

UNIVERSIDADE SAGRADO CORAÇÃO

JULIANA GONÇALVES PIRES

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE MICRO-
ORGANISMOS NOS RESERVATÓRIOS DE ÁGUA DE
EQUIPOS ODONTOLÓGICOS DA FOB-USP.
EFICÁCIA DO ULTRASSOM NA REMOÇÃO DO
BIOFILME**

Bauru
2011

JULIANA GONÇALVES PIRES

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE MICRO-
ORGANISMOS NOS RESERVATÓRIOS DE ÁGUA DE
EQUIPOS ODONTOLÓGICOS DA FOB-USP.
EFICÁCIA DO ULTRASSOM NA REMOÇÃO DO
BIOFILME**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Centro de Ciências da
Saúde como parte dos requisitos para
obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas, sob orientação do
Prof. Me. Geraldo Marco Rosa Júnior

Bauru
2011

P667a	<p>Pires, Juliana Gonçalves</p> <p>Avaliação da presença de micro-organismos nos reservatórios de água de equipos odontológicos da FOB-USP: eficácia do ultrassom na remoção do biofilme / Juliana Gonçalves Pires -- 2011. 53f.: il.</p> <p>Orientador: Prof. Me. Geraldo Marco Rosa Júnior Co-orientador: Prof. Dr. Sergio A. Torres</p> <p>Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Sagrado Coração – Bauru – SP.</p> <p>1. Biofilme. 2. Ultrassom. 3. Desinfecção. I. Rosa Júnior, Geraldo Marco. II. Torres, Sergio A. III. Título.</p>
-------	--

JULIANA GONÇALVES PIRES

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE MICRO-ORGANISMOS NOS
RESERVATÓRIOS DE ÁGUA DE EQUIPOS ODONTOLÓGICOS DA
FOB-USP. EFICÁCIA DO ULTRASSOM NA REMOÇÃO DO BIOFILME**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO APRESENTADO AO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE COMO PARTE DOS REQUISITOS PARA OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE BACHAREL EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS SOB ORIENTAÇÃO DO
PROF. ME. GERALDO MARCO ROSA JÚNIOR

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Me. Geraldo Marco Rosa Júnior
Universidade Sagrado Coração

Prof. Dr. Sergio A. Torres
Faculdade de Odontologia de Bauru

Biól. Ana Carolina Villas Bôas Weckwerth
Instituto Lauro de Souza Lima

Bauru, 8 de dezembro de 2011

Dedico este trabalho a Deus, meus pais e meu irmão.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter iluminado e colocado pessoas maravilhosas em meu caminho.

A meus pais Rosângela e Moacir, por serem exemplos como pessoas, sempre meus amigos, estando ao meu lado me dando apoio, carinho, conselhos e broncas.

Ao meu irmão Rafael, ser meu companheiro e amigo de todas as horas, por sempre me fazer rir, saiba que tenho orgulho de ser sua irmã.

Aos meus amigos do coração Valéria, Tatiana, Nadya, Melina, Flávia, Fabiane, Paulo, Guilherme, Eduardo e Diego, pelas conversas, apuros passados, trapalhadas, risadas, pelas caronas e por simplesmente serem meus amigos.

Ao Professor Dr. Sergio A. Torres, por confiar em mim, ter dado a oportunidade que deu, pelos conselhos, paciência e ajudar em todos os momentos que precisei.

Ao Lucas e ao André, por serem colaboradores desta pesquisa, por alegrarem meu dia, pois sem vocês essa pesquisa seria muito mais difícil.

A Dalva por ser sempre amável e carinhosa e fazer o possível e o impossível para me ajudar com tudo.

A Ana Carolina Villas Bôas Weckwerth, Heloísa Helena Escudero e Maria Camila Lauris Fayad, por terem me ajudado na identificação dos fungos e terem cedido o setor de Micologia do Instituto Lauro de Souza Lima para me ensinarem com muita paciência, carinho e respeito às técnicas.

A Irmã Elvira por ser atenciosa, pois sem a senhora talvez não estivesse me formando agora.

Ao Professor Me. Geraldo Marco Rosa Júnior por ter aceitado ser meu orientador.

À Professora Dra. Ana Paula Campanelli, e as meninas do Laboratório de Microbiologia da FOB-USP Claudia, Thais, Carine, Hayana e Lívia por terem me recebido de braços abertos.

Ao Professor Dr. Heitor Marques Honório que me ajudou com a estatística da pesquisa.

À FAPESP por ter concedido a minha bolsa de Iniciação Científica

E a todos que colaboraram direta e indiretamente neste trabalho.

