

# **SOBREVIVÊNCIA DE *Staphylococcus aureus* E *Pseudomonasaeruginosa* AO PROTOZOÁRIO DE VIDA LIVRE *Paramecium caudatum* Ehrenberg, 1833**

Davi do Carmo da Silva<sup>1</sup>

Paulo Tadeu Silva Costa<sup>2</sup>

Juan Carlos Rossi Alva<sup>3</sup>

## **RESUMO**

O objetivo deste estudo foi verificar se as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonasaeruginosa* conseguem sobreviver ao processo de digestão do protozoário *Paramecium caudatum*. Para a realização do estudo foi feito um cultivo desse protozoário *in vitro*. Após o cultivo foram realizados testes de resistência do protozoário e confirmação da sensibilidade bacteriana aos antibióticos Cloranfenicol e Ciprofloxacina. Para a avaliação da sobrevivência foram colocados, em amostras, o protozoário, bactérias e os antibióticos para eliminação das bactérias extracelulares. Os testes de sensibilidade dos protozoários mostraram que os mesmos possuem resistência aos antibióticos Cloranfenicol e Ciprofloxacina sendo explicados pela ação em estruturas celulares presentes nas bactérias e ausentes nos protozoários. Os resultados das análises da interação entre bactérias e protozoários mostraram que as bactérias *P. aeruginosa* e *S. aureus* sobreviveram ao processo de fagocitose do *P. caudatum* visto que houve crescimento bacteriano, de todas as amostras, após a lise do protozoário. O estudo indica uma possível relação de reservatório propiciada pelo protozoário para as bactérias. É de grande importância analisar essas relações, pois a resistência ao processo de digestão dos protozoários seria pré-requisito para o aumento da patogenicidade de bactérias selecionadas ao longo da evolução devido à capacidade de sobreviver no ambiente.

**Palavras-chave:** Patógenos. Interações. Protozoários

## **1. INTRODUÇÃO**

Os artigos devem ser apresentados com extensão mínima de 8 e máxima de 15 páginas, incluindo referências, sendo que o tamanho do arquivo não pode ultrapassar 10MB (dez megabytes). Utilizar a fonte Arial, tamanho 12, alinhamento justificado, espaçamento 1,5 linhas, recuo especial de parágrafo de 1,25 cm

<sup>1</sup> Graduando em Ciências Biológicas da Universidade Católica do Salvador - UCSAL

<sup>2</sup> Professor-pesquisador, Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS e Universidade Católica do Salvador - UCSAL, juan.alva@ucsal.br

<sup>3</sup> Professor-pesquisador, Líder do Núcleo de Estudos em Biotecnologia e Conversação – NEBIC, Universidade Católica do Salvador - UCSAL, juan.rossi@ucsal.br

(conforme este modelo). As margens e formato da folha já foram definidos no arquivo padrão (superior e esquerda - 3 cm; inferior e direita - 2 cm). É essencial conter introdução, metodologia e conclusão ou considerações finais nos artigos.

Em ambientes aquáticos, a comunidade microbiana é composta por diversos microrganismos, como bactérias e protistas, que apresentam importantes papéis ecológicos dentro do ecossistema (ROSSELÓ-MORA & AMANN, 2001). Porém, em ambientes que ocorra alteração na qualidade da água proveniente de despejo de esgoto doméstico ou hospitalar, essa comunidade pode sofrer alterações, ocorrendo à proliferação de bactérias patogênicas à saúde humana (SPERLING, 2005; LIMA, 2008).

Dentre essas bactérias patogênicas, a *Pseudomonas aeruginosa* é considerada um dos principais patógenos transmitidos pela água sendo um bacilo gram-negativo, aeróbico e não formador de esporos (SANTOS; COLOMBO, 2015) e a *Staphylococcus aureus* que possui um formato esférico, do grupo dos cocos gram-positivos freqüentemente encontrada na pele e nas fossas nasais de pessoas saudáveis (CASSETTARI et al., 2005), sendo, também, encontrada em corpos hídricos (LEE et al., 2006).

