



FORMADORES DE BIOPELÍCULAS DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA EN AGUA POTABLE

ARTÍCULO ORIGINAL

CAVALCANTE, Luzia Angélica Alves¹, ANDRADE, Jéssica Martins de², SILVA, Maria Goretti Varejão da³, MEDEIROS, Anna Karolyne de Araujo⁴, CORDEIRO, Geovania de Souza⁵, SILVA, Daniel Dias da⁶, SOARES, Karla Danielle Almeida⁷, MOURA, Vilton Edson Figueiroa de⁸, SOARES, Anísio Francisco⁹, MEDEIROS, Elizabeth Sampaio de¹⁰

CAVALCANTE, Luzia Angélica Alves. *et al.* **Formadores de biopelículas de Pseudomonas aeruginosa en agua potable.** Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento. Año 08, Ed. 09, Vol. 01, pp. 17-29. Septiembre de 2023. ISSN: 2448-0959, Enlace de acceso: <https://www.nucleodoconhecimento.com.br/veterinaria-es/aeruginosa-en-agua-potable>, DOI: 10.32749/nucleodoconhecimento.com.br/veterinaria-es/aeruginosa-en-agua-potable

RESUMEN

En la actualidad, ha habido un aumento en la demanda de agua embotellada debido a la insatisfacción de la población con la calidad del agua proporcionada por las agencias públicas. El presente estudio buscó evaluar la presencia de *P. aeruginosa* formadora de biopelículas en agua potable embotellada. Se seleccionaron treinta y cinco muestras típicas de agua embotellada para identificar la presencia de *P. aeruginosa* y su capacidad para formar biopelículas bacterianas. La metodología utilizada para verificar la presencia de *P. aeruginosa* siguió la técnica de tubos múltiples, y la evaluación de la capacidad de formación de biopelículas siguió la técnica de microdilución, con la lectura óptica realizada por espectrofotometría a 620 nm. Se detectó la presencia de *P. aeruginosa* en el 26% de las muestras analizadas, lo que representa nueve de las 35 muestras probadas. De estas, el 55% tenía la capacidad de formar biopelículas. El presente estudio muestra que la presencia de *P. aeruginosa*, capaz de formar biopelículas, es un factor de riesgo para la salud pública debido a la amplia comercialización de agua embotellada.

Palabras clave: Adhesión bacteriana, Técnicas microbiológicas, Industria del envasado.



INTRODUCCIÓN

En los últimos años, Brasil ha experimentado un constante aumento en la demanda de agua embotellada debido a la falta de capacidad de los sistemas de suministro público para proporcionar agua de calidad y en cantidad adecuada (BRANDÃO *et al.*, 2012). Aunque este producto asocia a su imagen una condición de pureza y seguridad sanitaria, la aparición de brotes gastrointestinales debido al consumo de estas aguas ha dirigido la atención de los investigadores a su estudio, especialmente en lo que respecta a su estándar microbiológico (COSTA *et al.*, 2015; WIELAND *et al.*, 2018).

Novello *et al.*, (2020) afirman que el crecimiento microbiano rápido después del empaque puede estar relacionado con la oxigenación del agua, el aumento de temperatura durante el almacenamiento y los nutrientes presentes en la superficie del empaque. Se ha observado que este producto no es necesariamente seguro y puede representar riesgos para la salud de los consumidores, como el agravamiento por patógenos oportunistas como *Pseudomonas aeruginosa*. Esta bacteria, debido a su alta resistencia a la terapia antimicrobiana, está asociada con infecciones crónicas persistentes, afectando principalmente a individuos inmunocomprometidos (REIS *et al.*, 2014; NOVELLO *et al.*, 2020).

La contaminación de estas aguas con *P. aeruginosa* durante el proceso de llenado puede deberse a la capacidad de esta bacteria para formar biopelículas en los envases retornables y equipos de la planta, y esta propiedad se considera uno de los principales factores de virulencia atribuidos a *P. aeruginosa* (PEDROSA *et al.*, 2014).

La amplia distribución y consumo de estas aguas entre la población hacen relevante el monitoreo de este producto. *P. aeruginosa* es uno de los criterios microbiológicos definidos en la legislación actual para el agua embotellada, pero no se exige investigar la capacidad de este microorganismo para formar biopelículas. Esta investigación tendría un impacto significativo en el agua embotellada en particular, ya que el proceso de embotellado propicia el desarrollo de estas estructuras biológicas. Por lo tanto, reconociendo la necesidad de esta investigación, el presente estudio tuvo como



objetivo evaluar la presencia de *P. aeruginosa* formadora de biopelículas en agua potable embotellada.