“Sorria bonito e deixe os outros
quererem descobrir qual é o segredo
que faz você rir.”
(Dan Brown)

RESUMO

A presença do biofilme nos reservatórios de água dos equipos odontológicos é um fator de risco de infecção. Quantificar bactérias e fungos nos reservatórios do Laboratório de Dentística, Endodontia e Materiais Dentários da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP (FOB-USP) e avaliar a eficácia do ultrassom foram nossa meta. Foram analisados 25 reservatórios, sendo alíquotas de 25µl semeadas em placa de Petri contendo os meios de cultura: R2A, Plate Count Agar (PCA), Peptona Diluída (PD) e Sabouraud com Cloranfenicol 1% (Sb). Após descartar a água, 1 litro de água destilada estéril foi adicionado e, submetidos à ação do ultrassom por 15 minutos. O mesmo procedimento, descrito anteriormente foi realizado e as placas de R2A, PCA e PD foram incubadas a 24°C por 72h e de Sb por 4 a 7 dias. Foi detectada a desestruturação do biofilme depois da ação do ultrassom de 29,50%, 16,56% e 35,63% para o R2A, PCA e PD respectivamente, para os fungos a desestruturação foi de 51,44%. Foram encontrados 6 espécies de bactérias e 6 gêneros de fungos. Concluímos que a ação do ultrassom foi efetiva na desestruturação do biofilme independente dos meios de cultura utilizados.

PALAVRAS-CHAVE: Biofilmes, ultrassom e desinfecção

ABSTRACT

The presence of biofilm in water reservoirs of the dental units is a risk factor for infection. Quantify bacteria and fungi in the reservoirs of the Dentistry Laboratory , Endodontic and Dental Materials, School of Dentistry of Bauru - USP (FOB-USP) and evaluate the effectiveness of ultrasound were our goals. Rated 25 water reservoirs, 25µl aliquots of the samples were sown in Petri dishes containing culture media: R2A, Plate Count Agar (PCA), peptone Diluted (PD) and Sabouraud with Chloramphenicol 1% (Sb). After discarding the water, 1 liter of sterile distilled water was added, and subjected to the action of ultrasound for 15 minutes. The same procedure described above was performed and the plates of R2A, PCA PD and were incubated at 24 ° C for 72 h and Sb 4 to 7 days. Was detected disruption of the biofilm after the action of ultrasound 29.50%, 16.56% and 35.63% for the R2A, PCA and PD, respectively, for fungi disintegration was 51.44%. We found six species of bacteria and six fungal genera. We conclude that the action of ultrasound was effective in disruption of the biofilm independent of the culture media used.

KEY-WORDS: Biofilms, ultrasound and disinfection

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: SÉRIE BIOQUÍMICA: DA DIREITA PARA A ESQUERDA – LACTOSE, MALTOSE, ESCULINA, NITRATO, CITRATO, MOTILIDADE E UREASE.....	20
FIGURA 2: CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS ANTES (ESQUERDA) E DEPOIS (DIREITA) DA AÇÃO DO ULTRASSOM NO MEIO PCA.....	25
FIGURA 3: UFC/ML NO MEIO R2A EM LOG PRESENTES NOS RESERVATÓRIOS.....	26
FIGURA 4: UFC/ML NO MEIO PD EM LOG PRESENTES NOS RESERVATÓRIOS.....	27
FIGURA 5: UFC/ML NO MEIO PCA EM LOG PRESENTES NOS RESERVATÓRIOS.....	27
FIGURA 6: <i>ACREMONIUM SP.</i>	33
FIGURA 7: VERSO E REVERSO DA COLÔNIA DE <i>ACREMONIUM SP</i>	33
FIGURA 8: <i>CLADOSPORIUM SP.</i>	33
FIGURA 9: VERSO E REVERSO DA COLÔNIA DE <i>CLADOSPORIUM SP.</i>	34
FIGURA 10: <i>FUSARIUM SP.</i>	34
FIGURA 11: COLÔNIA DE <i>FUSARIUM SP.</i>	34
FIGURA 12: <i>PAECILOMYCES SP.</i>	35
FIGURA 13: VERSO E REVERSO DA COLÔNIA DE <i>PAECILOMYCES SP.</i>	35
FIGURA 14: <i>PENICILLIUM SP.</i>	35
FIGURA 15: VERSO E REVERSO DA COLÔNIA DE <i>PENICILLIUM SP.</i>	36
FIGURA 16: VERSO E REVERSO DA COLÔNIA DE <i>PENICILLIUM SP.</i>	36
FIGURA 17: <i>RHINOCLADIELLA SP.</i>	36
FIGURA 18: VERSO E REVERSO DA COLÔNIA DE <i>RHINOCLADIELLA SP.</i>	37

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: MÉDIA DE UFC/ML, ANTES E DEPOIS DA AÇÃO DO ULTRASSOM EM CADA MEIO DE CULTURA E PORCENTAGEM DE DESESTRUTURAÇÃO DO BIOFILME.....	25
TABELA 2: AMOSTRAS IDENTIFICADAS A PARTIR DOS RESERVATÓRIOS ANALISADOS.....	28
TABELA 3: IDENTIFICAÇÃO DAS 51 AMOSTRAS, OBTIDAS DE 13 RESERVATÓRIOS ANALISADOS.....	29
TABELA 4: MÉDIA DE UFC/ML DE ANTES E DEPOIS DA AÇÃO DO ULTRASSOM EM RELAÇÃO AOS FUNGOS.....	30
TABELA 5: IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS EM NÍVEL DE GÊNERO ANTES E APÓS A AÇÃO DO ULTRASSOM.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA - American Dental Association

