



**Politécnico
Castelo Branco**

Escola Superior de Saúde
Dr. Lopes Dias

Caracterização de microrganismos potencialmente patogénicos com origem em águas para consumo não tratadas

Licenciatura em Ciências Biomédicas Laboratoriais

Adelaide Oliveira da Conceição Campos Silva

Orientadores

Professor Doutor Francisco José Barbas Rodrigues

Professora Doutora Cristina Maria Baptista Santos Pintado

Artigo de investigação apresentado à Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias do Instituto Politécnico de Castelo Branco para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Licenciatura em Ciências Biomédicas Laboratoriais, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Cristina Maria Baptista Santos Pintado e do Professor Doutor Francisco José Barbas Rodrigues, do Instituto Politécnico de Castelo Branco.

Julho 2025

Composição do júri

Presidente do júri

Professora Doutora Cláudia Manuela Pereira Córdova Marcos

Professora Adjunta, Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias

Orientador

Professor Doutor Francisco José Barbas Rodrigues

Professor Adjunto, Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias

Arguente

Professora Doutora Carina Alexandra Pereira Valente

Professora Adjunta, Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias

Agradecimentos

A concretização deste trabalho só foi possível graças ao apoio, orientação e incentivo de diversas pessoas. Venho, por este meio, expressar a minha sincera gratidão a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para o sucesso deste projeto.

Gostaria de expressar a minha profunda gratidão ao meu orientador, Professor Doutor Francisco Rodrigues, pelo seu apoio, orientação e disponibilidade ao longo de todo este percurso.

Um agradecimento especial também à minha orientadora, Professora Doutora Cristina Pintado e à Engenheira Manuela, da Escola superior Agrária, pelo acompanhamento e contributos essenciais para a concretização deste trabalho.

À minha família, em particular à minha mãe e ao Rogério, o meu sincero obrigado por todo o suporte, paciência e esforço para que este sonho se tornasse possível. Ao meu padrinho, que é um exemplo de vida e inspiração constante, o meu reconhecimento e carinho.

Por fim, agradeço aos amigos que fiz na faculdade, especialmente à Cátia Gonçalves e à Ana Rita Ramos, as minhas “vees”, que estiveram sempre ao meu lado, sempre a oferecer apoio e amizade incondicional nesta etapa tão importante.

A todos, o meu muito obrigado.

Trabalho financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT), através do centro de investigação CERNAS (Centro de Estudos de Recursos Naturais, Ambiente e Sociedade), com a referência UIDP/00681, DOI: 10.54499/UIDP/00681/2020

Resumo

Introdução: A contaminação microbiológica de águas não tratadas representa um risco para a saúde pública, sendo relevante a identificação de microrganismos emergentes com potencial patogénico.

Objetivo: Caracterizar microrganismos produtores de pigmento violeta / lilás potencialmente patogénicos presentes em águas não tratadas destinadas ao consumo.

Metodologia: Foram analisadas 12 estirpes produtoras de pigmento violeta/lilás isoladas entre 2014 e 2024. Realizaram-se testes morfológicos, enzimáticos, coloração de Gram, avaliação de hemólise e identificação bioquímica pelo sistema API® 20NE. A suscetibilidade antimicrobiana foi determinada segundo normas EUCAST.

Resultados: Todos os isolados foram bacilos Gram-negativos, oxidase-positivos e maioritariamente catalase-positivos, com predominância de β -hemólise. A maioria foi identificada como *Chromobacterium violaceum*, mas também foram detetadas espécies como *Burkholderia cepacia*, *Brevundimonas vesicularis* e *Ochrobactrum anthropi*. Observou-se resistência significativa à ceftazidima e ao imipenem.

Conclusão: A presença de microrganismos potencialmente patogénicos e multirresistentes em águas não tratadas reforça a necessidade de monitorização microbiológica rigorosa e de estratégias de prevenção eficazes para garantir a segurança da água consumida.

Palavras chave

Águas não tratadas, API® 20 NE, *Chromobacterium violaceum*, Pigmento violeta, Resistência antimicrobiana,

Abstract

Introduction: Microbiological contamination of untreated water poses a significant public health threat. Identifying emerging potentially pathogenic microorganisms is therefore essential for safeguarding human health.

Objective: Characterize violet/purple pigment-producing microorganisms with pathogenic potential isolated from untreated water intended for human consumption.

Methods: Twelve pigmented bacterial strains, isolated between 2014 and 2024, were analyzed. Characterization included morphological assessment, oxidase and catalase activity tests, Gram staining, hemolysis evaluation on blood agar, and biochemical identification using the API® 20NE system. Antimicrobial susceptibility was tested via disk diffusion in accordance with EUCAST guidelines.

Results: All isolates were Gram-negative bacilli and oxidase-positive; most were also catalase-positive and exhibited β -hemolysis. The majority were identified as *Chromobacterium violaceum*, with additional isolates classified as *Burkholderia cepacia*, *Brevundimonas vesicularis*, and *Ochrobactrum anthropi*. Several strains demonstrated notable resistance to ceftazidime and imipenem.

Conclusion: The detection of potentially pathogenic, multidrug-resistant microorganisms in untreated water underscores the importance of continuous microbiological surveillance and robust preventive measures to ensure the safety of water intended for human consumption.

Keywords

Antimicrobial resistance, API® 20NE, *Chromobacterium violaceum*, untreated water, violet pigment

Introdução

A água é um recurso essencial para a sobrevivência humana e para o equilíbrio dos ecossistemas. No entanto, a disponibilidade de água potável em qualidade e quantidade adequadas tem sido um desafio crescente em muitas regiões do mundo. A poluição das fontes hídricas, associada a um aumento na carga de contaminantes químicos e microbiológicos, representa uma ameaça significativa para a saúde pública. As águas poluídas tornam-se ambientes propícios para a transmissão de doenças, devido não apenas à presença de substâncias tóxicas, mas também à elevada carga de agentes microbiológicos patogénicos (Forstinus *et al.*, 2016; Kristanti *et al.*, 2022)

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que a contaminação microbiológica da água potável causa mais de 2 milhões de mortes por ano, sublinhando a necessidade de monitorizar e controlar esses agentes patogénicos para proteger a saúde pública (WHO, 2015).

Microrganismos vários como bactérias, vírus, protozoários e fungos, podem atingir fontes de água potável através de esgotos domésticos, efluentes industriais e práticas agrícolas inadequadas. Microrganismos como *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa* são exemplos de microrganismos que podem causar doenças graves de origem hídrica (Magana *et al.*, 2020).

