & GILMAN **As bases farmacológicas da terapêutica**, 9^a. ed., Rio de Janeiro: Mc. Graw Hill, 1436p., 1996.

GOODMAN, A. L.; LORY, S. **Analysis of regulatory networks in *Pseudomonas aeruginosa* by genomewide transcriptional profiling**, Current Opinion in Microbiology, v. 7, n. 1, p. 39-44, 2004.

GOLDBERG, J. B. ***Pseudomonas*: global bacteria**, Trends in Microbiology, v. 8, n. 2, p. 55-57, 2000.

GROBE, S. ; WINGENDER, J. ; FLEMMING, H. C **Capability of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to survive in chlorinated water**, International Journal of Hygiene and Environmental Health, v. 204, n.2-3, p.139-142, 2001.

GUILHERME, E. F. M. ; SILVA, J.A.M. ***Pseudomonas aeruginosa* como indicador de contaminação hídrica**, Revista Higiene Alimentar, v. 14, n.76, p.43-47,2000.

GUIMARÃES, M. A. ; TIBANA, A. ; NUNES, M. P. ; DOS SANTOS, K. R. N. **Desinfectant and antibiotic activities: A comparative analysis in Brazilian hospital bacterial isolates**, Brazilian Journal of microbiology, n. 31, p. 193-199, 2000.

HAGLER, A. N.; MENDONÇA-HAGLER, L.; SANTOS, E.; FARAGE, S.; SILVA FILHO, J. B. ; SCHRANK, A.; DE OLIVEIRA, R. B. **Microbial pollution indicators in Brazilian tropical and subtropical marine surfaces waters**, The Science of the total Environment, v. 12, n. 58, p. 151-160, 1986.

HARDALO C. ; EDBERG, S. C. ***Pseudomonas aeruginosa*: Assessment of risk from drinking water**, Critical Reviews on Microbiology. , v. 23, n.1, p.47-75,1997.

HENDRY, G. S. ; JAHURST ,S. ; HORSENEILL, G. **Some effects of pulp and paper wastewater on microbiological water quality of a river**, Water Research, v. 16, n. 7, p. 1291-95, 1982.

HENDRY, G. S.; LEGGATT, A. **Some effects of shoreline cottage development on lake bacteriological water quality**, Water Research, v. 16, n. 8, p. 1217-1222, 1982.

HERNANDEZ J.; FERRUS, M. A. ; HERNANDEZ, M.; ALONSO, J. L. **Comparison of six different methods for typing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from bottled and well waters**, Water Research, v. 31, n. 12, p. 3169-3174, 1997.

HIGSMITH, A. K.; LE, P. N. ; KHABBAZ, R. F.; MUNN, V. P. **Characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from whirlpools and bathers**, Infection Control., v. 6, n.10, p. 407-412, 1985.

HIRATA, M. H. ; MANCINI FILHO, J. **Manual de Biossegurança**, 1^a.ed., Bauer, Manole, 496p., 2002.

HOCQUET, D. ; BERTRAND, X. ; KÖHLER, T. . TALON, D.; PLÉSIAT, P. **Genetic and phenotypic variations of a resistant *Pseudomonas aeruginosa* epidemic clone**. Antimicrobial Agents and Chemotherapy., v. 47, n. 6, p. 1887-1894, 2003.

HOLLYOAK, V. ; BOYD, P.; FREEMAN, R. **Whirlpool baths in nursing homes: use, maintenance, and contamination with *Pseudomonas aeruginosa*** , Communicable Disease Report CDR Review, v. 5, n. 7, p. 102-104, 1995.

HPA. Health Protection Agency. **Enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* by membrane filtration**, issue 2.2, 11p.,2003.

HURST, C. J.; KNUDSEN, G. R.; McINERNEY, M. J.; STETZENBACH, L. D.; WALTER, M. V. **Manual of Environmental Microbiology**, 1st ed., Washington: American Society for Microbiology, 894p., 1996.