CDC - Center for Disease Control and Prevention

FOB-USP – Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo

NR – Não Recuperadas

NHC – Não Houve Crescimento

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCA – Plate Count Agar

PD – Peptona Diluída

PEC - Polissacárideos Extracelulares

R - Reservatório

UFC/ml – Unidade Formadoras de Colônias por mililitro

US – Ultrassom

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
3	MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1	COLETA DAS AMOSTRAS.....	16
3.2	CONTAGEM DAS BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS E FUNGOS..	16
3.2.1	R2A AGAR.....	17
3.2.2	PLATE COUNT AGAR (PCA).....	18
3.2.3	PEPTONA DILUÍDA (PD).....	18
3.2.4	AGAR SABOURAUND COM CLORANFENICOL A 1%.....	18
3.3	ESTOCAGEM DAS BACTÉRIAS.....	19
3.4	ESTOCAGEM DOS FUNGOS.....	19
3.5	REATIVAÇÃO DAS AMOSTRAS BACTERIANAS.....	19
3.6	IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA.....	20
3.6.1	CARBOIDRATOS: LACTOSE E MALTOSE.....	21
3.6.2	HIDRÓLISE DA ESCULINA.....	21
3.6.3	NITRATO.....	21
3.6.4	CITRATO DE SIMMONS.....	22
3.6.5	MOTILIDADE.....	22
3.6.6	URÉIA.....	23
3.7	REATIVAÇÃO DOS FUNGOS E MICROCULTIVO.....	23
3.8	IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS.....	23
3.8.1	LACTOFENOL AZUL DE ALGODÃO.....	24
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	24
4	RESULTADOS	25
4.1	DETECÇÃO DE BACTÉRIAS.....	25
4.2	IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA.....	27
4.3	DETECÇÃO DE FUNGOS.....	30
4.4	IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS.....	31
5	DISCUSSÃO	38
6	CONCLUSÃO	42
	REFERÊNCIAS	43

APÊNCICE A.....	48
APÊNCICE B.....	49

1. INTRODUÇÃO

Mesmo com o avanço da tecnologia e a preocupação com as normas de biossegurança, o problema de contaminação microbiana na água dos equipos odontológicos continua existindo (AGUIAR; PINHEIRO, 1999). O equipo odontológico é mantido por um compressor de ar, que é responsável pelo acionamento dos instrumentos de alta rotação, e pela água, que, além de estar presente na seringa tríplice, serve ainda para a refrigeração das brocas e tecidos biológicos, evitando, assim, o aquecimento causado pela alta velocidade das pontas dos instrumentos rotatórios (MONDELLI, et al., 1987). Esta água é proveniente de um reservatório que possui algumas características sendo formado com materiais plásticos, diâmetro reduzido das tubulações e imperfeições microscópicas nas suas superfícies internas, que proporciona o desenvolvimento de micro-organismos em seu interior, chamado de biofilme. Este biofilme torna-se com o tempo um reservatório de matéria orgânica rico em polissacarídeos e glicoproteínas, fornecendo nutrientes e proteção para o desenvolvimento de uma grande variedade de micro-organismos (PREVOST, et al., 1995).

A maioria desses biofilmes são formados por espécies não patogênicas, embora algumas: *Legionella* spp., *Micobacterium* spp., *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp., possam ser patógenos oportunistas, que apresentam riscos tanto para o cirurgião-dentista quanto para o paciente, principalmente se este for comprometido imunologicamente (GROSS; DEVINE; CUTRIGHT, 1976).

O primeiro relato de contaminação da água do equipo odontológico foi feito por BLAKE em 1963 e, somente em 1977, KELSTRUP; FUNDER-NIELSEN; THEILADE demonstraram a presença de micro-organismos aderidos na parede das linhas d'água dos equipos odontológicos.

Sendo assim o biofilme foi definido como a população microbiana resultante da multiplicação e desenvolvimento de micro-organismos aderidos às superfícies, formada numa interface sólido-líquida, embutida na matriz de polissacarídeos extracelular - PEC (COSTERTON et al., 1987). Esses micro-organismos aderidos (células sésseis) podem estar melhores adaptados à sobrevivência e relativamente protegidos da ação de outros biocidas, quando comparados às células livres (planctônicas). Estudos feitos com biofilme mostraram que eles podem apresentar

até 1000 vezes mais resistência aos agentes antimicrobianos do que a mesmas células que crescem em um meio de cultura líquido (MARSH; MARTIN, 2005), isso ocorre por causa da formação do PEC, que funciona como uma esponja que capta e concentra cátions e íons (COSTERTON; LEWANDOWSKI, 1997). Por isso quando formado, é de difícil remoção por meios químicos, recomendando-se para isso a utilização de meios mecânicos ou físicos (POTERA, 1996).

Em 1993 a *Center for Disease Control and Prevention* (CDC, 1993), recomendou a não utilização da água dos equipos odontológicos em procedimentos cirúrgicos. E só em 1996 a *American Dental Association* (ADA, 1996) recomendou que todos se esforçassem para que no ano de 2000 a água dos equipos não apresentasse contaminação acima de 200UFC/ml.