Além disso, microrganismos como *Chromobacterium violaceum* e *Ochrobactrum anthropi*, ambos produtores de pigmentos violeta, do tipo violaceína, têm sido isolados de ambientes aquáticos tropicais e subtropicais. Estas são bactérias oportunistas, com resistência natural a vários antibióticos e potencial para causar infeções hospitalares, especialmente em indivíduos imunocomprometidos. A identificação de agentes como *Ochrobactrum anthropi* e *Chromobacterium violaceum* em águas naturais reflete a complexidade da contaminação microbiológica e a crescente preocupação com microrganismos emergentes em ecossistemas aquáticos (Alisjahbana *et al.*, 2021; Della *et al.*, 2024).

Estes organismos não afetam apenas regiões com deficiências de saneamento básico, mas também podem surgir em áreas urbanas devido a falhas nos sistemas de tratamento de água. A contaminação pode ocorrer por diferentes vias, desde o consumo direto até ao uso recreativo ou culinário de água contaminada. Fatores ambientais como chuvas intensas, secas prolongadas e alterações no uso do solo agravam ainda mais a dinâmica de dispersão microbiana (Some *et al.*, 2021).

Apesar da crescente evidência sobre a presença destes microrganismos em ambientes aquáticos, a sua caracterização fenotípica e o seu perfil de resistência antimicrobiana permanecem pouco explorados, especialmente em contextos geográficos específicos como Portugal. Há uma escassez de estudos que abordem microrganismos pigmentados raros, como *C. violaceum* e *O. anthropi*, em águas não tratadas, e a ausência de dados pode comprometer a vigilância epidemiológica e a avaliação de risco. Diante destas lacunas, torna-se essencial caracterizar os microrganismos presentes em águas não tratadas e compreender os fatores que favorecem a sua persistência e patogenicidade, contribuindo assim para estratégias eficazes de prevenção e controlo (Magana *et al.*, 2020).

O presente trabalho teve como principal objetivo caracterizar microrganismos produtores de pigmento violeta / lilás potencialmente patogênicos presentes em águas não tratadas destinadas ao consumo.

Metodologias

O presente estudo é de natureza observacional, descritiva e experimental, tendo como foco a caracterização fenotípica e bioquímica de microrganismos isolados de águas não tratadas destinadas ao consumo humano. É observacional, pois analisa microrganismos isolados de forma natural, sem intervenção nas suas condições de origem. É descritivo porque caracteriza detalhadamente os isolados quanto à morfologia, fisiologia, bioquímica e resistência antimicrobiana. É também experimental, dado que envolve a realização de ensaios laboratoriais controlados para avaliar o comportamento dos microrganismos em diferentes condições. Esta abordagem permitiu avaliar o risco microbiológico associado a águas não tratadas.

1. Culturas bacterianas

Este estudo foi realizado no Laboratório de Microbiologia da Escola Superior Agrária de Castelo Branco (ESACB) tendo por objetivo a caracterização de 12 culturas bacterianas produtoras de pigmento de cor roxa/ lilas, isoladas de amostras de água analisadas no mesmo laboratório entre 2014 e 2024 (**Tabela 1**).

As culturas bacterianas encontravam-se criopreservadas a -80°C , em criotubos com leite desnatado (OXOID, ref. LP0033B) e 15% (v/v) glicerol (Sigma-Aldrich, ref. 49767) esterilizados. As amostras foram cuidadosamente descongeladas e submetidas a uma triagem microbiológica inicial. Esta consistiu na realização de sementeiras em meio de Agar Nutritivo, com o objetivo de avaliar a viabilidade microbiana após o período de congelação. Com base nos resultados desta triagem, foram selecionadas 12 culturas bacterianas representativas para análise aprofundada.

Na **tabela 1** encontram-se as referências das culturas usadas neste estudo, bem como as características das colónias em Agar Nutritivo, AN (Biokar, ref. BK 185HA), o tipo de amostra de água de onde proveio o isolado, a zona geográfica e a data de isolamento.

Tabela 1 — Características das culturas usadas neste estudo.

Ref ^o isolado	Aspeto em AN	Origem	Zona geográfica	Data isolamento	de
2	Colónias circulares, +/- 2mm Ø, roxo forte	Água de furo	Salgueiro do Campo	12/12/2014	
4	Colónias circulares, roxo	Água de furo	Cebolais de Cima	19/04/2017	
5	Colónias circulares, +/- 2mm Ø, roxo forte	Água de furo	Lardosa	16/01/2020	
7	Colónias circulares, +/- 2mm Ø, roxo forte	Água de furo	Tinalhas	28/04/2021	
9	Colónias circulares, lilás claro	Água de poço	Castelo Novo	31/01/2022	
10	Colónias circulares, +/- 2mm Ø, roxo forte	Água de poço	Lardosa	31/01/2022	
11	Colónias circulares, +/- 2mm Ø, roxo forte	Água de furo	Lardosa	31/01/2022	
12	Colónias circulares, +/- 2mm Ø, roxo forte	Água de furo	Tinalhas	31/01/2022	
13	Colónias circulares roxo	Água de rega	Cova da Beira	30/03/2022	
14	Colónias circulares umbilicadas, roxo forte	Água de poço	Penamacor	21/12/2022	
17	Colónias roxas, margem filamentosa +/- 8mm Ø	Água de charca	Penamacor	11/12/2024	
18	Colónias circulares, +/- 3mm Ø, lilás	Água de bebedouro	Castelo Branco	19/12/2024	

AN- Agar Nutritivo

2.Crescimento e produção de pigmento a 10°C, 25°C e 37°C

As culturas bacterianas foram inoculadas em meio de Agar Nutritivo (Biokar, BK 185HA) e incubadas a três temperaturas distintas, nomeadamente 10 °C, 25 °C e 37 °C, durante um período máximo de 7 dias. Ao longo deste período foram registados o crescimento e a produção de pigmento roxo / lilás.

3.Teste da catalase e oxidase

A partir da cultura jovem em Agar Nutritivo foram efetuados os testes da catalase e da oxidase, com o objetivo de avaliar a produção destas enzimas, fundamentais na caracterização preliminar dos microrganismos. O teste da catalase e o teste da oxidase seguiram os procedimentos descritos, respetivamente, por MacFaddin (2000) e Smibert e Krieg (1994)

4.Coloração diferencial de Gram e teste KOH

A partir da mesma cultura jovem em Agar Nutritivo referida no ponto anterior, foram realizados esfregaços bacterianos corados pela técnica de Gram segundo o método clássico descrito por Bartholomew e Mittwer (1952), com o intuito de determinar a natureza da parede celular dos isolados, distinguindo entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de possibilitar a análise morfológica das células bacterianas (forma, modo de associação e estruturas celulares) ao microscópio ótico (X1000). Complementarmente, foi realizado o teste do Hidróxido de Potássio, KOH, a 3% conforme o protocolo proposto por Gregersen (1978), que permite esclarecer casos duvidosos de resposta à coloração de Gram.