HSU, K. H. ; BEN, R. J. ; SHIANG, J. C.; FENG, N. H. ***Pseudomonas aeruginosa* endocarditis associated with endophthalmitis caused by arteriovenous fistula and graft infection**. Journal of Chinese Medical Association, v. 66, n. 10, p. 615-618, 2003.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Atlas do Saneamento**. Direção geral de Maria Luiza Gomes Castello Branco. Rio de Janeiro: IBGE, 2004, CD-ROM.

ISHIKAWA, T.; DATE, M. ; ISHIKURA, T.; OZAKI, A. **Improvement of kasugamycin-producing strain by the agar piece method and the prototroph method.** Folia microbiologica, v. 16, 1971. p-218-224.

IPB. Instituto Pinho-Bravo. **História da legislação**, disponível em <<http://ipb.8m.com/legis.htm>> acesso em: 21 abr 2004.

JALALUDDIN, S.; DEVASTER, J.; SCHEEN, R.; GERARD,M.; BUTZLER,J. **Molecular epidemiological study of nosocomial *Enterobacter aerogenes* isolates in a Belgian hospital**, Journal of clinical microbiology, v. 36, n. 7, p. 1846-1852, 1998.

JUCÁ, J. F. T. **Disposição final dos resíduos sólidos urbanos no Brasil**, In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GEOÉTICA AMBIENTAL, 5., 2003, Porto Alegre, **consulta de textos publicados, Grupo de Resíduos Sólidos-Universidade Federal de Pernambuco**, disponível em < <http://www.grs-ufpe.com.br/downloads/publicacoes/regeo2003-juca1.pdf> >, acesso em 31 jul 2004.

JUCÁ, J. F. T.; MELO, V. L. A. ; BELTRÃO, K. Q. B. ; PAES, R. F. C **Sistema de tratamento de chorume proposto para o Aterro da Muribeca, Pernambuco-Brasil**, relatório técnico, Universidade Federal de Pernambuco, 13p., 2002.

KARAKOC, B. ; GERCEKER, A. A. **In-vitro activities of various antibiotics, alone and in combination with amikacin against *Pseudomonas aeruginosa***, International Journal of Antimicrobial Agents, v. 18, n. 6, p. 567-570, dez. 2001.

KIELY, G. ; VEZA, J. M. **Ingeniería ambiental: Fundamentos, entornos, tecnologías y sistemas de gestión**, Madrid: Mc Graw Hill, 1999, 1331p

KIMATA N. ; NISHINO, T. ; SUZUKI, S.; KOGURE, K. ***Pseudomonas aeruginosa* isolated from marine environments in Tokio bay**, Microbiological Ecology, v. 47, n. 1, p.41-47, 2003.

KING, E. O.; WARD, M. K.; RANEY, D. E. **Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein**, Journal of Laboratory and Clinical Medicine, v. 44, n. 2, p. 301-307, 1954.

KNOUSE, M. C. ; MADEIRA, R. G.; CELANI, V. J. C. ***Pseudomonas aeruginosa* causing a right carotid artery mycotic aneurysm after a dental extraction procedure**. Mayo Clinical Procedures, v. 77, n. 10, p. 1125-1130, 2002.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W.M. **Diagnóstico microbiológico**, 5^a ed., Rio de Janeiro : Medsi, 2001, p. 275.

KROGSTAD, D. J.; MOELLERING Jr., R. C. **Antimicrobial combinations**, In: **Antibiotics laboratory medium**, 4th ed. Lorain, Baltimore: William & Wilkins, Baltimore, 1996. p537-557.

LARPENT, J .P. **Microbiologia prática**, 1^a ed, São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 1975,163p.

LEDGHAM, F. ; SOSCIA, C.; CHAKRABARTY, A.; LAZDUNSKI, A.; FOGLINO, M. **Global regulation in *Pseudomonas aeruginosa* : the regulatory protein AlgR2 (AlgQ) acts as a modulator of quorum sensing**, Research in Microbiology, v. 154, n. 2, p.207-213, 2003.

LEGANI, P.; LEONI, E.; RAPUANO, S.; TURIN, D.; VALENTI, C. **Survival and growth of *Pseudomonas aeruginosa* in natural mineral water: a 5-year study**, International Journal of food Microbiology, v.53, n. 2-3, p. 153-158, 1999.