METODOLOGÍA

LAS MUESTRAS

Entre los meses de noviembre de 2019 y septiembre de 2020, se separaron y analizaron 35 muestras de agua embotellada no carbonatada comercializada en botellas retornables de 20 litros de 21 marcas diferentes (codificadas con las letras "A" a "U"). Cada muestra representativa estaba compuesta por 5 unidades del mismo lote/fecha de envasado, con el fin de cumplir con los parámetros de muestreo de la RDC ANVISA n.º 275 del 22.09.2005 (Brasil, 2005), aún vigente durante el período de análisis de este estudio, para un total de 175 botellas. Se analizaron nueve muestras de la marca "D", tres de las marcas "H e I", dos de las marcas "B y C" y una de las marcas "A, E, F, G, J, K, L, M, N, O, P, Q, R, S, T y U". Las muestras provenían del "Programa de Monitoreo de Agua Embotellada" de la Agência Pernambucana de Vigilância Sanitária (APEVISA) y del Laboratório Central de Pernambuco (LACEN-PE). Las muestras fueron seleccionadas según la cantidad recibida del "Programa de Monitoreo de Agua Embotellada" de APEVISA y LACEN.

La investigación se desarrolló en dos fases: Investigación de *P. aeruginosa* en muestras de agua embotellada en el Laboratório de Microbiologia de Água e Alimentos (Coordinación de Vigilancia Laboratorial en Bromatología-LACEN/PE); Análisis de la formación de biopelículas por *P. aeruginosa* aislada de muestras de agua embotellada en el Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (Departamento de Medicina Veterinária/Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

DETERMINACIÓN DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA

La prueba para *P. aeruginosa* en muestras de agua se realizó utilizando la técnica de tubos múltiples recomendada por la *American Public Health Association* (APHA) (APHA, 2017), que incluye una fase presuntiva y confirmatoria. Primero, se preparó la



muestra homogeneizándola agitando el matraz 25 veces en un ángulo de 45°. En la fase presuntiva, se utilizó caldo de asparagina estéril en concentraciones simples y dobles con tres series de dilución (base 10), cada serie compuesta por cinco tubos. Después de la incubación a 36°C durante 48 horas, un pigmento fluorescente verde en el tubo de muestra examinado bajo luz ultravioleta de onda larga (365 nm) en un cuarto oscuro se consideró una prueba presuntiva positiva. La fase confirmatoria se realizó inoculando el cultivo de los tubos positivos de la primera fase en caldo de acetamida estéril. La prueba se basa en la capacidad de las bacterias para producir amoníaco y ácido acético a partir de la acetamida y el cambio de pH del medio, con un resultado positivo para *P. aeruginosa* indicado por un cambio de color de naranja a púrpura (presencia de pH alcalino) en un plazo de 4 a 7 días de incubación a 36°C.

1. Se utilizaron como controles positivos y negativos *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *Escherichia coli* ATCC 25922, respectivamente, en ambas fases. Se calculó el número de tubos positivos y se analizó utilizando la tabla de número más probable (NMP) con cinco tubos por dilución (10 mL, 1,0 mL y 0,1 mL) (APHA, 2017).

EL AISLAMIENTO DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Los tubos de caldo de acetamida que mostraron un color púrpura fueron sembrados en agar cetrimida utilizando la técnica de agotamiento y se incubaron a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 horas. Se seleccionó una colonia aislada productora de pigmento verde de cada muestra. Las colonias se sembraron en agar nutriente para ser recolectadas para el análisis de la capacidad de producción de biopelículas.

ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE BIOPELÍCULAS

Para evaluar la producción de biopelículas, se utilizó la metodología de Andrade (2018) con adaptaciones, donde las colonias aisladas de *P. aeruginosa* se inocularon en tubos que contenían 3 mL de caldo BHI hasta una turbidez de McFarland de 0,5 y se incubaron en un horno bacteriológico a 37°C durante 24 horas. Después de este paso, se inoculó 100 µL de la solución con una micropipeta automática en placas de



microdilución de 96 pocillos y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Después de este tiempo, el contenido de cada pocillo se aspiró suavemente con una micropipeta automática y se lavó tres veces con agua destilada estéril. Las placas se dejaron secar a temperatura ambiente y las células adheridas se tiñeron con 200 µL de violeta de genciana al 0,25%. Después de 5 minutos de aplicación del tinte, se lavaron los pocillos y se dejaron secar a temperatura ambiente como se describió anteriormente. Luego se añadieron 200 µL de alcohol:acetona 80:20. Se utilizó caldo BHI como control negativo y *P. aeruginosa* ATCC® 27853 como control positivo en triplicado. La densidad óptica (OD) de los pocillos se leyó mediante espectrofotometría a 620 nm. Para clasificar los aislados en cuanto a la producción de biopelículas, se midió la densidad óptica media (OD) del control negativo (ODNC) y se comparó con la densidad óptica media de los aislados (ODIS), y se clasificaron como: negativos (ODIS < ODNC); débiles (ODNC < ODIS < 2.ODNC); moderados (2.ODNC < ODIS < 4.ODNC); fuertes (4.ODNC < ODIS) formadores de biopelículas.

ANÁLISIS DE DATOS

Se utilizó un análisis estadístico descriptivo para determinar las frecuencias absolutas y relativas de especímenes positivos en relación con el número total de especímenes recolectados (SAMPAIO, 1998).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

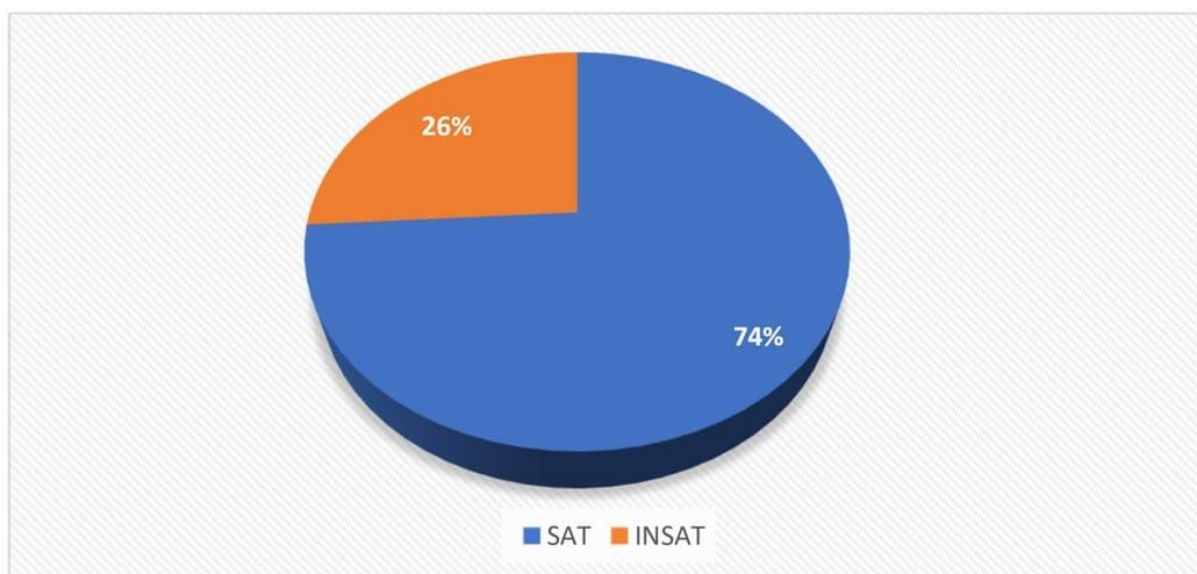
De las 35 muestras representativas de agua embotellada analizadas, 24 muestras (69%) fueron tipificadas como agua mineral natural (AMN) y 11 muestras (31%) como agua con sales agregadas (ASA).

Tabla 1. Mesorregiones de origen de las muestras de Pernambuco con sus respectivas cantidades

Mesorregiones	Cantidad
MRR	29
Agreste	2
Sertão	2
Zona da Mata	1

Fuente: Datos obtenidos de la investigación realizada por los autores, 2023.

La Tabla 1 muestra las mesorregiones de origen de las muestras procesadas en Pernambuco junto con su cantidad correspondiente. Se puede observar que la mayoría de las muestras provienen de la Región Metropolitana de Recife (RMR). La predominancia del muestreo en esta mesorregión puede estar relacionada con la concentración de plantas embotelladoras. Además, debido a su proximidad geográfica, las muestras de estos embotelladores llegan a los consumidores de toda la RMR, la mesorregión más poblada de Pernambuco (IBGE, 2020), un factor relevante para los fines de monitoreo de la vigilancia sanitaria.