5. Avaliação da hemólise

A atividade hemolítica dos isolados foi avaliada em meio de Agar Sangue (Frlabo, FRI 0066P), visando identificar a capacidade das bactérias em lisar as hemácias. Este teste fornece dados relevantes sobre o potencial patogénico dos microrganismos, sendo possível distinguir entre diferentes tipos de hemólise: completa (β -hemólise), parcial (α -hemólise) ou ausência de hemólise (γ -hemólise).

Cada isolado foi inoculado por toque simples e por picada em placas de Agar Sangue, que por sua vez foram incubadas durante 24 a 48 horas a 25 °C, em atmosfera aeróbia. Após o período de incubação, as zonas de crescimento bacteriano foram avaliadas visualmente quanto ao tipo de hemólise

6. Caracterização bioquímica e identificação através do API® 20 NE

Para a caracterização e identificação bioquímica, os isolados foram submetidos ao sistema API® 20NE (bioMérieux®, ref. 20050), o qual permite a caracterização de bactérias não fermentadoras Gram-negativas com base em vinte testes bioquímicos miniaturizados. Este sistema miniaturizado baseia-se em uma série de 20 testes bioquímicos, que avaliam características metabólicas como hidrólise de substratos, assimilação de compostos e produção de enzimas. As galerias bioquímicas foram inoculadas com uma suspensão bacteriana preparada a partir de cultura jovem em Agar Nutritivo e acertada a uma densidade celular em soro fisiológico equivalente ao padrão 0,5 da escala de McFarland (bioMérieux®, ref. 8609337), a que correspondem aproximadamente $1,5 \times 10^8$ células / ml. Após a incubação das galerias a 22°C durante 24 + 24 horas, as reações foram lidas, registadas nas folhas de leitura e obtidos os perfis numéricos. Estes foram depois comparados com a base de dados *online* disponibilizada pelo fabricante (APIWEB™), permitindo a identificação presuntiva dos isolados ao nível do género ou espécie. Na folha de identificação obtida há referência ao perfil numérico, à identificação proposta pelo sistema com os taxa mais significativos e ao grau de confiabilidade (índice de correspondência) atribuído pelo software de interpretação.

Suscetibilidade a antibióticos

A suscetibilidade antimicrobiana foi avaliada pelo método de difusão em disco (Kirby-Bauer), seguindo as normas do European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), Version 15.0, 2025-01-01 (EUCAST, 2025a). As estirpes foram cultivadas em Agar Müller-Hinton (Biokar, CM0405) e as suspensões ajustadas à turvação de 0,5 da escala de McFarland ($\approx 1,5 \times 10^8$ cels./ml). Após a inoculação das placas, recorrendo a um distribuidor de discos aplicaram-se os seguintes discos de antibiótico da marca Liofilchem: Ceftazidima (CAZ) 30 µg, Ciprofloxacina (CIP) 5 µg, Gentamicina (CN) 30 µg e Imipenem (IMI) 10 µg. De seguida foram incubadas a 22 °C durante 24 a 48 horas.

Após o período de incubação, os diâmetros das zonas de inibição foram medidos e interpretados com base nos *breakpoints* do EUCAST (2025b). Na ausência de critérios específicos para certas espécies, recorreram-se a valores de referência de microrganismos taxonomicamente próximos, devidamente justificados.

Devido à ausência de valores de referência específicos para os microrganismos analisados neste estudo, foram utilizados os parâmetros estabelecidos para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 como padrão para interpretação dos testes de suscetibilidade antibiótica e controlo de qualidade. Esta escolha baseia-se na semelhança fenotípica e em características microbiológicas comuns, como o metabolismo e a resistência intrínseca, entre esses microrganismos e *P. aeruginosa*, amplamente reconhecida como um padrão em estudos de antibiograma. Esta abordagem foi adotada num estudos anterior quando valores específicos não estão disponíveis, garantindo maior confiabilidade na interpretação dos resultados (Conceição, 2013).

Para controlo de qualidade da execução da prova foi utilizada a estirpe de referência *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, estirpe esta que é a indicada como controlo na norma utilizada.

Na **tabela 2** encontram-se os valores de referência indicados pela EUCAST (2025c).

Tabela 2- Valores de referência para interpretação dos diâmetros das zonas de inibição para os antibióticos utilizados.

Antibiótico	Disco (µg)	Diâmetros padrão das zonas de inibição (mm)			Estirpe de referência <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
		≥ Zona sensível (S)	≤ Zona resistente (R)	ATU	
Ceftazidima	10	50	17	Sem dados	21-27
Ciprofloxacina	5	50	26	Sem dados	25-33
Gentamicina	10	IE	IE	Sem dados	17-23
Imipenem	10	50	20	Sem dados	20-28

ATU- área de incerteza técnica, IE- evidencia insuficiente

Resultados

Os resultados obtidos a partir da caracterização morfológica, enzimática, bioquímica e fisiológica dos isolados bacterianos encontram-se compilados na **tabela 3**. As análises incluíram os testes de catalase e oxidase, coloração de Gram e teste do hidróxido de potássio (KOH 3%), avaliação da hemólise em Agar Sangue e ensaios de crescimento e produção de pigmento a diferentes temperaturas (10 °C, 25 °C e 37 °C).