LEVESQUE, B.; SIMARD, P.; GAUVIN, D.; GINGRAS, S.; DEWAILLY, E.; LETARTE, R. **Comparison of the microbiological quality of water coolers and that of municipal water systems**, Applied Environmental Microbiology, v.60, n.4, p. 1174-1178, 1994.

LIMA, A. F.; **Problemas de engenharia sanitária**, 2^a. ed corrigida, Recife: Universidade federal de Pernambuco, 301p., 1996.

LOIWAL, V. ; KUMAR, A. ; GUPTA, P. ; GOMBER, S.; RAMACHANDRAN, V. G. ***Enterobacter aerogenes* outbreak in a neonatal intensive care unit**, Pediatrics International, v. 41, n. 2, p. 157-161,1999.

LOUREIRO, M. M.; DE MORAES, B. A. ; MENDONÇA, V. L. F. ; QUADRA, M. R. R., PINHEIRO, G. S.; ASENSI, M. D. ***Pseudomonas aeruginosa* : Study of antibiotic resistance and molecular typing in hospital infection cases in a neonatal intensive care unit from Rio de Janeiro city, Brazil**. Memento do Instituto Oswaldo Cruz, v. 97, n. 3, p. 387-394, 2002.

LYCZAK, J. B ; CANNON, C. L.; PIER, G. B. **Lung infections associated with cystic fibrosis**. Clinical Microbiology Reviews, v. 15, n. 2, p.194-222, 2002.

MATOS, B. A. **Avaliação da ocorrência e do transporte de microrganismos no aquífero freático do cemitério de Vila Nova Cachoeirinha, município de São Paulo**, tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001. 47f.

MAVRODI, D. V. ; BONSALE, R. ; DELANEY, S. M. ; SOULE, M. J. ; PHILLIPS G.; THOMASHOW, L. S. **Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PA01**, Journal of bacteriology, v. 183, n. 21, p. 6454-6465, 2001.

McNEIL, A. C. ***Pseudomonas aeruginosa* urosepsis from use of a hot-water spa**, The American Journal of Medicine, letters to the editor, v. 115, n. 7, p. 592-593, 2003.

MENDES, S. V. **Control biológico postcosecha en Uruguay**, Horticultura Internacional, a. 7, n. 26, nov. de 1999.

MENON, P. K.; ESWARAN, S. P. ; PANT, S. S. ; BHARADWAJ, R.; NAGENDRA, A. **Random amplification of polymorphic DNA based typing of *Pseudomonas aeruginosa***. National Medical Journal of India, v.59, n. 1, p. 25-28, 2003.

MICHAEL, G. **Biochemical pathways, an Atlas of biochemistry and molecular biology**, 1st ed, John Wiley & Sons Inc, 1999. 277p.

MICHEL-BRIAND, Y.; BAYSSE, C. **The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*** , Biochimie, n. 84, p. 499-510, 2002.

MIETTINEN, I. T ; VARTIAINEN, T.; MARTIKAINEN, P. **Phosphorus and bacterial growth in drinking water**, Applied and Environmental Microbiology, V. 63, n. 8, p. 3242-3245, 1997.

MIL'KO E. S.; IL'INYKH, I. A. **The effect of lowered concentrations of carbon, nitrogen and phosphorus sources on the growth dynamics of the R, S and M dissociants of *Pseudomonas aeruginosa***, Microbiology, v. 70, n. 5., p.523-526 translated from Mikrobiologiya, v. 70, n. 5, p. 607-610, 2001.

MONTELLI, A. C.; SADATSUNE, T. **Antibioticoterapia para o clínico**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 56 p., 2001.

MORAIS, P. V.; MESQUITA, C; ANDRADE, J. L.; da COSTA, M. S. **Investigation of persistent colonization by *Pseudomonas aeruginosa*-like strains in a spring water blotting plant**, Applied and Environmental Microbiology, v.63, n. 3, p. 851-856, 1997.

MOYES, R **Microbial loads in whirlpool baths**, disponível em:<http://www.pmengineer.com/CDA/ArticleInformation/features/BNP__Features__Item/0,2732,15579,00.html > acesso em 07 set. 2004.