No Japão o limite de micro-organismo (bactérias heterotróficas) na água potável é de 100 UFC/ml, na Europa é de 200 UFC/ml e nos Estados Unidos é de 500 UFC/ml (PREVOST, et al., 1995). No Brasil, de acordo com a portaria nº 518 do Ministério da Saúde, esse limite é de 500 UFC/ml de água (BRASIL, 2004).

As bactérias heterotróficas são definidas como micro-organismos que requerem compostos orgânicos de carbono e nitrogênio como fontes de energia (FUNASA, 2004). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 80% das doenças que ocorrem em países em desenvolvimento são ocasionados pela contaminação da água (GUERRA, et al, 2006).

O biofilme não é uma massa compacta, mas um conjunto de micro-organismos desenvolvidos em colunas e ou andares, com canais por onde circulam líquidos contendo nutrientes, biocidas, subprodutos e gases (COSTERTON; COOK; LAMONT, 1999).

A utilização do ultra-som (US) pode ser uma maneira de não deixar resíduos prejudiciais a saúde, sendo usado para o controle da viabilidade de micro-organismos e também aplicado antes da cloração e do processo de filtração utilizando o sulfato de alumínio (CHEMAT, et al. 2001). O US é formado por ondas mecânicas longitudinais acima de 20000Hz, onde sua energia é transmitida pela vibração das moléculas no ambiente que a onda está se propagando. Estudos mostraram a ação germicida eficaz, em uma frequência de 26000Hz aplicado em suspensão bacteriana (SCHERBA; WEIGEL; O'BRIEN JR, 1991).

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Demonstrar a presença de contaminação microbiana nos reservatórios de água dos equipos odontológicos do Laboratório de Dentística, Endodontia e Materiais Dentários (multiuso) da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP e verificar se o biofilme sofrerá alguma ação do ultrassom.

2.2 Específicos

- a. Verificar e quantificar a existência de bactérias heterotróficas e fungos dos reservatórios de água dos equipos odontológicos do Laboratório de Dentística, Endodontia e Materiais Dentários da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP;
- b. Avaliar a eficácia do ultrassom na diminuição ou eliminação do biofilme presente nestes reservatórios;
- c. Comparar a capacidade de recuperação de bactérias heterotróficas pelos meios Peptona Diluída (PD), Plate Count Agar (PCA) e R2A;
- d. Identificar essas bactérias aeróbias e fungos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta das amostras

Foram coletadas amostras de água de 25 reservatórios dos equipamentos odontológicos do Laboratório de Dentística, Endodontia e Materiais Dentários (multiuso) da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP. Os reservatórios apresentam capacidade de aproximadamente 1000ml, sendo 10ml retirados para o experimento e o período entre as coletas e o início do processamento microbiológico não excedeu a 30 minutos.

3.2 Contagem das bactérias heterotróficas e fungos

O experimento foi realizado em câmara de fluxo laminar (VECO, Campinas, SP, BR) onde as amostras de água foram homogeneizadas em agitador (AP56, PHOENIX) por 1 minuto em potência máxima, e em seguida, alíquotas de 1,0 ml foram transferidas para um tubo (18x100) contendo 9,0 ml de solução salina (AGUIAR; PINHEIRO, 1999; CARDOSO et al., 1999; FANTINO et al., 1992) para obter as diluições de 10^{-1} a 10^{-4} .

Alíquotas de 25 μ l das amostras *in natura* e das diluições foram semeadas, pela técnica da gota (WESTERGREN; KRASSE, 1978), em cinco pontos equidistantes em placa de Petri contendo os meios de cultura Plate Count Agar (PCA), R2A e Peptona Diluída (PD), formulados de acordo com as especificações do fabricante. A seguir a água dos reservatórios foi descartada e cerca de 1000 ml de água destilada estéril (WHITEHOUSE et al., 1991; LINGER et al., 2001; WATANABE; PIMENTA; ITO, 2007) foi adicionada, e os reservatórios foram submetidos à ação do ultrassom (US) por 15 minutos, sendo repetido o mesmo procedimento descrito anteriormente. Após, as placas de Petri serem semeadas, foram incubadas a 24°C por 24h a 72h quando foi observada a morfologia das colônias e feito a quantificação com auxílio do contador de colônias (CP600, QUIMIS), sendo expressa em unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/ml).

O nível de contaminação foi avaliado conforme a portaria nº 518 do Ministério da Saúde do Brasil que permite no máximo 500UFC/ml de bactérias heterotróficas

na água para o consumo humano (BRASIL, 2004) e também comparado com o indicado pela ADA - *American Dental Association* que recomenda 200 UFC/ml (AMERICAN DENTAL ASSOCIATION. ADA, 1996).