Tabela 3 — Crescimento e produção de pigmento, morfologia e coloração de Gram, testes de hemólise, catalase, oxidase e hidróxido de potássio para os 12 isolados estudados

Ref ^a isolado	Crescimento			Produção de pigmento			Morfologia e coloração de Gram	Hidróxido de potássio	Hemólise 30°C	Catalase	Oxidase
	10 °C	25 °C	37 °C	10 °C	25 °C	37 °C					
2	-	+++	+++	-	roxo escuro	roxo escuro	Bacilos, Gram negativa	Gram negativa	β, larga	+	+
4	-	+++	+++	-	roxo escuro	-	Bacilos, Gram negativa	Gram negativa	β, larga	+	+
5	-	+++	-	-	roxo escuro	-	Bacilos, Gram negativa	Gram negativa	β, larga	+	+
7	+++	+++	-	roxo escuro	roxo escuro	-	Bacilos, Gram negativa	Gram negativa	β, larga	+	+
9	+++	+++	-	branco	lilas claro	-	Bacilos, Gram negativa	Gram negativa	β, fraca	-	+
10	-	+++	+++	-	roxo escuro	roxo escuro	Bacilos, Gram negativa	Gram negativa	β, larga	+	+
11	+	++	+++	roxo escuro	roxo escuro	roxo escuro	Bacilos, Gram negativa	Gram negativa	β, larga	+	+
12	+++	+++	-	roxo escuro	roxo escuro	-	Bacilos, Gram negativa	Gram negativa	β fraca	+	+
13	+++	+++	-	roxo escuro	lilas claro	-	Bacilos, Gram negativa	Gram negativa	β fraca	+	+
14	+++	+++	-	roxo escuro	lilas claro	-	Bacilos, Gram negativa	Gram negativa	β fraca	-	+
17	+++	+++	-	roxo escuro	lilas claro	-	Bacilos, Gram negativa	Gram negativa	β, larga	+	+
18	+++	+++	-	Violeta	lilas claro	-	Bacilos, Gram negativa	Gram negativa	β, fraca	+	+

(-) = negativo / ausente; (+++, ++, +) = intensidade de crescimento (elevado, moderado, baixo); γ = sem hemólise; α = hemólise parcial; β = hemólise completa

Quanto à avaliação do crescimento e produção de pigmento em diferentes temperaturas, foi registado crescimento para todos os isolados de forma mais expressiva a 25 °C (**figura 1**), enquanto o crescimento a 10 °C foi reduzido ou ausente em alguns isolados (**figura 2**). A 37 °C só 4/12 isolados cresceram (**figura 3**). A produção de pigmento foi mais evidente à temperatura de 25°C.

Pode observar-se que a temperatura a que os isolados foram incubados, para além de ter influência na taxa de multiplicação das culturas bacterianas estudadas, interfere igualmente com a maior ou menor produção de pigmento. Alguns isolados produzem pigmento menos intenso e/ou demoram mais tempo a produzi-lo.



Figura 1 - Características culturais (crescimento e cor) dos 12 isolados após 48 horas de incubação a 25 °C em meio de Agar Nutritivo.



Figura 2 - Características culturais (crescimento e cor) dos 12 isolados após 48 horas de incubação a 10 °C em meio de Agar Nutritivo.

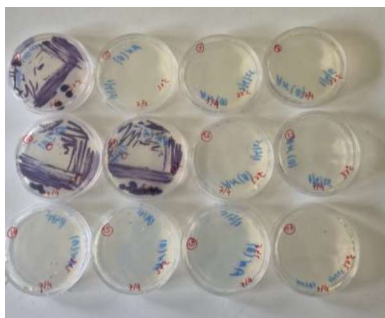


Figura 3 - Características culturais (crescimento e cor) dos 12 isolados após 48 horas de incubação a 37 °C em meio de Agar Nutritivo.

Todos os isolados apresentaram atividade oxidase positiva. Em relação à catalase, foi observada positividade em 10 dos 12 isolados (os isolados 9 e 14 deram um resultado negativo). A observação dos esfregaços ao microscópio ótico (x1000) após a coloração de Gram revelou que todos se apresentavam como bacilos Gram-negativos (**figura 4**), sendo concordante com os resultados obtidos pelo teste do KOH a 3%.

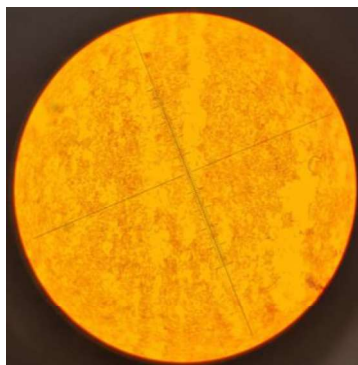


Figura 4 - Bacilos Gram-negativos referentes ao isolado 10 (microscopia ótica, x1000).

No teste de hemólise, observou-se que a maioria dos isolados apresentou atividade hemolítica do tipo β -hemólise larga (isolados 2, 4, 5, 7, 10, 11, 17), embora alguns tenham demonstrado β -hemólise fraca (isolados 9, 12, 13, 14, 18) (**figura 5**).

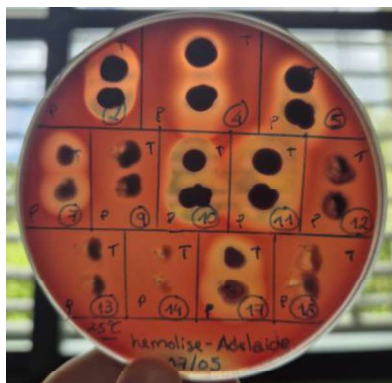


Figura 5 - Aspeto das culturas dos isolados 2, 4, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 17 e 18 em Agar Sangue após 24 a 48 horas de incubação a 25 °C

Os resultados da caracterização bioquímica dos isolados bacterianos, obtidos através do sistema API® 20NE, encontram-se na **tabela 4 e na figura 6**. Nesta, são descritos os perfis bioquímicos de cada isolado com base nas reações aos diferentes testes do sistema, permitindo uma avaliação detalhada das características metabólicas relevantes para a sua identificação presuntiva.

Tabela 4 — Perfis bioquímicos obtidos com base nas reações aos 20 testes do API® 20 NE

ReP isolado	NO3	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNG	GLU	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	PAC	OX
2	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+
4	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+
5	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+
7	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
9	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+
10	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+
11	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+
12	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+
13	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+
14	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+
17	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
18	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+

NO₃ – Redução de nitratos; TRP – Triptofanoase (produção de indol); GLU – Fermentação da glicose; ADH – Arginina dihidrolase; URE – Urease; ESC – Hidrólise da esculina; GEL – Gelatinase; PNG – β-galactosidase (PNPG); GLU – Assimilação da glicose; ARA – Assimilação da arabinose; MNE – Assimilação da manose; MAN – Assimilação do manitol; NAG – Assimilação de N-acetilglicosamina; MAL – Assimilação da maltose; GNT – Assimilação de gluconato; CAP – Assimilação de caprato; ADI – Assimilação de ácido adípico; MLT – Assimilação de malato; CIT – Assimilação de citrato; PAC – Assimilação de ácido fenilacético; OX – Oxidase.