Na comunidade protista, o *Paramecium caudatum* EHRENBERG (1833) é uma das espécies amplamente distribuída e estudada (STORER et al., 2002) em que possui um corpo cilíndrico, em forma de “chinelo”, sendo a extremidade anterior arredondada e a posterior pontiaguda (BHAMARE et al., 2012). Alimentam-se de matéria orgânica e são os principais consumidores de bactérias em corpos hídricos, atuando como ligação entre produtores secundários e produção bacteriana, além de controlar as taxas de mortalidade das bactérias, fator que causa impactos sobre a produção e biomassa, proporcionando mudanças morfológicas, estruturais, taxonômicas e fisiológicas na comunidade bacteriana (JURGENS, 2000).

Entretanto, bactérias intracelulares em processos de adaptações ao meio, desenvolveram a capacidade de utilizar protozoários para a sua sobrevivência (AKYA; POINTON; THOMAS, 2010). Diversas bactérias possuem a necessidade de se associar com protozoários para sobreviverem fora de hospedeiros (TEZCAN-MERDOL et al. 2004), algumas tornaram-se endossimbiontes obrigatórios (WINIECKA-KRUSNELL; LINDER, 2001). O papel dos protozoários nas interações

com bactérias patogênicas pode ser de reservatório e “Cavalo de Troia”, podendo aumentar os fatores de virulência, adaptação a macrófagos e transmissão (TORTORA; FUNKE; CASE 2005). Estes protozoários possuem papéis fundamentais na sobrevivência e multiplicação de bactérias patogênicas, pois, alguns desses microrganismos conseguem sobreviver ao sistema de digestão e escapar do fagossomo, persistindo e multiplicando-se dentro do protozoário (GÖRTZ, 2006).

Desta forma, o objetivo desse estudo foi verificar se as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* conseguem sobreviver ao processo de digestão do protozoário *Paramecium caudatum*.

## **2. DESENVOLVIMENTO E APRESENTAÇÃO DE RESULTADOS**

### **2.1 METODOLOGIA**

#### **2.1.1 Coleta de água bruta para obtenção de cepas de *P. Caudatum***

A amostra de água bruta foi coletada na Lagoa de Abaeté (12°56'42.36"S 38°21'25.85"W) localizada na cidade de Salvador - Bahia. A amostragem foi feita em frasco de plástico de 500 ml estéreis, a 30 cm da superfície da água e transportada para o Laboratório de Estudos em Meio Ambiente – LEMA, da Universidade Católica do Salvador – UCSAL, acondicionadas em recipiente isotérmico com gelo. Os métodos para a coleta e transporte das amostras foram baseados nos recomendados e adotados no Manual Prático de Análises de Águas da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA, 2006).

#### **2.1.2 Estabelecimento da cultura pura de *P. Caudatum***

##### **2.1.2.1 Isolamento das cepas**

A amostra bruta (10ml) foi inicialmente centrifugada à 700 rpm durante 3 minutos e descartado o sobrenadante. Após a centrifugação foi retirado 200µL da cultura e colocado em uma lâmina para verificação dos protozoários através de um microscópio (aumento de 10x). Confirmando a presença dos protozoários, utilizando o método diluições em gota, adaptado de Glaser e Coria (1930), através de um tubo

capilar hematócrito, foi transferido uma alíquota para outra lâmina contendo 100µL de água esterilizada.

Repetiram-se as etapas descritas acima até que cepas de *Paramecium caudatum* fossem totalmente isoladas. A identificação em nível de espécie foi realizada com base nas características morfológicas de acordo com Bhamare et al. (2012).

### **2.1.2.2 Manutenção da cultura pura**

Os protozoários isolados foram transferidos para um recipiente com 500ml contendo a água mineral da marca Minalba® (Composição: cálcio 17,14 mgL<sup>-1</sup>, Magnésio 9,83 mgL<sup>-1</sup>, Sódio 1,10 mgL<sup>-1</sup>, Cloreto 0,13 mgL<sup>-1</sup>, Nitrato 0,8 mgL<sup>-1</sup>, Sulfato 0,2 mgL<sup>-1</sup>, Bicarbonato 105,15 mgL<sup>-1</sup>, Fluoreto 0,05 mgL<sup>-1</sup>, Bário 0,024 mgL<sup>-1</sup> e Estrôncio 0,020 mgL<sup>-1</sup>) já utilizada por Alves (2010) no cultivo de *P. caudatum* em temperatura de 27°C, acondicionados em estufas sem agitação e iluminação. A manutenção da cultura foi realizada semanalmente. A troca de uma parte da água era feita retirando o sobrenadante da cultura na centrífuga (500 rpm durante 5 minutos) e adicionando água mineral estéril. A alimentação era feita utilizando alface previamente esterilizada com uma diluição de hipoclorito (1%).