Figura 1. Distribución porcentual de las muestras satisfactorias (SAT) e insatisfactorias (INSAT) con respecto a *P. aeruginosa*, según la RDC n.º 275/05 - ANVISA/MS

Fuente: Datos obtenidos de la investigación realizada por los autores, 2023.



La Figura 1 muestra que el 26% (9/35) de las muestras analizadas fueron insatisfactorias para *P. aeruginosa*, según los criterios de aprobación/rechazo definidos por la RDC ANVISA nº 275/2005 (BRASIL, 2005). Esta resolución especifica que el lote se rechaza si contiene un recuento de esta bacteria en alguna de las unidades de la muestra representativa, mayor a 2.2 NMP/100 mL o cuando el recuento de *P. aeruginosa* en más de una unidad de la muestra representativa es superior a 1.1 NMP/100 mL.

Considerando las muestras insatisfactorias, la Tabla 2 presenta los niveles de *P. aeruginosa* (NMP/100 mL) por unidad de muestra. Cabe destacar que todas las muestras en las que se verificó la presencia de este microorganismo tenían una cantidad suficiente para rechazar las muestras según el estándar microbiológico para el agua embotellada. También se mostró que, entre las muestras insatisfactorias para el parámetro de *P. aeruginosa*, cinco se clasificaron como agua mineral natural y cuatro como agua con sales agregadas. La presencia de *P. aeruginosa* en agua con sales agregadas en cantidades que la hacen no apta para el consumo indica la importancia de incluir otros parámetros microbiológicos para este tipo de agua embotellada, además de los definidos en el período de investigación por la RDC ANVISA Nº182/2017 (BRASIL, 2017). Sin embargo, Pernambuco está en una posición de referencia en relación con esta resolución nacional, ya que tiene su propia legislación para el agua con sales agregadas, la Ley Estatal Nº 15.859/2016 (PERNAMBUCO, 2016), que adopta como estándar microbiológico para este producto el mismo definido en la RDC ANVISA nº 275/2005 (BRASIL, 2005).

Tabla 2. Cantidades de *P. aeruginosa* detectadas en muestras de agua embotellada mediante la técnica del número más probable (NMP/100 mL), por unidad analítica

Muestra (marca/número)	Unidad analítica	Cuantitativo (NMP/ 100mL)
B2	1	41
	2	79
	3	< 1,8
	4	< 1,8
	5	< 1,8



D5	1	22
	2	< 1,8
	3	< 1,8
	4	920
	5	26
D9	1	< 1,8
	2	< 1,8
	3	21
	4	< 1,8
	5	< 1,8
J14	1	2
	2	< 1,8
	3	< 1,8
	4	4,5
	5	< 1,8
D16	1	130
	2	350
	3	350
	4	220
	5	920
L17	1	< 1,8
	2	6,1
	3	< 1,8
	4	4,5
	5	< 1,8
D20	1	34
	2	1600
	3	34
	4	21
	5	< 1,8
I23	1	< 1,8
	2	2
	3	< 1,8



	4	2
	5	< 1,8
O27	1	< 1,8
	2	2
	3	2
	4	< 1,8
	5	< 1,8

Fuente: Datos obtenidos de la investigación realizada por los autores, 2023.

Corroborando los hallazgos de este estudio, un estudio realizado por Brandão *et al.* (2012), con 31 muestras de agua embotellada en botellas retornables de 20 litros, encontró que 17 muestras tenían recuentos por encima del límite establecido para *P. aeruginosa*. De manera similar, Coelho *et al.* (2010), al evaluar la calidad microbiológica de las aguas minerales consumidas en la región metropolitana de Recife, encontraron la presencia de *Pseudomonas spp.* en 24 muestras (20.00%), mientras que *P. aeruginosa* fue positiva en 22 muestras (18.33%), encontrada en todas las diez marcas analizadas.