Figura 6 – Sistema API® 20NE dos isolados 14, 17 e 18

Da observação da tabela anterior podemos concluir que todos os isolados se comportaram da mesma forma para a produção de indol (reação negativa), a produção de urease (reação negativa), a produção de β-galactosidase (reação negativa), a assimilação da glicose (reação positiva), a assimilação do ácido fenilacético (reação negativa) e a produção de oxidase (reação positiva). Verifica-se ainda que os isolados 2, 5 e 10 têm exatamente o mesmo perfil bioquímico. Os perfis bioquímicos dos isolados 4 e 11 são muito semelhantes aos anteriores e apenas diferem entre si na assimilação do citrato. Os perfis dos isolados 12 e 13 diferem apenas nos testes MNE, NAG e ADI.

Os perfis numéricos obtidos após a leitura das galerias miniaturizadas permitiram uma identificação presuntiva (**tabela 5**).

Tabela 5 — Tabela de resultados referentes aos API® 20 NE realizados das diversas placas

Ref ^a	Perfis numéricos	Tipo de perfil	% ID	T	Taxa significativos
2	5152555	Excelente identificação	99,9 %	0.96	<i>Chromobacterium violaceum</i>
4	1152555	Fracá discriminação	62,5 %	0.68	<i>Chromobacterium violaceum</i>
			36,0	0.69	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
5	5152555	Excelente identificação	99,9 %	0.96	<i>Chromobacterium violaceum</i>
7	1457275	Boa identificação	95,9 %	0.37	<i>Burkholderia cepacia</i>
			1,4 %	0.02	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
9	1457265	Perfil inaceitável	-----		<i>Shingomonas paucimobilis</i>
			-----		<i>Pseudomonas luteola</i>
10	5152555	Excelente identificação	99,9 %	0.96	<i>Chromobacterium violaceum</i>
11	1152554	Muito boa identificação	99,3 %	0.72	<i>Chromobacterium violaceum</i>
			-----		<i>Shingomonas paucimobilis</i>
			-----		<i>Ochrobactrum anthropi</i>
			-----		<i>Pseudomonas luteola</i>
12	1447275	Perfil inaceitável	-----		<i>Shingomonas paucimobilis</i>
			-----		<i>Ochrobactrum anthropi</i>
			-----		<i>Pseudomonas luteola</i>
			-----		<i>Burkholderia cepacia</i>
13	1445375	Fracá discriminação	63,5 %	0.37	<i>Ochrobactrum anthropi</i>
			36,1%	0.31	<i>Shingomonas paucimobilis</i>
14	0050244	Boa identificação	97,4 %	0.57	<i>Brevundimonas vesicularis</i>
17	5050704	Fracá discriminação	82,5 %	0.42	<i>Vibrio alginolyticus</i>
			15,5 %	0.22	<i>Aeromonas salmonicida ssp salmonicida</i>
			1,8 %	0.13	<i>Aeromonas salmonicida masoucida/ achromogenes</i>
18	1447374	Fracá discriminação	49,6 %	0.38	<i>Shingomonas paucimobilis</i>
			44,3 %	0.4	<i>Ochrobactrum anthropi</i>

^a % ID- Probabilidade de que o microrganismo identificado seja correto, T: Grau de semelhança com o perfil típico da espécie.

Dos doze isolados analisados com o sistema API® 20 NE, quatro (isolados 2, 5, 10 e 11) apresentaram identificação excelente ou muito boa como *Chromobacterium violaceum*, com percentagens de correspondência superiores a 99%. Dois isolados (7 e 14) foram identificados com boa correspondência como *Burkholderia cepacia* e *Brevundimonas vesicularis*, respetivamente. Quatro isolados (4, 13, 17 e 18) apresentaram fracá discriminação, com múltiplas possibilidades de identificação e percentagens de correspondência inferiores a 85%. Dois isolados (9 e 12) apresentaram perfis inaceitáveis, não permitindo uma identificação conclusiva pelo sistema.

A **tabela 6** apresenta os diâmetros de inibição dos antibióticos utilizados no estudo, obtidos através do teste de sensibilidade, bem como os resultados do controlo de qualidade realizados para garantir a confiabilidade dos dados. Na **figura 7** observamos uma placa de

Agar Müller-Hinton utilizada para o teste de sensibilidade antimicrobiana por difusão em disco (método Kirby-Bauer) de isolados bacterianos deste estudo.

Tabela 6 - Diâmetros de inibição (em milímetros) dos antibióticos utilizados no estudo e resultados do controlo de qualidade. Os valores indicam a zona de inibição do crescimento bacteriano ao redor dos discos de antibióticos.

Ref ^a isolado	Ceftazidime (30 µg)	Ciprofloxacina (5 µg)	Imipenem (10 µg)	Gentamicina (30 µg)
2	6 (R)	45.82	18.22 (R)	25.91
4	6 (R)	53.59 (S)	25.36	27.80
5	6 (R)	51.57 (S)	24.90	28.13
7	26.60	43.23	23.74	15.34
9	29.93	32.67	20.70	22.53
10	6(R)	48.70	14.17 (R)	26.89
11	6(R)	49.72	13.57 (R)	26.12
12	33.70	31.95	18.44 (R)	24.95
13	24.64	20.40 (R)	24.09	12.32
14	29.32	30.14	35.28	24.16
17	21.18	35.03	43.46	27.36
18	31.90	26.35	20.08	18.85
Estirpe de referência <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	27,83	30,05	25,60	25,81

R- resistente, S- sensível

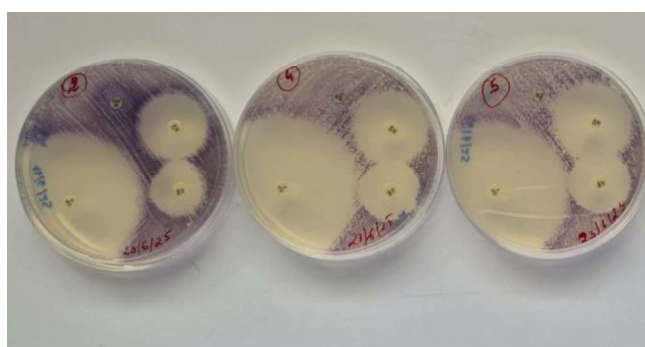


Figura 7- Perfil de sensibilidade antimicrobiana dos isolados 2,4 e 5 obtidos por método de difusão em disco (Kirby-Bauer)

Os resultados obtidos para a estirpe de referência *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 encontram-se dentro dos valores de referência estabelecidos para cada antibiótico testado. Isso confirma que os procedimentos laboratoriais e os testes de suscetibilidade foram realizados corretamente, garantindo a fiabilidade dos resultados. Assim, o controlo de qualidade foi aprovado.