### **2.1.2.3 Cultura e manutenção bacteriana**

As bactérias utilizadas para a interação com os protozoários foram da família Micrococcaceae e Pseudomonadaceae, sendo as espécies *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Pseudomonasaeruginosa* (ATCC 27853). Os meios de cultura foram preparados sendo realizado teste de esterilidade posteriormente. As cepas foram transferidas com alça de platina das placas de cultura referência para placas de petri contendo o Meio Ágar Triptona de Soja (TSA). Após a inoculação foram incubados em estufa a 36°C por 24 horas e posteriormente verificado a sua viabilidade. A manutenção das cepas foi realizada de forma quinzenal, utilizando o Meio TSA e armazenado em condições 8°C.

### **2.1.3 Antibiograma**

Para avaliação da sensibilidade das bactérias foram inseridos 10 mL de água mineral em tubos de ensaio. Em cada tubo foram inoculados colônias de *S. aureus* e

*P. aeruginosa* levando como padrão 0,5 da escala de McFarland. Posteriormente, foram colocados 500µL da solução bacteriana em cada microtubo contendo 500µL de água mineral estéril com a adição de discos antibióticos, totalizando 10 eppendorfs para cada bactéria. Para *S. aureus* foi adicionado o antibiótico Cloranfenicol (30µg/mL) e para *P. aeruginosa* Ciprofloxacina (5µg/mL). Foram colocados em estufa a 37°C durante 24h e posteriormente, com a utilização de um Swab, as soluções foram inoculadas em Meio Ágar Chocolate para a observação da sobrevivência bacteriana. Da cultura estoque de protozoários, foram transferidos 10mL para tubos de centrifuga. Os tubos foram centrifugados à 700rpm por 5 minutos, descartando-se o sobrenadante. Foi adicionado 10mL de água mineral estéril aos tubos e novamente estes foram centrifugados. Depois a amostra foi transferida uma alíquota para lâminas e, através do método de diluição em gota adaptado de Glaser e Coria (1930) foram capturados 5 protozoários sendo transferidos para cada microtubo. Cada microtubo continha 500µL de água mineral estéril, em que foram adicionados discos dos antibióticos cloranfenicol e ciprofloxacina totalizando 10 microtubos para cada antibiótico. As culturas foram avaliadas após 24h e sendo verificada a viabilidade das mesmas quanto ao número de indivíduos e motilidade, sendo classificados, de acordo com o número de organismos vivos, em sensível (<3) intermediário (3) e resistente (>3).

#### **2.1.4 Interação bactéria-protozoário**

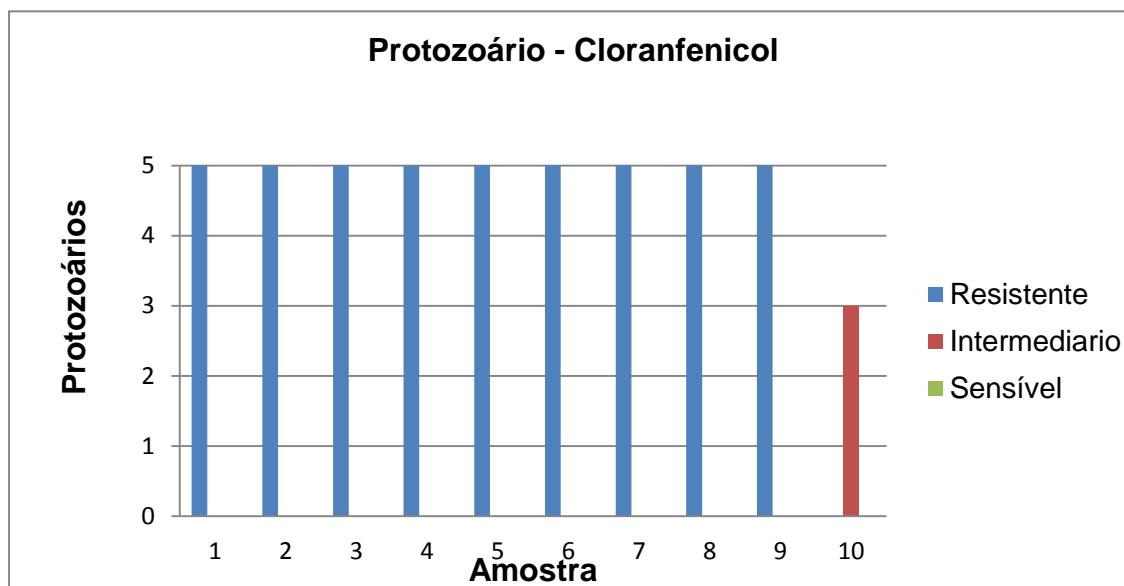
Foi realizada a transferência de 500µL da cultura estoque, utilizando micropipetador, para 30 microtubos. Os microtubos foram centrifugados durante 5 min à 700 rpm, retirada 150µL do sobrenadante e adicionado 150µL de água mineral estéril, com repetição de duas vezes para melhor retirada dos nutrientes. Após a retirada da centrifuga foram levados ao microscópio para análise da sobrevivência dos protozoários. Obtendo a confirmação da viabilidade dos protozoários foram inoculados 500µL da diluição bacteriana (0,5 da escala de McFarland), sendo 15 microtubos com a diluição da bactéria *S. aureus* e 15 com a *P. aeruginosa*. Após 4 horas foram adicionados um disco de antibiótico em cada microtubo. Para as amostras com *S. aureus* o antibiótico Cloranfenicol e para amostras com *P. aeruginosa* a Ciprofloxacina, seguindo-se em repouso durante 24 horas em