NACHIYAR, C. V.; RAJKUMAR, G. S **Degradation of a tannery and textile dye, Navitan Fast Blue S5R by *Pseudomonas aeruginosa***, W. J. Microbiology and Biotechnology, n. 19, p. 609-614, 2003.

NAKAJIMA, N.; NAKANO, T.; HARADA, F.; TANIGUCHI, H.; YOKOYAMA, I.; HIROSE, J.; DAIKOKO E.; SANO. K **Evaluation of disinfective potential of reactivated free chlorine in pooled tap water by electrolysis**, Journal of Microbiological Methods, n. 57, p. 163-173, 2003.

NASCIMENTO, A. R.; AZEVEDO, T. K. L.; MENDES FILHO, N. E.; ROJAS, M. O. A. I. **Qualidade microbiológica das águas minerais consumidas na cidade de São Luiz-MA**, Revista Higiene Alimentar, v. 14, n. 76, p. 69-72, 2000.

O'MALLEY, Y. Q.; ABDALLA, M. Y. ; McCORMICK, M. L. ; RESZKA, K. J. ; DENNING, G. M.; BRITIGAN, B. E **Subcelluar localization of *Pseudomonas aeruginosa* pyocianin cytotoxicity in human lung epithelial cells**, American Journal of Physiology Lung Cell and Molecular Physiology., v. 284, n. 2, p. L-420-L430, 2003.

ORRETT, F. A. **Antimicrobial susceptibility survey of *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from clinical sources**, Journal of the National Medical Association, v. 96, n. 8, p. 1065-1069, 2004.

PANDYA, M. T. **Microorganisms in re-circulatory water systems and their significance in fouling**, Jai Hind College, University of Mumbai, disponível em:< www.nwqmc.org/2000proceeding/papers/pap_pandya.pdf > acesso em : 28 jun. 2003.

PANZIG, B.; SCHRÖDER, G.; PITTEN, F. A.; GRÜNDLING, M. **A large outbreak of multiresistent *Pseudomonas aeruginosa* strains in north-eastern Germany**, Journal of antimicrobial Chemotherapy, n. 43, p. 415-418, 1999.

PAPAVERO, N. (Org.) **Fundamentos práticos de taxonomia zoológica**.2^a. ed. São Paulo: UNESP,1994. p. 121-167.

PARRET, A. H. A.; DE MOT, R. **Bacteria killing their own kind: novel bacteriocins of *Pseudomonas* and other γ -proteobacteria**, trends in microbiology, v. 10, n. 3,p. 107-112, 2002.

PAVIANI, E. R.; STADNIK, C. B.; HEINEK, I. **Estudo da epidemiologia e perfil de sensibilidade da *Pseudomonas aeruginosa***, Pharmacia Brasileira, v. 15, n. 11-12, p.66-70, 2003.

PELLEGRINO, F. L. P. C. ; TEIXEIRA, L. M. ; CARVALHO, M. G. S. ; NOUÉR, S. A. ; OLIVEIRA, M. P. ; SAMPAIO, J. L. M. ; FREITAS, A. D. ; FERREIRA, A. L. P. ; AMORIM, E. L. T. ; RILEY, L. W.; MOREIRA, B. M. **Occurrence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil.** Journal of Clinical Microbiology, v. 40, n. 7., p.2420-2424, 2002.

PERNAMBUCO (Estado). **Lei nº 11.426 de 17 de janeiro de 1997.** Dispõe sobre a Política Estadual de Recursos Hídricos e o Plano Estadual de Recursos Hídricos, institui o Sistema Integrado de Gerenciamento de Recursos Hídricos e dá outras providências. Regulamentada através do Decreto nº 20.423, de 26 de Março de 1998.

PERNAMBUCO (Estado). **Lei nº 11.427 de 17 de janeiro de 1997.** Dispõe sobre a conservação e a proteção das águas subterrâneas no Estado de Pernambuco e dá outras providências. Regulamentada através do Decreto nº 20.269, de 24 dez 1997.