Pela observação da **tabela 6** podemos verificar que todos os isolados identificados como *Chromobacterium violaceum* apresentaram resistência à ceftazidima 30 µg. Em relação ao antibiótico ciprofloxacina 5 µg, só se verificou resistência para o isolado 13, identificado como *Ochrobactrum anthropi*. Para o antibiótico imipenem, verificou-se resistência para três isolados de *Chromobacterium violaceum* (isolados 2, 10 e 11) e para o isolado 12. Cinco dos 12 isolados (7,9, 14, 17 e 18) mostraram-se suscetíveis ou intermédios a todos os antibióticos referidos.

Discussão

A caracterização morfológica, fisiológica, enzimática e bioquímica dos isolados permitiu identificar uma diversidade de bacilos Gram-negativos não fermentadores, com particular destaque para *Chromobacterium violaceum*, *Burkholderia cepacia*, *Brevundimonas vesicularis* e *Ochrobactrum anthropi*, microrganismos frequentemente associados a ambientes aquáticos tropicais e subtropicais, com potencial patogênico em humanos.

Os resultados dos ensaios de crescimento a diferentes temperaturas revelaram um padrão de crescimento mais expressivo a 25 °C para a maioria dos isolados, com desenvolvimento reduzido a 10 °C e variável a 37 °C. Esta resposta sugere uma adaptação a ambientes de clima moderado ou subtropical, comportamento típico de bactérias ambientais que não se desenvolvem bem em temperaturas extremas (Alisjahbana *et al.*, 2021).

A temperatura de 37 °C, por sua vez, é particularmente relevante por simular a temperatura corporal humana. O facto de alguns isolados apresentarem crescimento a esta temperatura indica uma potencial capacidade de sobrevivência e proliferação no hospedeiro, reforçando o seu possível papel como patógenos oportunistas. A ausência de crescimento noutros isolados, por outro lado, pode indicar uma menor probabilidade de infecção em humanos.

Nos presentes isolados, a produção de pigmento foi mais intensa a 25 °C, com tons característicos de roxo escuro, e ausente a 10 °C. Esta pigmentação está associada à biossíntese da violaceína, que possui propriedades antibacterianas, antivirais e antiparasitárias, além de estar implicada na virulência de *C. violaceum*. A sua presença pode explicar a atividade hemolítica observada em Agar Sangue, maioritariamente do tipo β, sugerindo citotoxicidade associada à produção do pigmento (Alisjahbana *et al.*, 2021; Andrighetti-Fröhner *et al.*, 2003).

Todos os isolados apresentaram morfologia bacilar e coloração de Gram-negativa, padrão confirmado pelo teste do hidróxido de potássio (KOH), com lise celular visível em todas as amostras. A positividade universal para a enzima oxidase e a positividade para catalase em 10 dos 12 isolados são características esperadas para bacilos não fermentadores, como *Chromobacterium*, *Burkholderia*, *Brevundimonas* e *Sphingomonas*, microrganismos conhecidos pela utilização de vias respiratórias aeróbias (Alisjahbana *et al.*, 2021; Ryan & Pembroke, 2018).

A atividade hemolítica verificada em gelose de sangue apresentou uma predominância de β-hemólise, com variações de intensidade. A presença deste tipo de hemólise pode estar relacionada com a produção de fatores de virulência, como observado em *C.*

violaceum, cuja violaceína tem demonstrado propriedades citotóxicas. No caso de *C. violaceum*, essa capacidade é corroborada por estudos que relacionam a hemólise com a produção de violaceína e outros fatores de patogenicidade, frequentemente associados a septicemias graves, abscessos viscerais e elevada mortalidade em humanos (Alisjahbana *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2011).

A identificação bioquímica realizada com o sistema API® 20 NE permitiu a atribuição presuntiva de designações taxonômicas a todos os isolados, exceto dois (isolados 9 e 12), cujos perfis foram considerados inaceitáveis. Os perfis obtidos foram, na maioria dos casos, coerentes com os dados fenotípicos previamente observados. Entre as espécies identificadas, *Chromobacterium violaceum* foi a mais recorrente, com cinco isolados (isolados 2, 4, 5, 10 e 11), sendo quatro deles com elevada confiabilidade ($\geq 99\%$).

O elevado número de isolados identificados como *C. violaceum* é particularmente relevante tendo em conta o seu perfil ambiental e clínico. Trata-se de um bacilo Gram-negativo, oxidase e catalase positivo, produtor de violaceína e frequentemente associado a ambientes aquáticos tropicais e subtropicais. Como descrito por Dall'Agnol *et al.* (2008), isolados ambientais desta espécie partilham um conjunto robusto de características bioquímicas que incluem a capacidade de reduzir nitrato, a assimilação de glicose e a produção de pigmento a temperaturas de 25° C. Estas observações foram compatíveis com os dados obtidos no presente estudo, confirmando a consistência entre a identificação bioquímica, morfológica e fisiológica (Dall'Agnol *et al.*, 2008).

Além do seu valor ecológico, *C. violaceum* tem relevância clínica crescente. Embora as infeções humanas sejam raras, são frequentemente graves e associadas a alta taxa de mortalidade, sobretudo em casos de septicemia, abscessos hepáticos e pulmonares, e infeções em tecidos moles. Recentemente, estudos descreveram a presença do gene blaCVI-1, codificando uma metalo- β -lactamase que confere resistência a β -lactâmicos e carbapenemes em estirpes ambientais de *C. violaceum*, o que ajuda a explicar a resistência observada aos antibióticos ceftazidima e imipenem nos isolados do presente estudo (Gomes *et al.*, 2023).

O isolamento de *Burkholderia cepacia* (isolado 7) é particularmente significativo devido à sua relevância como microrganismo patogénico oportunista e contaminante em ambientes clínicos e farmacêuticos. Esta espécie apresenta elevada resistência a diversos antimicrobianos e capacidade de sobrevivência em condições oligotróficas, o que lhe permite colonizar sistemas aquáticos e hospitalares. As características fenotípicas observadas, como a positividade para oxidase e a hemólise, estão em concordância com o seu perfil descrito na literatura (Tavares *et al.*, 2020).