Para os fungos, alíquotas de 25µl das amostras *in natura* foram semeadas, pela técnica de esgotamento em placa de Petri contendo o meio de cultura Sabouraud com Cloranfenicol a 1% (Difco), formulado de acordo com a especificação do fabricante. A seguir a água dos reservatórios foi descartada e cerca de 1000 ml de água destilada estéril (WHITEHOUSE et al., 1991; LINGER et al., 2001; WATANABE; PIMENTA; ITO, 2007) foi adicionada, e os reservatórios foram submetidos à ação do ultrassom (US) por 15 minutos, sendo repetido o mesmo procedimento descrito anteriormente. Após, as placas de Petri, foram incubadas a 24°C de 4 a 7 dias, quando foi observada a morfologia das colônias e feito a quantificação com auxílio do contador de colônias (CP600, QUIMIS), sendo expressa em unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/ml).

3.2.1 R2A Agar

Extrato de levedura	0,50g
Peptona protease n.º 3	0,50g
Ácidos casamínos	0,50g
Dextrose	0,50g
Amido solúvel	0,50g
Piruvato de sódio	0,30g
Difosfato de potássio	0,30g
Sulfato de magnésio	0,05g
Ágar	15,00g
Água destilada	1000,00ml

O R2A Agar (Difco™, USA) foi desenvolvido para a contagem de bactérias heterotróficas em água. Para cada 18,2 gramas do meio de cultura foi adicionado 1000ml de água destilada, de acordo com as instruções do fabricante. Após esterilização em autoclave a 120°C por 20 minutos o meio foi distribuído em placas de Petri (60x13mm) esterilizadas.

3.2.2 Plate Count Agar (PCA)

Digesto Pancreatico de Caseína	5,00g
Extrato de Levedura	2,50g
Dextrose	1,00g
Ágar	15,00g
Água destilada	1000,00ml

O Plate Count Agar (Difco™, USA) serve para a contagem total de bactérias de alimentos e água. Para cada 23,5 gramas do meio de cultura foi adicionado 1000ml de água destilada. Após esterilização em autoclave a 120°C por 20 minutos o meio foi distribuído em placas de Petri esterilizadas.

3.2.3 Peptona Diluída (PD)

Peptona	0,1g
Mg SO4 7H2O	0,6g
Fe CL3	0,02g
Agar	20g
Água Destilada	1000ml

O Ágar Peptona Diluída é um meio de cultura recomendado para a contagem de micro-organismos existentes na água, sendo formulado segundo as especificações propostas por MAKI et al., (1986). Após esterilização em autoclave a 120°C por 20 minutos o meio foi distribuído em placas de Petri esterilizadas.

3.2.4 Agar Sabouraud com Cloranfenicol a 1%

Peptic Digest of Animal Tissue	5,0g
Pancreatic Digest of Casein	5,0g
Dextrose	40,0g
Agar	15,0g
Água Destilada	1000ml

O Agar Sabouraud (Difco™, USA), serve para o isolamento de fungos filamentosos e leveduriforme. Para cada 65,0 gramas do meio de cultura foi

adicionado 1000ml de água destilada e após ser autoclavado foi acrescentado Cloranfenicol até obter a concentração final de 1%, para que depois fossem distribuído em placas de Petri esterilizadas (60x13mm).

3.3 Estocagem das bactérias

Para a estocagem, as colônias selecionadas foram transferidas para tubo de rosca (13x100mm) contendo 3 ml de caldo de PD e incubadas na estufa por 2 dias a 24°C para a confirmação da viabilidade. Nesta etapa foi constatado que amostras provenientes de 13 (52%) reservatórios foram perdidas e, optamos por fazer a transferência das colônias diretamente para placas de petri contendo o Agar R2A, do qual procedemos à confirmação da morfologia celular e da pureza. Confirmada a viabilidade das colônias, as mesmas foram transferidas em tubos *Eppendorf* com capacidade de 2ml com fundo plano, onde foi dispensado 1,5ml de Agar R2A. Para garantir a transferência destes micro-organismos foram feitos quatro perfurações no Agar em pontos equidistantes e depois de confirmado o crescimento as amostras foram estocadas em freezer a - 20°C, para posterior identificação.

3.4 Estocagem dos fungos

Após os fungos serem quantificados, foram selecionadas algumas colônias que foram transferidas para tubos de rosca (18x100mm), contendo 7 ml de Agar Sabouraud com Cloranfenicol a 1% inclinado (Difco). Feito o repique das colônias, os tubos foram encubados a 24°C por 4 dias, e após, conservados em temperatura ambiente, até a realização do microcultivo.

3.5 Reativação das amostras bacterianas

As 51 amostras estocadas foram retiradas do freezer a - 20°C, descongeladas a 24°C por 30 minutos e reativadas em placas de petri contendo o meio de cultura R2A Agar, incubadas por 3 dias a 24°C. Destas 51 amostras, 11 (21,56%) foram perdidas na reativação, restando 40 (78,43%) para serem identificadas. Para a confirmação da morfologia celular e de pureza foram feitos novamente a coloração

de Gram, sendo confirmados 35 amostras como bacilos gram negativos e 5 como cocos gram negativos.