temperatura de 27°C. Finalizando o repouso, as amostras foram colocadas em lâminas e observadas no microscópio. Os protozoários encontrados foram transferidos, através de tubo hematócrito, para novos microtubos contendo 1 mL de água mineral estéril. Para cada amostra foi retirada 330µL no primeiro e sétimo dia. Em cada dia, a fim de provocar a lise celular e extravasar o conteúdo intracelular, foram adicionadas nas amostras 250 µL de solução salina a 0,9% sendo, consecutivamente, centrifugadas em 1000 rpm durante 1 minuto. Posteriormente as amostras foram inoculadas, inicialmente, em meio Ágar Chocolate e posteriormente nos meios Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI), Ágar Lisina Ferro (LIA), Ágar Cetramida, Ágar úreia e Ágar Sim Medium e realizadas a coloração de Gram, Teste de Oxidase, Coagulase e Catalase para a identificação das bactérias.

## 2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

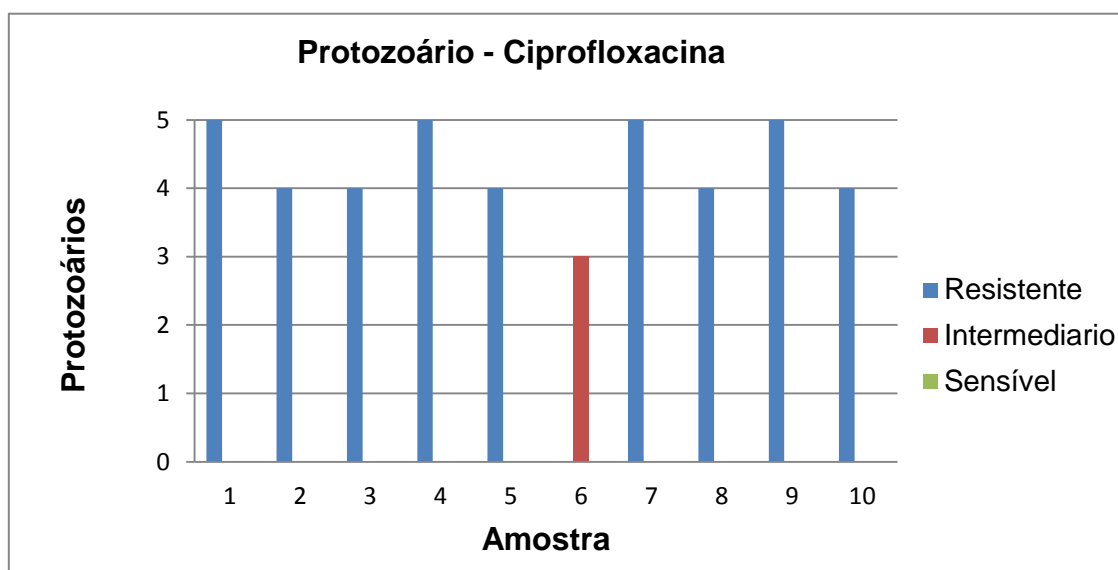
As análises de sensibilidade dos protozoários mostraram que os organismos apresentaram resistência aos antibióticos, sendo que as maiorias das amostras se apresentaram dentro da classificação de resistência (Figuras 1 e 2). Essa resistência pode ser explicada pela ação dos antibióticos nas estruturas celulares presentes nas bactérias (MADIGAN et al., 2010; PAPICH, 2003) e ausentes nos protozoários. A ciprofloxacina interfere na DNA girase bacteriana, evitando o superenovelamento do DNA (APPELBAUM; HUNTER, 2000; KONEMAN et al., 2001; MADIGAN et al., 2010).