A identificação de *Brevundimonas vesicularis* (isolado 14) reforça a diversidade de microrganismos presentes nas amostras estudadas. Esta bactéria, também Gram-negativa e oxidase positiva, tem sido associada a infeções em pacientes imunocomprometidos, apesar de ser considerada uma espécie de baixa prevalência clínica. Estudos clínicos identificaram surtos de bacteremia causados por esta espécie, com registos de resistência significativa à ceftazidima e sensibilidade variável à gentamicina. Adicionalmente, casos clínicos relatam o uso bem-sucedido de tratamento empírico com gentamicina, sugerindo que esta abordagem pode ser válida em situações suspeitas, mesmo na ausência de diretrizes terapêuticas específicas (Zhang *et al.*, 2012; Christiadi *et al.*, 2018).

Embora o isolado 18 tenha apresentado uma maior probabilidade de ser *Shingomonas paucimobilis* (49,6%) em comparação com *Ochrobactrum anthropi* (44,3%), a análise das características fenotípicas, especialmente a pigmentação amarelada típica das colônias, indica que a identificação mais consistente é como *Ochrobactrum anthropi*. Apesar da percentagem ligeiramente inferior, a pigmentação observada, aliada à semelhança com outros isolados do mesmo gênero, reforça essa atribuição, evidenciando a importância de complementar a análise numérica com dados fenotípicos para uma identificação mais precisa (Ryan & Pembroke, 2020)

Apesar da capacidade do sistema API® 20 NE em identificar isolados de *C. violaceum* com elevada fidelidade, outros microrganismos como *Ochrobactrum anthropi*, *Brevundimonas vesicularis*, *Burkholderia cepacia* e *Sphingomonas paucimobilis*, foram identificados com confiabilidade variável, refletindo limitações do sistema na diferenciação de espécies fenotipicamente próximas ou com perfis atípicos. Por exemplo, o sistema apresentou diversas discriminações fracas ou inaceitáveis (isolados 9, 12, 13, 17 e 18) em vários isolados com múltiplas possibilidades de identificação, o que é consistente com relatos da literatura sobre o desempenho limitado do API® 20NE em estudos ambientais (Ryan & Pembroke, 2020; Dall'Agnol *et al.*, 2008).

Neste contexto, a aplicação de métodos moleculares como a sequenciação de genes é altamente recomendada para confirmar a identificação taxonômica e validar os resultados obtidos bioquimicamente, sobretudo em microrganismos emergentes ou mal representados em bases comerciais (Tavares *et al.*, 2020; Ryan & Pembroke, 2018).

A utilização dos valores de referência de *Pseudomonas aeruginosa* como substitutos para os microrganismos estudados representa uma limitação inerente ao presente trabalho, devido à inexistência de padrões oficiais para *Chromobacterium violaceum*, *Burkholderia cepacia*, *Ochrobactrum anthropi* e *Brevundimonas vesicularis*. Contudo, esta escolha é justificada pela proximidade fisiológica e padrão de resistência comum a múltiplos antibióticos, características essas que facilitam uma análise comparativa válida. Estudos prévios também adotaram esta estratégia diante da escassez de dados específicos, o que reforça a adequação desta abordagem para a avaliação preliminar da suscetibilidade bacteriana (Conceição, 2013).

Nos isolados identificados como *Chromobacterium violaceum* (2, 4, 5, 10 e 11), observou-se uma resistência marcada à ceftazidima e ao imipenem, com zonas de inibição significativamente inferiores às da estirpe de controle, sugerindo a ineficácia destes antibióticos para esta espécie. Em relação à ciprofloxacina, os resultados foram predominantemente intermediários, indicando alguma atividade, ainda que limitada. A gentamicina apresentou zonas de inibição elevadas nestes isolados; no entanto, visto que não existem pontos de corte definidos para esta substância nestas espécies, nem para comparação direta com a estirpe controle, servindo os resultados apenas como indicador preliminar de atividade *in vitro*.

O isolado 7, identificado como *Burkholderia cepacia*, revelou perfis de suscetibilidade intermediários para todos os antibióticos testados. A resposta variável à ciprofloxacina e a atividade incerta da gentamicina reforçam o seu potencial desafio clínico. Isolados com identificação sugestiva de *Ochrobactrum anthropi* e *Shingomonas paucimobilis*, nomeadamente os números 12, 13 e 18, apresentaram comportamentos distintos. O isolado 18 destacou-se por exibir zonas de inibição compatíveis com sensibilidade para

todos os antibióticos testados, incluindo ciprofloxacina, imipenem e ceftazidima, o que poderá refletir um menor nível de resistência nesta estirpe específica.

O isolado 14, correspondente a *Brevundimonas vesicularis*, apresentou perfis intermediários para todos os antibióticos testados, situando-se valores de inibição ligeiramente acima dos limiares de resistência estabelecidos para *P. aeruginosa*. Apesar de ser possível inferir alguma suscetibilidade relativa, a ausência de pontos de corte específicos para esta espécie impede conclusões definitivas.

De forma geral, observou-se que ceftazidima e imipenem foram os antibióticos com menor eficácia contra os isolados estudados, ao passo que, em relação à ciprofloxacina, os isolados demonstraram alguma suscetibilidade. A gentamicina apresentou, na maioria dos casos, zonas de inibição elevadas, mas a inexistência de valores de referência para interpretação formal impõe prudência na análise dos seus resultados. Estes dados reforçam a complexidade inerente à avaliação de antimicrobianos em espécies raramente descritas na literatura e sublinham a necessidade de diretrizes específicas para estas bactérias não fermentadoras.

Conclusão

A água é um recurso vital para a saúde humana, mas a sua contaminação microbiológica continua a representar uma séria ameaça, especialmente em regiões que dependem de fontes de água não tratada. Microrganismos patogênicos emergentes presentes em águas naturais, particularmente aqueles com perfis de resistência preocupantes, exigem uma atenção crescente por parte da comunidade científica e das autoridades de saúde pública.

Seguindo esta problemática, a caracterização microbiológica das estirpes isoladas revelou a presença de bacilos Gram-negativos com elevado potencial patogênico e resistência antimicrobiana. A identificação recorrente de *Chromobacterium violaceum* e outros microrganismos oportunistas como *Burkholderia cepacia* e *Ochrobactrum anthropi* reforça a necessidade de uma vigilância contínua da qualidade microbiológica da água, especialmente em fontes alternativas de abastecimento.