Para que não houvesse perda desse estoque, colônias selecionadas foram transferidas para tubo *Eppendorf*, quando foram feitos quatro perfurações em pontos equidistantes, contendo 1,5 ml de Agar R2A e, confirmado o crescimento as amostras foram estocadas novamente em freezer a - 20°C.

3.6 Identificações Bioquímicas

Para a identificação bioquímica, as bactérias selecionadas foram transferidas para tubos de rosca (13x100mm), contendo 4 ml de solução salina e com o uso de espectrofotômetro foi padronizado o inóculo da suspensão bacteriana, semelhante a escala 1 de MacFarland (300 milhões de bactérias/ml). Após, foram inoculados 100µl desta suspensão bacteriana em todos os testes bioquímicos e somente para a Motilidade e Citrato, foi semeada com a agulha, todos os teste foram incubados por 3 a 7 dias a 24°C.

Todas as provas bioquímicas (Lactose, Maltose, Esculina, Nitrato, Citrato, Motilidade e Urease) foram preparadas em tubos de rosca (13x100mm) contendo 4 ml de cada substrato (figura 1). Para a catalase foi adicionada nas colônias algumas gotas de Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) a 3%, considerando positivo quando houve o desprendimento de bolhas e negativo quando não houve alteração.



Figura 1: Série Bioquímica: Da direita para a esquerda - Lactose, Maltose, Esculina, Nitrato, Citrato, Motilidade e Urease

3.6.1 Carboidratos: Lactose e Maltose

O meio base utilizado foi preparado a partir do meio comercial desidratado “Phenol Red Broth Base” (Difco), acrescido de 1,0% dos carboidratos Lactose ou Maltose, sendo distribuídos 4 ml em tubos de rosca (13x100mm), para que depois fossem autoclavados por 15 minutos a 121°C. Ocorrendo o desenvolvimento de cor alaranjada foi considerado teste positivo, quando não houve alteração, ou seja, continuando avermelhado, foi considerado teste negativo (FINEGOLD, BARON, 1989; KONEMAN et al, 2008).

3.6.2 Hidrólise da Esculina

Para a esculina os reagentes foram pesados e dissolvidos na água destilada e 4 ml distribuídos em tubos de rosca (13x100mm), para que depois fossem autoclavados por 15 minutos a 121°C. Foi considerado negativo quando não houve alteração de cor, mas quando houve mudança para a cor preta, foi considerado teste positivo (TORRES, 1990).

Peptona	0,5g
Fosfato dipotássico	0,1g
Esculina	0,3g
Citarto férrico	0,05g
Água destilada	100ml

3.6.3 Nitrato

Foram dissolvidos 9 gramas do caldo de Nitrato (Difco) em 1000 ml de água destilada e após 4 ml foram distribuídos em tubos de rosca (13x100mm), para que depois fossem autoclavados por 15 minutos a 121°C. Após o crescimento das bactérias nos tubos, foi adicionado algumas gotas do Reativo A e B de *Griess Islova*, e, ocorrendo a coloração vermelho tijolo verificamos o teste positivo, se não ocorrer o desenvolvimento de coloração, indicará que o nitrato foi reduzido a nitrito e este,

sob a ação da enzima nitrataze produziu outros compostos (NO, N₂) que não são detectados pelo reativo empregado. tendo a mudança de cor para vermelho é considerado negativo, para o resultado final foi necessário adicionar pó de zinco, foi considerado negativo quando a coloração continuou vermelha, ou seja, o nitrato não foi reduzido para nitrito pela ação da enzima nitrataze, e positivo se ficou sem coloração (ocorreu à redução) (FINEGOLD, BARON, 1989; KONEMAN et al, 2008).

3.6.4 Citrato de Simmons

Tem como finalidade determinar se o micro-organismo tem a capacidade de utilizar o citrato de sódio (acetato, malonato ou mucato de sódio) como fonte de carbono para metabolismo e crescimento.

Para cada 23 gramas do meio de cultura Citrato Simmons Agar (Oxoid) foi necessário adicionar 1000 ml de água destilada e 4 ml foram distribuídos em tubos de rosca (13x100mm), para que depois fossem autoclavados por 15 minutos a 121°C, retirados da autoclave os tubos foram colocados em posição inclinada (bico de flauta) até esfriarem. Com a agulha a suspensão bacteriana foi inoculada e na superfície do meio foi feito estrias. Quando o micro-organismo usa apenas o citrato como fonte de nutrição, produzirá subprodutos que reagem com os sais de amônia presentes no meio de cultura, deixando-o alcalino, tendo a mudança da coloração do meio para azul pela ação do indicador de pH (azul de bromotimol), considerando-se positivo e negativo quando ele permaneceu em sua coloração original (verde).

3.6.5 Motilidade

Para cada 22 gramas do meio de cultura Motilidade Agar (BBL) foi necessário adicionar 1000 ml de água destilada e 4 ml foram distribuídos em tubos de rosca (13x100mm), para que depois fossem autoclavados por 15 minutos a 121°C. A suspensão bacteriana foi inoculada com a agulha em posição vertical até na metade do meio. A motilidade foi considerada positiva quando houve o crescimento bacteriano e negativo quando não houve crescimento.