Figura 1 – Gráfico de resistência dos protozoários ao antibiótico Cloranfenicol



O cloranfenicol é um bacteriostático que inibe a síntese proteica microbiana (CARVALHO, 2002) impedindo a ligação do RNA-mensageiro ao ribossomo, por se ligar na fração 30S, porém sua ação mais importante se encontra na ligação da parte 50S do ribossomo. Este antimicrobiano tem pouca afinidade pelo ribossomo de células eucariotas o que explica a sua seleção sobre as bactérias (TAVARES, 2001; PAPICH & REVIERE, 2003).

Figura 2 – Gráfico de resistência dos protozoários ao antibiótico Ciprofloxacina



A avaliação da sensibilidade das bactérias aos antibióticos foi confirmatória, mostrando a sensibilidade da *S. aureus* ao cloranfenicol (COSTA et al, 2013; LOPES et al., 2017; SOUZA et al., 2017) e da *P. aeruginosa* ao antibiótico ciprofloxacina (FIGUEREIDO et al., 2007; FERREIRA et al., 2014; KOLPEN et al., 2017). Contudo, é indicado estar monitorando com frequência a sensibilidade da *P. aeruginosa* a este fármaco, pois algumas cepas se mostram resistentes (RATH, DAS & PHADY, 2017). O uso de antibiótico para estudos com protozoários, visando à eliminação de bactérias extracelulares, é bastante aplicado. Dohra e Fujishima (1999) utilizaram o cloranfenicol para a avaliação da bactéria parasita obrigatório *Holospira obtusa* do protozoário *P. caudatum* no qual se mostrou resistente. O uso da gentamicina foi observado na maioria dos estudos. Siddiqui et al. (2017) mostraram a eficiência deste fármaco contra as bactérias *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus pyogenese* resistência da *Acanthamoeba castellanii*. Akya, Pointon & Thomas (2009) verificaram a sensibilidade da *Listeria monocytogenese* resistência da *Acanthamoeba polyphaga*. A sensibilidade da *Salmonella entérica* e resistência da *Acanthamoeba rhysoedes* foram observadas por Tezcan-Merdol et al. (2004).

Os resultados das análises da interação bactérias e protozoários mostraram que as bactérias *P. aeruginosa* e *S. aureus* sobreviveram ao processo de fagocitose do *P. caudatum* visto que houve crescimento bacteriano de todas as amostras após a lise dos protozoários, sendo confirmada a presença das duas espécies através de meios de cultura e testes bioquímicos (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1 – Resultados dos testes para confirmação da *Staphylococcus aureus*

| Bactéria         | Coloração de Gram             | Coagulase | Urease | Catalase | Oxidase | TSI |
|------------------|-------------------------------|-----------|--------|----------|---------|-----|
| <i>S. aureus</i> | Gram-positivo; estafilococos. | +         | +      | +        | -       | A/A |



Tabela 2 – Resultados dos testes para confirmação da *Pseudomonas aeruginosa*

| Bactéria             | Coloração de Gram              | Oxidase | Motilidade | Lisina | TSI | Ágar                 |        |
|----------------------|--------------------------------|---------|------------|--------|-----|----------------------|--------|
|                      |                                |         |            |        |     | Cetramida 42°C       | Urease |
| <i>P. aeruginosa</i> | Gram-negativo; bacilo isolado. | +       | +          | -      | K/K | Colônias esverdeadas | +      |

Este estudo indica uma possível relação de reservatório prestado pelo protozoário tendo em vista a permanência das bactérias dentro do mesmo após 24h, sendo o ciclo digestivo do *P. caudatum* de 1h (FOK, LEE & ALLEN, 1982), e a constatação de bactérias nas amostras pós análise. Entretanto são necessários estudos estabelecendo parâmetros para análise da multiplicação desses patógenos dentro do protozoário.