En otros países, estudios también han verificado la positividad de este microorganismo en agua embotellada. En un extenso estudio (2,500 muestras) en Bulgaria, Georgieva y Dimitrova (2016) encontraron este agente en 274 muestras de agua embotellada analizadas, lo que llevó a los autores a cuestionar la calidad de este producto para grupos con inmunidad comprometida. En un estudio de Herath (2014), 36 marcas de agua embotellada de toda la isla de Sri Lanka fueron sometidas a la determinación de *P. aeruginosa*, y se encontró que 18 (50%) marcas mostraron la presencia de este microorganismo, y se informa que estos hallazgos se deben a un tratamiento inadecuado con luz ultravioleta, filtros obstruidos y contaminación cruzada, o al uso de agua de una fuente inadecuada para embotellar.

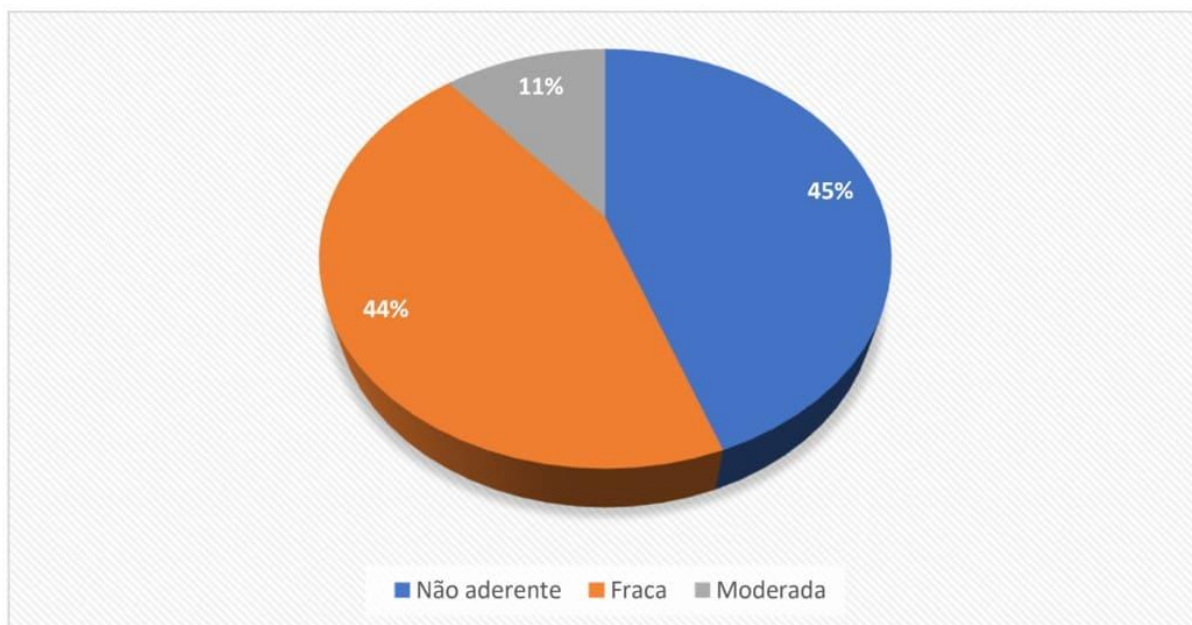
Kouchesfahani *et al.*, (2015), mientras investigaban *P. aeruginosa* en agua embotellada vendida en mercados iraníes, detectaron este microorganismo en el 36.7% de todas las muestras probadas. Estos autores señalan que, contrariamente a la opinión pública, el agua embotellada no está libre de microorganismos y sugieren

que las autoridades deberían proporcionar un plan de monitoreo y control más riguroso.

A la luz de los resultados obtenidos en este estudio, hay congruencia con los datos ya publicados por los autores mencionados con respecto a la presencia de este microorganismo en cantidades significativas, y esta ocurrencia es predominante cuando el envasado se realiza en envases reutilizables, así como acuerdo con respecto a los probables factores que llevan a esta contaminación: fallas en las buenas prácticas de fabricación (BPF) durante el llenado y almacenamiento, así como el lavado y desinfección inadecuados de las botellas reutilizables, lo que facilita la formación de biopelículas por parte de *P. aeruginosa*.

La producción de biopelículas es una característica de estas bacterias y en esta investigación también se intentó evaluar los aislados encontrados en términos de su capacidad para formar biopelículas (CFB) (Figura 2).

Figura 2: Distribución porcentual de muestras positivas para *P. aeruginosa* según su capacidad de formación de biopelículas (CFB)



Fuente: Datos obtenidos de la investigación realizada por los autores, 2023.