PIRNAY, J. P. ; DE VOS, D. ; COCHEZ, C. ; BILOCQ, F. ; VANDERKELEN, A. ; ZIZI, M. ; GHYSELS, B.; CORNELIS, P. ***Pseudomonas aeruginosa* displays an epidemic population structure,** Environmental microbiology, v. 4, n. 12, p. 898-911, 2002.

POLLACK, M. ***Pseudomonas aeruginosa*,** Maryland's State Public Health Laboratory, v.7, n.12, p.1-4, 2003.

PORTUGAL, Ministério da Saúde-Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. **Crítérios do CDC para diagnóstico das infecções (tradução dos critérios do CDC, 1988 e 1992 com as atualizações de 1996 e 2002).** Disponível em <http://www.insarj.pt/site/resources/docs/crit%C3%A9rios_cdc2003.doc> acesso em 29 mai 2004.

PRESCOTT, L. M. ; HARLEY, J. P. ; KLEIN, D. A. **Microbiology,** 4th ed, United States: Mc Graw Hill, 1999, 962p.

RAMALHO, R.; CUNHA, J.; TEIXEIRA, P.; GIBBS, P. A. **Modified *Pseudomonas* agar: new differential medium for the detection/enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* in mineral water,** Journal of Microbial Methods, v. 49, n. 1, p. 69-74, 2002.

REBOLÇAS, A. C. **Desenvolvimento de meio ambiente: Estratégias para se beber água limpa,** In:____ O município no século XXI: Cenários e perspectivas, CEPAM, São Paulo, 1998, p. 199-215.

RENDERS, N. ; RÖMLING, U. ; VERBRUGH, H.; ALEX VAN BELKUM. **Comparative typing of *Pseudomonas aeruginosa* by Random Amplification of Polymorphic DNA or Pulsed-Field Gel Electrophoresis of DNA macrorestriction fragments**, Journal of clinical microbiology, v. 34, n.12, p. 3190-3195, 1996.

REYES, E. A. P. ; BALE, M. J. ; CANNON, W. H.; MATSEN, J. M. **Identification of *Pseudomonas aeruginosa* by pyocinin production on Tech Ágar**, Journal of Clinical Microbiology, v. 13, n. 3, p. 456-458, 1981.

RIBEIRO, C. H. A.; KJERVFE, B. **Anthropogenic influence on the water quality in Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil**, Regional Environmental Changes, v. 3, p. 13-19, 2002.

ROMLING, U. ; WINGENDER, J. ; MULLER, H.; TUMMLER, B. **A major *Pseudomonas aeruginosa* clone common to patients and aquatic habitats**. Applied Environmental Microbiology, v. 60, n. 6, p. 1734-1738, 1994.

SANCHEZ, P. S. **Atualização em técnicas para o controle microbiológico de águas minerais**. In: SEMINÁRIO, 10 e 11 dez. 1999, Recife. **Apostila do participante**. São Paulo: Univ. Presbiteriana Mackenzie, 125p., 1999.

SANCHEZ, P. S. ; RUOCCO Jr., J. **Controle de qualidade de águas minerais naturais: novos conceitos e tendências recentes da legislação internacional**. In: SEMINÁRIO, 16 abr 2004, Recife. **Apostila do participante**. ABINAM- sucursal nordeste, 95 p., 2004.

SHORTER BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY, 9th ed., Maryland: Williams & Wilkins, p. 71, 93-94, 158, 168, 178-180, 209 e 228, 1994.

SHRIVASTAVA, R. ; UPRETI, R. K. ; JAIN, S. R. ; PRASAD, K. N. ; SETH, P. K.; CHATURVEDI, U. C. **Suboptimal Chlorine treatment of drinking water leads to selection of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa***, Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 58, n. 2, p. 277-283, 2004.

SIBILLEA, I. **Biological stability in drinking water distribution systems: a review**, L'Année Biologique , v. 37, n. 3, 1998, p. 117-161.

SILVA, E. R. **O curso da água na história: simbologia, moralidade e a gestão de recursos hídricos**, tese de doutorado, Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 1998, 201fs.

SMITH, R. S.; IGLEWSKI, B. H. ***P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence**. Current Opinion in Microbiology, v. 6,n. 1, p.56-60, 2003.