Os resultados obtidos neste estudo evidenciam a presença de microrganismos pigmentados com potencial patogênico significativo em fontes de água não tratada. Das 12 estirpes analisadas, todas apresentaram morfologia de bacilos Gram-negativos, com elevada prevalência de hemólise do tipo β e perfis bioquímicos compatíveis com espécies como *Chromobacterium violaceum*, *Burkholderia cepacia*, *Ochrobactrum anthropi* e *Brevundimonas vesicularis*. Destaca-se a identificação consistente de *C. violaceum* em várias amostras, associada a perfis de resistência antimicrobiana preocupantes, nomeadamente à ceftazidima e ao imipenem.

Estes achados reforçam a urgência de uma vigilância microbiológica ativa em águas de consumo não tratadas, dado o risco real que estas bactérias representam, tanto pela sua capacidade infecciosa como pelo seu potencial multirresistente. A confirmação da presença de espécies oportunistas emergentes, resistentes e com atividade hemolítica, evidencia que fontes de água consideradas alternativas podem servir como reservatórios de infecções de difícil tratamento.

Este trabalho contribui para o preenchimento de lacunas existentes na caracterização destes microrganismos em contexto nacional e realça a importância da utilização de métodos laboratoriais rigorosos como ferramenta essencial na proteção da saúde pública.

Referências bibliográficas

Alisjahbana, B., Debora, J., Susandi, E., & Darmawan, G. (2021). *Chromobacterium violaceum*: a review of an unexpected scourge. *International Journal of General Medicine*, 3259-3270.

Andrighetti-Fröhner, C. R., Antonio, R. V., Creczynski-Pasa, T. B., Barardi, C. R. M., & Simões, C. M. O. (2003). Cytotoxicity and potential antiviral evaluation of violacein produced by *Chromobacterium violaceum*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(6), 843–848. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762003000600023>

Bartholomew, J. W., & Mittwer, T. (1952). The Gram stain. *Bacteriological Reviews*, 16(1), 1–29.

Beveridge, T. J. (2001). Use of the Gram stain in microbiology. *Biotechnic & Histochemistry*, 76(3), 111–118. <https://doi.org/10.3109/10520290109048777>

Dall'Agnol, L. T., Martins, R. N., Vallinoto, A. C. R., & Ribeiro, K. T. S. (2008). Diversity of *Chromobacterium violaceum* isolates from aquatic environments of state of Pará, Brazilian Amazon. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103, 678-682.

Della Rocca, M. T., Merola, F., Durante, A., Panetta, V., Labella, S., Tucci, G., & Greco, R. (2024). Identification of *Brucella* (*Ochrobactrum*) *anthropi* by MALDI-TOF MS from blood: a case report. *Microbiologia Medica*, 39(1).

Christiadi, D., Singer, R. F., & Roberts, D. M. (2018). Successful treatment of PD peritonitis due to *Brevundimonas vesicularis*. *Peritoneal dialysis international : journal of the International Society for Peritoneal Dialysis*, 38(5), 379–381. <https://doi.org/10.3747/pdi.2018.00014>

Conceição Neto, O. C. D. (2013). Complexo Burkholderia cepacia em pacientes com fibrose cística: caracterização das espécies, avaliação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e da diversidade genética.

EUCAST (2025a). EUCAST. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 15.0, 2025-01-01*. EUCAST; 2025. Disponível em: https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/

EUCAST (2025b). EUCAST clinical breakpoints (version 15.0). *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*. Disponível em https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_15.0_Breakpoint_Tables.pdf

EUCAST (2025c). Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion as recommended by EUCAST (version 15.0). *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*. Disponível em https://aurosan.de/images/mediathek/servicematerial/EUCAST_RefStaemme_Sollw_erte.pdf

Forstinus, N. O., Ikechukwu, N. E., Emenike, M. P., & Christiana, A. O. (2016). Water and waterborne diseases: A review. *International Journal of Tropical Diseases and Health*, 12(4), 1-14.

Gomez, S. A., Sanz, M. B., Rapoport, M., Sucin, G., Corallo, T. A., Poklepovich, T., Campos, J., Ceriana, P., de Mendieta, J. M., Prieto, M., Pasteran, F., & Corso, A. (2023). novel metallo- β -Lactamase *bla_{CVI-1}* Isolated from a *Chromobacterium violaceum* clinical Strain Resistant to Colistin. *Pathogens*, 12(7), 961. <https://doi.org/10.3390/pathogens12070961>

Gregersen, T. (1978). Rapid method for distinction of Gram-negative from Gram-positive bacteria. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 5(2), 123–127. <https://doi.org/10.1007/BF00498806>

Kristanti, R. A., Hadibarata, T., Syafrudin, M., Yilmaz, M., & Abdullah, S. (2022). Microbiological contaminants in drinking water: Current status and challenges. *Water, Air, & Soil Pollution*, 233(8), 299.

MacFaddin, J. F. (2000). *Biochemical tests for identification of medical bacteria* (3rd ed.). Lippincott Williams & Wilkins.

Magana-Arachchi, D. N., & Wanigatunge, R. P. (2020). Ubiquitous waterborne pathogens. In *Waterborne pathogens* (pp. 15-42). Butterworth-Heinemann.

Smibert, R. M., & Krieg, N. R. (1994). Phenotypic characterization. In P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood & N. R. Krieg (Eds.), *Methods for general and molecular bacteriology* (pp. 607–654). American Society for Microbiology.

Some, S., Mondal, R., Mitra, D., Jain, D., Verma, D., & Das, S. (2021). Microbial pollution of water with special reference to coliform bacteria and their nexus with environment. *Energy Nexus*, 1, 100008

Ryan, M.P. & Pembroke, J.T. (2018). *Brevundimonas spp.: Emerging global opportunistic pathogens*.

Ryan, M.P. & Pembroke, J.T. (2020). *Ochrobactrum anthropi: genomic insights into a versatile opportunistic pathogen*.

Tavares, M. et al. (2020). *Burkholderia cepacia complex bacteria: A feared contamination risk in water-based pharmaceutical products*.

WHO (2015). Water safety and quality. *World Health Organization*. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/drinking-water>

Yang, C. H., & Li, Y. H. (2011). *Chromobacterium violaceum* infection: a clinical review of an important but neglected infection. *Journal of the Chinese Medical Association : JCMA*, 74(10), 435–441. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2011.08.013>

Zhang, C. C., Hsu, H. J., & Li, C. M. (2012). *Brevundimonas vesicularis* bacteremia resistant to trimethoprim-sulfamethoxazole and ceftazidime in a tertiary hospital in southern

Taiwan. *Journal of microbiology, immunology, and infection* = *Wei mian yu gan ran za zhi*, 45(6), 448–452. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2012.01.010>