Los resultados recopilados muestran que, de los aislados de *P. aeruginosa* probados para la producción de biopelículas, el 55% se caracterizó como formadores de biopelículas y su CFB se calificó entre débil y moderado. Algunos autores también presentaron porcentajes significativos de formación de biopelículas por parte de *P. aeruginosa* en agua embotellada en sus investigaciones. Pedrosa *et al.* (2014) encontraron que, de 31 aislados de *P. aeruginosa* encontrados en muestras de agua mineral natural, el 48% mostraron CFB moderado a fuerte y el 51% estaban entre no adherentes y débilmente adherentes.

Bernardo (2009) describe la clasificación de aislados de *P. aeruginosa* de muestras de agua mineral con respecto a la producción de biopelículas, donde el 52.9% de las cepas se clasificaron como fuertemente adherentes, el 41.2% de las cepas aisladas como moderadamente adherentes y el 5.9% como débilmente adherentes.

Cuando Rojas *et al.* (2014) evaluaron CFB en cepas de *P. aeruginosa* aisladas de muestras de agua embotellada, encontraron que tenían una capacidad moderada para formar biopelículas. La importancia de estudiar las biopelículas en estos aislados es evidente, considerando que provienen de un producto cuyo envasado tiende a colaborar con la instalación de estas estructuras biológicas, especialmente cuando se trata de envases reutilizables, que requieren un estricto estándar higiénico altamente susceptible a fallos. Analizando los resultados de este estudio y los mencionados anteriormente sobre la presencia de esta bacteria en agua embotellada y su capacidad para formar biopelículas, podemos ver la relevancia de las acciones de vigilancia de laboratorio en este producto, así como la existencia de instrumentos legales que las respalden. Las regulaciones actuales establecen límites para *P. aeruginosa* en agua embotellada, pero no incluyen pruebas de CFB de los aislados encontrados. Esta inclusión permitiría evaluar el grado de patogenicidad de la *P. aeruginosa* encontrada, lo que podría ser un factor agravante en la violación de la salud.

Teniendo en cuenta que *Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno oportunista y que tiene mucha resistencia a los grupos antimicrobianos (Pires *et al.*, 2009), su ocurrencia representa un verdadero riesgo para la salud pública.



CONSIDERACIONES

La presencia de *P. aeruginosa* en agua embotellada consumida en el estado de Pernambuco, y las cepas encontradas caracterizadas como formadoras de biopelículas, son un factor de virulencia de gran importancia para la salud pública. Dada la implicación clínica de esta bacteria, el consumo de agua embotellada contaminada con *P. aeruginosa* pone en peligro la salud de los consumidores, especialmente aquellos con sistemas inmunológicos comprometidos. La amplia comercialización de estas aguas observada en los últimos años en el estado de Pernambuco, sumada al potencial patógeno de esta bacteria, hace que sean preponderantes las acciones de control continuo sobre este producto, con el objetivo de un trabajo de vigilancia sanitaria más eficiente en las industrias embotelladoras, que busque erradicar este microorganismo y la consiguiente formación de su biopelícula durante el proceso de embotellado.

REFERENCIAS

APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 23 ed., Washington, D.C.: APHA, 2017.

ANDRADE, J. M. **Listeria monocytogenes formadoras de biofilme em presuntos fatiados e sua sensibilidade aos sanitizantes**, 2018. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Animal) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2018.

BERNARDO, S. P. C. **Avaliação da suscetibilidade a antimicrobianos e formação de biofilmes em Pseudomonas aeruginosa isoladas de água mineral**, 2009. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2009.

BRANDÃO, M. L. L. *et al.* Comparação das técnicas do número mais provável (NMP) e de filtração em membrana na avaliação da qualidade microbiológica de água mineral natural. **Revista do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo**, v. 71, n. 1, p. 32-39, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Resolução - RDC nº 182, de 16 de outubro de 2017**. Dispõe sobre as boas práticas para industrialização, distribuição e comercialização de água adicionada de sais. Diário Oficial [da] União, Brasília, DF, 16 out. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Resolução - RDC nº 275, de 22 de setembro de 2005**. Aprova o regulamento técnico de características microbiológicas para água mineral natural e água natural. Diário Oficial [da] União, Brasília, DF, 22 set. 2005.



COELHO, M. I. S. *et al.* Avaliação da qualidade microbiológica de águas minerais consumidas na região metropolitana de Recife, Estado de Pernambuco. **Acta Scientiarum Health Sciences**, v. 32, n. 1, p. 1-8, 2010.