Os fatores que permitiram a sobrevivência das bactérias ao processo digestivo ainda são desconhecidos. Brandl et al. (2005), indicam que essa capacidade não esteja relacionada com composição da parede celular visto que houve crescimento das bactérias de diferentes composições, sendo essa informação corroborado com os resultados deste estudo, já que a *P. aeruginosa* é um bacilo Gram-negativo (HERREIRA et al., 2014) e a *S. aureus* é um coco Gram-positivo (SANTOS et al., 2007). Entretanto, como a *Salmonella entérica*, essas bactérias podem possuir a capacidade de alterar, através de vários genes, os eventos normais relacionados a digestão dentro do vacúolo alimentar, como a fusão com o lisossoma, possibilitando sua resistência (BRANDL et al., 2005).

Diversos estudos indicam o *P. caudatum* como reservatório de bactérias. Watanabe et al. (2016) mostraram que esse protozoário serve como hospedeiro natural da bactéria *Legionella pneumophilaem* que se promove uma relação endossimbionte. Peterson et al., (2013) demonstraram, pela primeira vez, que este protozoário pode ser um vetor de transmissão das bactérias *Mycobacterium marinum* e *Mycobacterium chelonae*, aumentando a transmissão dessas bactérias em peixes *Daniorerio*. Além de que, este protozoário pode ser parasitado por bactérias do gênero *Holospira* (*H. undulata*, *H. caryophilaand* *H. obtusa*) (DUNCAN

et al., 2018). Além desse ciliado, protozoários amebózoa do gênero *Acanthamoeba*, são os mais utilizados como reservatório de bactérias patogênicas. Leviene et al. (2010) e Calvo et al. (2013) mostraram que *P. aeruginosa* possui a capacidade de resistir ao processo de fagocitose desse protozoário, servindo como reservatório. Bactérias das famílias Legionellaceae, Parachlamydiaceae e Mycobacteriaceae também utilizam este protozoário como hospedeiro (GREUB & RAOULT, 2004).

Contudo, as relações protozoários com bactérias vão além das relações de hospedeiro–reservatório. Cirillo et al. (1997) estudaram uma via chamada “Cavalo de Tróia” em que avaliou características associadas à virulência, in vitro e in vivo, através da infecção de ratos com o protozoário contendo a *Mycobacterium avium* demonstrando um aumento na capacidade da bactéria em colonizar o intestino, fígado e baço. Já foi demonstrado o papel dos protozoários de vida livre na manutenção da virulência de *L. pneumophila* no ambiente (CIRILLO et al. 1999). Quando cultivada associando a amebas de vida livre, este patógeno provou ser mais invasivo a macrófagos e outros tipos celulares, além de apresentar maior virulência em animais infectados (WINIECKA-KRUSNELL; LINDER, 2001). Índícios demonstram que a resistência ao processo de digestão por protozoários predadores seria pré-requisito para a patogenicidade de bactérias selecionadas ao longo da evolução devido à capacidade de sobreviver no ambiente (BARKER; BROWN, 1994).

### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora os protozoários de vida livre representem importantes predadores bacterianos, algumas bactérias, ao longo da evolução, se tornaram resistentes ao processo de fagocitose podendo sobreviver e utilizar esses microrganismos como reservatórios para a sua proteção no ambiente natural. Este estudo indica uma possível resistência dos protozoários aos antibióticos cloranfenicol e ciprofloxacina e a sobrevivência das bactérias *S. aureus* e *P. aeruginosa* ao processo digestivo do protozoário *P. caudatum*. Como bactérias de importância médica, é de grande relevância determinar essas interações sendo que, alguns protozoários, permitem sobrevivência, replicação e distribuição de espécies de bactérias patogênicas no

ambiente natural, visto que a sobrevivência nesse hospedeiro pode indicar um potencial reservatório podendo aumentar a sua capacidade de virulência e/ou enganar as primeiras barreiras imunológicas humanas. Os resultados deste estudo podem indicar novos caminhos para compreender as interações protozoários de vida livre com bactérias, visto que essa sobrevivência tem implicações para a ecologia destes patógenos humano que vai além da relação trófica característica da interação predador-presa, dado que este processo promove mecanismos de adaptação e de defesa de bactérias patogênicas do homem.