SPEIJER, H. ; SVELKOU, P. H. M. ; BONTEN, M. J. ; STOBBERINGH, E. E.; TJHIE, J. H. T. **Application of different genotyping methods for *Pseudomonas aeruginosa* in a setting of endemicity in an Intensive Care Unit**. Journal of Clinical Microbiology , v. 37, n. 11, p. 3654-3661, 1999.

STANDING COMMITTEE OF ANALYSTS. **The microbiology of drinking water: part 1- Drinking water, water quality and public health methods for the examination of water and associated materials**, 2002, 47p.

STRUELENS, M. J. **Molecular epidemiologic typing systems of bacterial pathogens: current issues and perspectives**, Memento do Instituto Oswaldo Cruz, v. 93, n. 5, p. 581-585, 1998.

TAIT K.; SUTHERLAND, I. W. **Antagonistic interactions amongst bacteriocin-producing enteric bacteria in dual species biofilms**, Journal of Applied Microbiology, v. 93, n. 2, p. 345-352, 2002.

TAMAGNINI, L. M. ; GONZALES, R. D. **Bacteriological stability and growth kinetics of *Pseudomonas aeruginosa* in bottled water**, Journal of Applied Microbiology, v. 83, n.1, 1997. p.91-94.

TANCREDI, R. C. P. ; CERQUEIRA ,E. ; MARINS, B. R. **Águas minerais consumidas na cidade do Rio de Janeiro**, Superintendência de controle de zoonoses, vigilância e fiscalização sanitária -Boletim de divulgação técnica e científica, ano 4, n.13 , 14p.,novembro de 2002.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**,3^a. ed.,São Paulo: Atheneu, 1216p., 2001.

TEITZEL, G. M.; PARSEK, M. R. **Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa***, Applied and Environmental Microbiology, v. 69, n. 4, p. 2313-2320, 2003.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V., THE MOLECULAR TYPING WORKING GROUP OF THE SOCIETY FOR HEALTH CARE EPIDEMIOLOGY OF AMERICA **How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists**, Infection control and hospital epidemiology, v. 18, n. 6, p. 426-439, 1997.

TIMMIS, K. N. ***P. Putida*: a cosmopolitan opportunistic par excellence**. Environmental Microbiology, v. 4, n. 12, p. 779-781, 2002.

THE MERK INDEX, 11th. ed., New Jersey: Rahway, 1989, p. 1264.

THOMAS, B. (Org.) **O livro de ouro da mitologia, histórias de deuses e heróis**, 13^a. ed., Rio de Janeiro: 418p., 2001.

TODAR, K. ***Pseudomonas aeruginosa***. Disponível em <<http://www.bact.wisc.edu/bact330/lecturepseudomonas> > acesso em 10 mar. 2004.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**, 6^a. ed., Porto Alegre: Artmed, 827p., 2000.

TREDGET, E. E. ; SHANKOWSKY, H. A. ; RENNIE, R. ; BURRELL, R. E.; LOGSETTY S. ***Pseudomonas* infections in thermally injured patient**, Burns, v. 30, n. 1, p. 3-26, 2004.

TSORAEVA, A. ; MARTÍNEZ, C. R. **Comparison of two culture media for selective isolation and membrane filter enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* in water**, Revista latinoamerica de microbiología, n. 42, p. 149-154, 2000.

TYLER, K. D.; WANG, G.; TYLER, S. D.; JOHNSON, W. M. **Factors affecting reliability and reproducibility of amplification-based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens**, Journal of Clinical Microbiology, v. 35, n. 2, p. 339-346, 1997.

UNITED NATIONS **Resolution A/RES/58/217. International Decade for action, "Water for life", 2005-2015**, disponível em <http://www.unesco.org/water/water_celebrations/decades/water_for_life.pdf > acesso em 22 mar 2005.

UNESCO. United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization. **International Hydrological Programme-VI (2002-2007)**. Disponível em <http://www.unesco.org/water/ihp/ihp_six.shtml> acesso em 24 mar 2004.