3.6.6 Ureia

O caldo de Ureia (Difco) não pode ser autoclavado, então antes do seu preparo foi necessário autoclavar os tubos de rosca (13x100mm) para que depois 38,7 gramas do meio ser dissolvidos em 1000 ml na água destilada estéril e a seguir distribuídos 4 ml do meio nos tubos. Com a utilização da uréia o meio de cultura alcaliniza e com isso a coloração se altera para vermelho/pink confirmando um resultado positivo (capacidade de hidrolisar a uréia em amônia) e foi considerado negativo quando não ocorreu a mudança de coloração.

3.7 Reativação dos fungos e microcultivo

Os fungos estocados foram reativados em placas de petri (50x10mm) contendo 5 ml do meio Agar Sabouraud com Cloranfenicol a 1% (Difco). Apenas um repique foi realizado no centro da placa, sendo incubadas a 24°C por 4 a 7 dias, para a confirmação da morfologia colonial.

A técnica do microcultivo (RIDELL, 1950) é utilizada para a identificação de fungos filamentosos e revela o arranjo dos conídios ou esporos como eles são *in situ*. Consiste em um sistema estéril onde em placas de Petri (60x13mm) contendo uma lâmina apoiada sobre um suporte de vidro em V, previamente esterilizadas e com um pequeno bloco de Ágar Batata Dextrose (Difco) depositado sobre essa lâmina. O fungo foi inoculado nas bordas do ágar e coberto com lamínula. Esse sistema foi mantido úmido com um algodão embebido em água destilada previamente esterilizada. As placas de Petri foram vedadas com fita adesiva para que não houvesse perda da umidade e incubadas à 24°C até o aparecimento das estruturas de crescimento fúngico na lamínula após 4 a 7 dias (SIDRIM; MOREIRA, 1999).

3.8 Identificação dos fungos

Depois do crescimento as placas foram abertas e foi colocada uma gota de formol sobre o algodão. O vapor do formol, além de inativar o fungo, auxiliou na fixação das estruturas microscópicas. Após aproximadamente 24 horas retirou-se então a lamínula que cobriu o ágar, com o auxílio de uma pinça e sobre uma lâmina

limpa com uma gota de corante lactofenol azul de algodão (Cotton Blue), depositou esta lamínula com crescimento. Descartando o pedaço de ágar que estava sobre a lâmina, colocou-se uma gota de lactofenol azul de algodão e recobriu-a com uma lamínula limpa, ficando-se assim com duas lâminas para a observação microscópica. A identificação foi feita, observando-se as estruturas fúngicas peculiares de cada fungo, como tipo e cor das hifas, forma, disposição e formação de esporos, os quais foram feitos no Instituto Lauro de Souza Lima – Bauru/SP, no Setor de Micologia.

Além da observação microscópica das estruturas de frutificação dos fungos, também foi observada as colônias macroscopicamente, em relação ao tempo de crescimento, formato das colônias, coloração, textura, relevo e bordos.

3.8.1 Lactofenol Azul de Algodão

Ácido Láctico	20g
Critais de Fenol	20g
Glicerina	20g
Azul Algodão	0,05g
Água destilada	20ml

3.9 Análise Estatística

Para a análise estatística foi utilizado os softwares Microsoft Office Excel 2007 e SigmaPlot 12.0. O teste estatístico utilizado para a comparação das médias dos grupos foi a Análise de Variância a dois critérios (ANOVA), considerando-se os dois critérios de avaliação deste estudo: ultrassom (dois níveis: com e sem ultrassom) e meio (3 níveis: R2A, PCA e Peptona diluída).

O cálculo do tamanho da amostra foi baseado em estudo piloto que considerou um valor de $P < 0,05$ ($\alpha = 5\%$) e uma força de teste de 80% ($\beta = 0,80$), que indicou a necessidade de somente 1 reservatório (diferença minimamente detectável = 500 UFC/ml e desvio padrão esperado = 26.000 UFC/ml).

4. RESULTADOS

4.1 Detecção de bactérias

No apêndice A (página 48) é apresentado o número de unidades formadoras de colônias (UFC/ml), presentes nos 25 reservatórios de água dos equipos odontológicos do Laboratório de Dentística, Endodontia e Materiais Dentários.

Os valores médios dos 25 reservatórios antes e após a ação do ultrassom nos meios R2A, PCA e PD são apresentados na tabela 1 e na figura 2 para o meio PCA.

Tabela 1: Média de UFC/ml, antes e depois da ação do ultrassom em cada meio de cultura e porcentagem de desestruturação do biofilme.