## AGRADECIMENTOS

Os nossos agradecimentos à Prof<sup>a</sup>. M.Sc. Edvana dos Santos Ferreira pelo fornecimento das cepas bacterianas e material bibliográfico, á CNPq pela bolsa de iniciação científica e a UCSAL pelos materiais, equipamentos e reagentes fornecidos.

## REFERÊNCIAS

AKYA, A.; A. POINTON; C. THOMAS. *Listeria monocytogenes* does not survive ingestion by *Acanthamoebapolyphaga*. **Microbiology (Reading, England)**, v. 156, n. 3, p. 809-818, mar. 2010.

ALVES, H. Cr. **Estudo biológico de linhagens do protozoário ciliado *Paramecium Caudatum* Ehrenberg, 1833 e avaliação experimental do efeito tóxico do agrotóxico Fipronil**. 2010. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de São Carlos, 2011.

APICH, M. G.; J. E. RIVIERE. Cloranfenicol e Derivados. In: ADAMS H. R. **Farmacologia e Terapêutica em Veterinária**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 1034p.

APPELBAUM, P. C.; P. A. HUNTER. The fluoroquinoloneantibacterials: past, present and future perspectives. **International journal of antimicrobial agents**, 16(1), 5-15, 2000.

BARKER, J.; M. R. W. BROWN. Trojan Horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environmental. **Microbiology**, v. 140, p. 1253- 1259, jun. 1994.

BHAMARE, S. N.; S. V. NIKAM; B. N. JADHAY; L. B. DAMA. Morphological study of *Paramecium Caudatum* from fresh waters of nashik district of Maharashtra, India. **DAMA International**. All rights reserved. Vol. 1 No. 2, 2012.

BRANDL, M. T.; B. M. ROSENTHAL; A. F. HAXO; S. G. BERK. Enhanced survival of *Salmonella enterica* in vesicles released by a Soilborne *Tetrahymena* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 3, p. 1562-1569, mar. 2005.

CALVO, L.; I. GREGORIO; A. GARCÍA; M. T. FERNÁNDEZ; P. GOÑIL; A. CLAVE; M. L. PELEATO; M. F. FILLAT. A new pentaplex-nested PCR to detect five pathogenic bacteria in free living amoebae. **Water Res.** 2013;47:493-502, 2013.

CARVALHO, F.L.Q. Lincosamidas, tetraciclina e cloranfenicol. **Farmacologia**, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 6 ed, p. 1050-1057, 2002.

CASSETTARI, V. C.; STRABELLI, T.; MEDEIROS, E. A. S. *Staphylococcus aureus* bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality? **Braz J Infect Dis**, v. 9, n. 1, p. 70-6, 2005.

CIRILLO, J. D.; S. FALKOW; L. S. TOMPKINS; L. E. BERMUDEZ. Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 9, p. 3759-3767, set. 1997.

CIRILLO, J. D.; S. L. CIRILLO; L. YAN; FALKOW; L. S. TOMPKINS; L. E. BERMUDEZ. Intracellular growth in *Acanthamoeba castellanii* affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of *Legionella pneumophila*. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 9, p. 4427-4434, set. 1999.

COSTA, G. M. D.; R.A. BARROS; D. A. D. C. CUSTÓDIO; U. D. P. PEREIRA; D. J. FIGUEIREDO; N. D. SILVA. Antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from mastitis in dairy herds from the state of Minas Gerais, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 80, n. 3, p. 297-302, 2013.

DOHRA, H.; M. FUJISHIMA. Effects of antibiotics on the early infection process of a macronucleated symbiotic bacterium *Holospora obtusa* of *Paramecium caudatum*. **FEMS microbiology letters**, 179(2), 473-477, 1999.

DUNCAN, A. B.; E. DUSI; M. SCHRALLHAMMER; T. BERENDONK; O. KALTZ. Population-level dynamics in experimental mixed infections: evidence for competitive exclusion among bacterial parasites of *Paramecium caudatum*. **Oikos**, 127: 1380-1389, 2018.

FERREIRA, H.; L. B. GARCIA; F. E. CARRARA-MARRONE; M. C. B. TOGNIN; C. L. CARDOSO. Susceptibilidade de amostras clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* a antibióticos e a Clorexidina. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, 4(4), 243-248, 2014.