UNESCO. United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization. **Water Interactions: Systems at risk and social challenges issues and strategies, 6th phase of the International Hydrological Programme 2002-2007**. 2002, 37p.

UNESCO. United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization. **World water day**. Disponível em <http://www.unesco.org/water_celebrations> acesso em 24 mar 2004.

UNITED NATIONS STATISTICS DIVISION Disponível em <<http://www.unstats.un.org>> acesso em 27 abr 2005.

VAN DELDEN, C.; IGLEWSKI, B. H. **Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections**. Emerging Infections Diseases, v. 4, n. 4, p. 551-560, 1998.

VOLK, C. J.; LeCHEVALLIER, M. W. **Impacts of reduction of nutrients levels on bacterial water quality in distribution systems**, Applied and Environmental Microbiology, v. 65, n. 11, p. 4957-4966, 1999.

WATSON, S.; LAWRENCE, J. **Overview - Drinking water quality and sustainability**, Water Quality Research Journal of Canada, v. 38, n. 1, p. 3-13, 2003.

WHEATER, D. W. F. ; MARA, D. D. ; JAWAD, L. ; ORANGUI, J. ***Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* in sewage and fresh water**. Water research, v. 14, n. 7, 1980, p. 713-721.

WHITE, S. **A nova astrologia**, 2^aed., São Paulo: Pensamento, 436p., 1986.

WHO. World Health Organization. **Heterotrophic plate count measurement in drinking water safety management**, In: EXPERT MEETING, 24-25 April 2002, Geneve. **Report**. WHO, 13p., 2002.

WHO. World Health Organization. **Microbial aspects**. In: Guidelines for drinking water, Geneve: WHO, 2003, p. 130-188.

WOLTER, J. M.; BOWLER, D.; McCORMACK, J. G. **Are antipseudomonal antibiotics really beneficial in acute respiratory exacerbations of cystic fibrosis?**, Australian and New Zealand Journal of Medicine, v. 29, n.1, 1999, p.15-21.

WRENN, B. A. **Biodegradation of aromatic-hydrocarbons**, disponível em < <http://www.ence.umd.edu/~eseagren/bioAHC97.htm>>, acesso em 25 jan 2004.

ZAGO, V. C. P.; FONSECA, M. M. C.; DE-POLLI, H.; RUMJANEK, N. G. **Levantamento e caracterização morfológica de isolados de *Pseudomonas ssp.* fluorescentes presentes em cultivos do SIPA-Sistema Integrado de Produção Agroecológica**, seropédica, Rio de Janeiro: Embrapa Agrobiológica, n. 143, 35 p., 2001.

ZDRAGAS, A.; ZALIDIS, G. C. ; TAKAVAKOGLU, V.; KATSAVOUNI, S.; ANASTASIADIS, E. T.; ESKRIDGE, K. **The effect of environmental conditions on the ability of a constructed wetland to disinfect municipal wastewaters**, Environmental management, v. 29, n. 4, p. 510-515, 2002.

ANEXO A

Índice do NMP/100mL com 95% de confiança e limites para varias combinações dos tubos positivos quando 5 tubos são usados por diluição (10mL, 1mL e 0,1mL)
(Tabela de Hoskins)

Combinações de tubos positivos			NMP/100mL	Limite de confiança	
				Mais alto	Mais baixo
0	0	0	< 2	-	-
0	0	1	2	1	10
0	1	0	2	1	10
0	2	0	4	1	13
1	0	0	2	1	11
1	0	1	4	1	15
1	1	0	4	1	15
1	1	1	6	2	18
1	2	0	6	2	18
2	0	0	4	1	17
2	0	1	7	2	20
2	1	0	7	2	21
2	1	1	9	3	24
2	2	0	9	3	25
2	3	0	12	5	29
3	0	0	8	3	24
3	0	1	11	4	29
3	1	0	11	4	29
3	1	1	14	6	35
3	2	0	14	6	35
3	2	1	17	7	40
4	0	0	13	9	38
4	0	1	17	7	45
4	1	0	17	7	46
4	1	1	21	9	55
4	1	2	26	12	63
4	2	0	22	9	56
4	2	1	26	12	65
4	3	0	27	12	67
4	3	1	33	15	77
4	4	0	34	16	80
5	0	0	23	9	86
5	0	1	30	10	110
5	0	2	40	20	140
5	1	0	30	10	120
5	1	1	50	20	150
5	1	2	60	30	180
5	2	0	50	20	170
5	2	1	70	30	210
5	2	2	90	40	250
5	3	0	80	30	250
5	3	1	110	40	300
5	3	2	140	60	360
5	3	3	170	80	410
5	4	0	130	50	390
5	4	1	170	70	480
5	4	2	220	100	580
5	4	3	280	120	690
5	4	4	350	160	820
5	5	0	240	100	940
5	5	1	300	100	1300
5	5	2	500	200	2000
5	5	3	900	300	2900
5	5	4	1600	600	5300
5	5	5	> 1600	-	-