COSTA, D. *et al.* Nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* associated with a drinking water fountain. **Journal of Hospital Infection**, v. 91, n. 3, p. 271-274, 2015.

GEORGIEVA, V.; DIMITROVA, Y. Study of the Microbiological Quality of Bulgarian Bottled Water in Terms of Its Contamination with *Pseudomonas aeruginosa*. **Central European journal of public health**, v. 24, n. 4, p. 326-330, 2016.

HERATH, A. T. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* in bottled drinking water in Sri Lanka: a potential health hazard. **Water Supply**, v. 14, n. 6, p. 1045-1050, 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Estimativas da população residente para os municípios e para as unidades da federação brasileiros com data de referência em 1º de julho de 2020**. Rio de Janeiro: IBGE, 2020. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/bibliotecacatalogo?view=detalhes&id=2101747>. Acesso em: 02 maio 2023.

KOUCHESFAHANI, M. M. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* and Heterotrophic Bacteria Count in Bottled Waters in Iran. **Iranian Journal of Public Health**, v. 44, n. 11, p. 1514-1519, 2015.

NOVELLO, J. *et al.* Inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* in mineral water by DP1 bacteriophage immobilized on ethylene-vinyl acetate copolymer used as seal caps of plastic bottles. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 137, n. 35, p. 1-8, 2020.

PEDROSA, A. P. *et al.* Pesquisa de fatores de virulência em *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de águas minerais naturais. **Revista Ambiente & Água**, v. 9, n. 2, p. 313-324, 2014.

PERNAMBUCO. **Lei Estadual nº 15.859, de 30 de junho de 2016**. Dispõe sobre as condições sanitárias relativas à industrialização, distribuição e comercialização de água adicionada de sais no Estado de Pernambuco e dá outras providências. Recife: Assembleia Legislativa do Estado de Pernambuco, 2016.

PIRES, E. J. V. C. *et al.* Análise epidemiológica de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de hospital universitário. **Rev Bras Ter Intensiva**. v. 21, n. 4, p. 384-390, 2009. DOI: 10.1590/S0103-507X2009000400008.

REIS, L. R.; BEVILACQUA, P. D.; CARMO, R. F. Água envasada: qualidade microbiológica e percepção dos consumidores no município de Viçosa (MG). **Cadernos saúde coletiva**, v. 22, n. 3, p. 224-232, 2014.



ROJAS, T. *et al.* Bacilos gramnegativos no fermentadores en agua embotellada: susceptibilidad antimicrobiana y formación de biopelículas. **Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología**, v. 34, n. 2, p. 64-69, 2014.

SAMPAIO, I. B. M. S. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: FEPMVZ, 1998.

WIELAND, K.; CHHATWAL, P.; VONBERG, R. P. Nosocomial outbreaks caused by *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: Results of a systematic review. **American journal of infection control**, v. 46, n. 6, p. 643-648, 2018.

Sometido: 3 de julio de 2023.

Aprobado: 23 de agosto de 2023.

¹ Máster en Ciencias de la Biosfera Animal. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0833-7201>. Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/0965196379965915>.

² Doctor en Ciencias de la Biosfera Animal. ORCID: 0000-0002-2871-6655. Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/3276511555193502>.

³ Doctorado del Programa de Posgrado en Ciencias de la Biosfera Animal. ORCID: 0000-0001-9410-7631. Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/4532231119888940>.

⁴ Graduación en Medicina Veterinaria. ORCID: 0000-0001-9273-5204. Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/8329028352662293>.

⁵ Graduación en Medicina Veterinaria. ORCID: 0000-0001-5584-9464. Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/1495170820726310>.

⁶ M.Sc. en Ciencias de la Biosfera Animal. ORCID: 0000-0002-4913-8313. Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/4967459162060058>.

⁷ Doctor en Ciencias de la Biosfera Animal UFRPE. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2473-9451>. Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/5770903127454350>.

⁸ Graduando en Licenciatura en Ciencias Biológicas. ORCID: 0000-0001-7149-4931. Currículo Lattes: <https://lattes.cnpq.br/2928291078391850>.

⁹ Doctor en Bioquímica y Fisiología, Máster en Fisiología, Biólogo. ORCID: 0000-0003-1493-7964. Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/9044747136928972>.

¹⁰ Asesor. Doctor del Programa de Posgrado en Ciencias de la Biosfera Animal. ORCID: 0000-0002-1289-2902. Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/5998863169551704>.