FOK, A. K.; Y. LEE; R. D. ALLEN. The Correlation of Digestive Vacuole pH and Size with the Digestive Cycle in *Paramecium caudatum* 1. **The Journal of Protozoology**, 29(3), 409-414, 1982.

GLASER, R. W.; N. A. CORIA. Methods for the pure culture of certain Protozoa. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 51, n. 5, p. 787-806, fev. 1930.

GÖRTZ, H. **Symbiotic associations between ciliates and prokaryotes**. The prokaryotes, v. 1, p. 364-402, 2006.

GREUB, G.; D. RAOULT. Microorganisms resistant to free-living amoebae. **Clinical microbiology reviews**, 17(2), 413-433, 2004.

JURGENS, K.; E. JEPPESEN. **The impact of metazooplankton on the structure of the microbial food web in a shallow, hypertrophic lake.** J. Plankton Res. 22:1047–1070, 2000.

KOLPEN, M.; C. J. LERCHE; K. N. KRAGH; T. SAMS; K. KOREN; A. S. JENSEN; L. M. KÜH. Hyperbaric oxygen sensitizes anoxic *Pseudomonas aeruginosa* biofilm to ciprofloxacin. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, AAC-01024, 2017.

KONEMAN, E.W.; S. D. ALLEN; W.M. JANDA; P.C. SCHRECKENBERGER; W.C. WINN Jr. **Diagnóstico Microbiológico.** 5.ed., Rio de Janeiro: MEDSI, 2001. 1465p.

LOVIENE, A; D. R. LEDEE; D. MILLER; E. C. ALFONSO. Detection of bacterial endosymbionts in clinical *Acanthamoeba* isolates. **Ophthalmology.** 2010;17:445-52, 2010.

MADIGAN, M. T. J. M. MARTINKO; P. V. DUNLAP; D. P. CLARK. **Microbiologia de Brock.** 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 1128 p, 2010.

PETERSON, T. S.; J. A. FERGUSON; V. G. WATRALL; K. N. MUTOJI; D. G. ENNIS; M. L. KENT. *Paramecium caudatum* enhances transmission and infectivity of *Mycobacterium marinum* and *M. chelonae* in zebrafish *Danio rerio*. **Diseases of aquatic organisms**, 106(3), 229-239, 2013.

RATH, S.; S.R. DAS; R.N. PADHY. Surveillance of bacteria *Pseudomonas aeruginosa* and MRSA associated with chronic suppurative otitis media. **Braz J Otorhinolaryngol.** 2017;83:2016, 2017.

RUPPERT, E. E.; R. S. FOX; R. D. BARNES. **Zoologia dos invertebrados: Uma Abordagem Funcional-evolutiva.** 7 ed. São Paulo: Roca, 2005. xxii, 1145 p.

SANTOS, G.; T. E. COLOMBO. Prevalência de *Pseudomonas aeruginosa* em águas e superfície. **J Health Sci Inst.** 33(4):314-8, 2015.

SIDDIQUI, R.; T. Y. Y. ONG; S. Y. JUNG; N. A. KHAN. *Acanthamoeba castellanii* interactions with *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes*. **Experimental parasitology**, 183, 128-132, 2017.

STORER, T. I.; R. L. USINGE. **Zoologia geral.** 6. ed., rev. aum. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2002. 816 p. 2002.

TAVARES, W. Resistência bacteriana. In: **Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos** 3<sup>a</sup> ed. Atheneu, São Paulo. p. 79, 2001.

TEZCAN-MERDOL, D.; M. LJUNGSTRÖM; J. WINIECKA-KRUSNELL; E. LINDER; L. ENGSTRAND; M. RHEN. Uptake and Replication of *Salmonella enterica* in *Acanthamoeba barhysodes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 6, p. 3706-3714, jun. 2004.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia.** 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 827 p., 2005.



WATANABE, K.; R. NAKAO; M. FUJISHIMA; M. TACHIBANA; T. SHIMIZU; M. WATARAI. Ciliate *Paramecium* is a natural reservoir of *Legionella pneumophila*. **Scientific Reports**, 6, 24322, 2016.

WINIECKA-KRUSNELL, J.; E. LINDER. **Bacterial infections of free-living amoebae**. *Research in Microbiology*, v. 152, n. 7, p. 613-619, set. 2001.