Fonte: APHA (1998)

ANEXO B

Definições oficiais

Água potável - Água para consumo humano cujos parâmetros microbiológicos, físicos, químicos e radioativos atendam ao padrão de potabilidade e que não ofereça riscos à saúde (BRASIL, 2004).

Água bruta – Toda água que não sofreu tratamento, encontrada na superfície (rios, lagos, reservatórios) ou no subsolo (poços profundos) (APHA, 1998).

Água para consumo humano – Toda e qualquer água própria para uso doméstico, inclusive higiene pessoal. Quanto a origem, a água é classificada como canalizada (quando sofre captação, tratamento e distribuição) e não canalizada que enquadra fontes, poços, em garrafas e na forma de gelo (WHO, 2002).

Água envasada – Toda água potável regulada por alguma legislação que se encontra acondicionada em recipientes de metal, vidro ou plástico até o volume de 80 litros. (WHO, 2003).

Água mineral natural - Água obtida diretamente de fontes naturais ou artificialmente captadas, de origem subterrânea, caracterizada pelo conteúdo definido e constante de sais minerais (composição iônica) e pela presença de oligoelementos e outros constituintes (BRASIL, 2000).

Água natural - Água obtida diretamente de fontes naturais ou artificialmente captadas, de origem subterrânea, caracterizada pelo conteúdo definido e constante de sais minerais (composição iônica), e pela presença de oligoelementos e outros constituintes, mas em níveis inferiores aos mínimos estabelecidos para água mineral natural (BRASIL, 2000).

Água residuária – Água já utilizada e que foi despejada em sistemas de esgoto. Sua composição é de materiais e bactérias em solução ou suspensão (United Nations Statistic Division).

Controle da qualidade da água para consumo humano - Conjunto de atividades exercidas de forma contínua pelos responsáveis pela operação de sistema ou solução alternativa de abastecimento de água, destinadas a verificar se a água fornecida à população é potável, assegurando a manutenção desta condição (BRASIL, 2004).

Coliformes totais (bactérias do grupo coliforme) - Bacilos gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, oxidase-negativos, capazes de desenvolver na presença de sais biliares ou agentes tensoativos que fermentam a lactose com produção de ácido, gás e aldeído a $35,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ em 24-48 horas, e que podem apresentar atividade da enzima β -galactosidase (BRASIL, 2004).

Coliformes termotolerantes - Subgrupo das bactérias do grupo coliforme que fermentam a lactose a $44,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$ em 24 horas tendo como principal representante a *Escherichia coli*, de origem exclusivamente fecal (BRASIL, 2004).

Escherichia Coli - bactéria do grupo coliforme que fermenta a lactose e manitol, com produção de ácido e gás a $44,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$ em 24 horas, produz indol a partir do triptofano, oxidase negativa, não hidroliza a uréia e apresenta atividade das enzimas Beta-galactosidase e Beta-glucoronidase, sendo considerada o mais específico indicador de contaminação fecal recente e de eventual presença de organismos patogênicos (BRASIL, 2004).

Pseudomonas aeruginosa – Microrganismos oxidase positivos, capazes de crescer em meio seletivo contendo cetrimida e produzir piocianina. São igualmente capazes de produzir fluorescência sob luz ultravioleta de comprimento de onda $360 \pm 20\text{nm}$ (HPA, 2003).