Ultrassom	Meio de cultura	Média	Desvio Padrão	Desestruturação
Antes	R2A	24.660	47.608	29,50%
Depois	R2A	7.292	6.089	
Antes	PCA	14.450	26.830	16,56%
Depois	PCA	2.394	2.493	
Antes	PD	17.233	48.787	35,63%
Depois	PD	6.140	8.790	

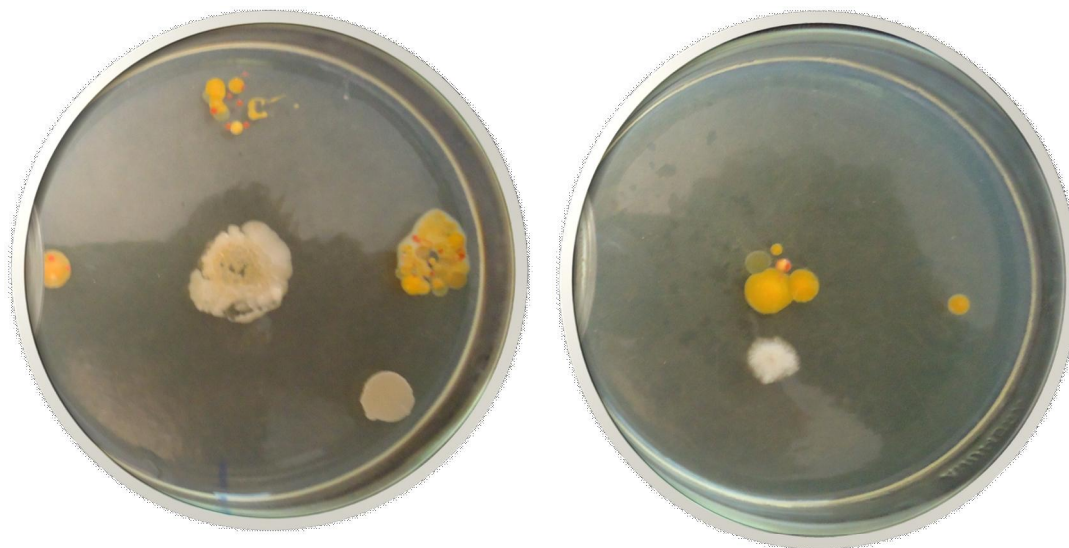


Figura 2: Crescimento de bactérias antes (esquerda) e depois (direita) da ação do ultrassom no meio PCA.

Na avaliação dos 25 reservatórios de água, verificamos a presença de bactérias em todos os reservatórios, nos meios de cultura R2A e PCA, antes da aplicação do ultrassom e somente para o PD não foi detectado em 2 (8%) casos (R4

e R25) a presença de micro-organismos. Com a aplicação do US houve a presença de bactérias em todos os reservatórios no meio R2A, no PCA não verificamos o crescimento em somente um caso (R11) e no PD não foi detectado em 4 casos (R11, R29, R32 e R35).

As figuras de 3 a 5 representa a comparação da qualidade da água em cada meio de cultura (R2A, PCA E PD) , nos reservatórios, antes e após a ação do ultrassom, quando é comparada com o preconizado (200 UFC/ml) pela ADA - *American Dental Association* (ADA, 1996) e pela resolução número 518 de 2004 do Ministério da Saúde (500 UFC/ml) (BRASIL, 2004).

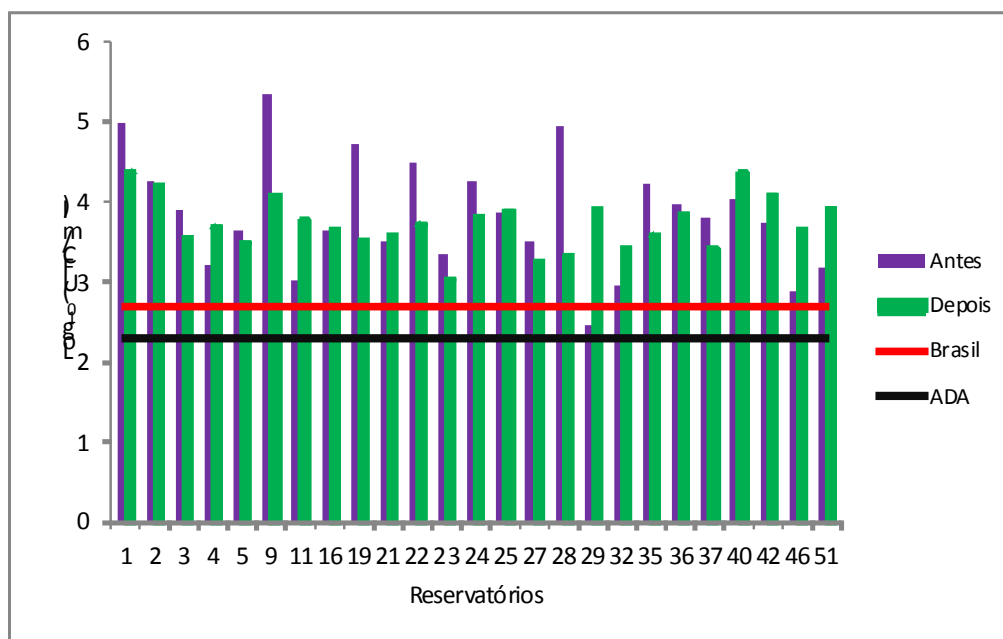


Figura 3: UFC/ml no meio R2A em Log presentes nos reservatórios.

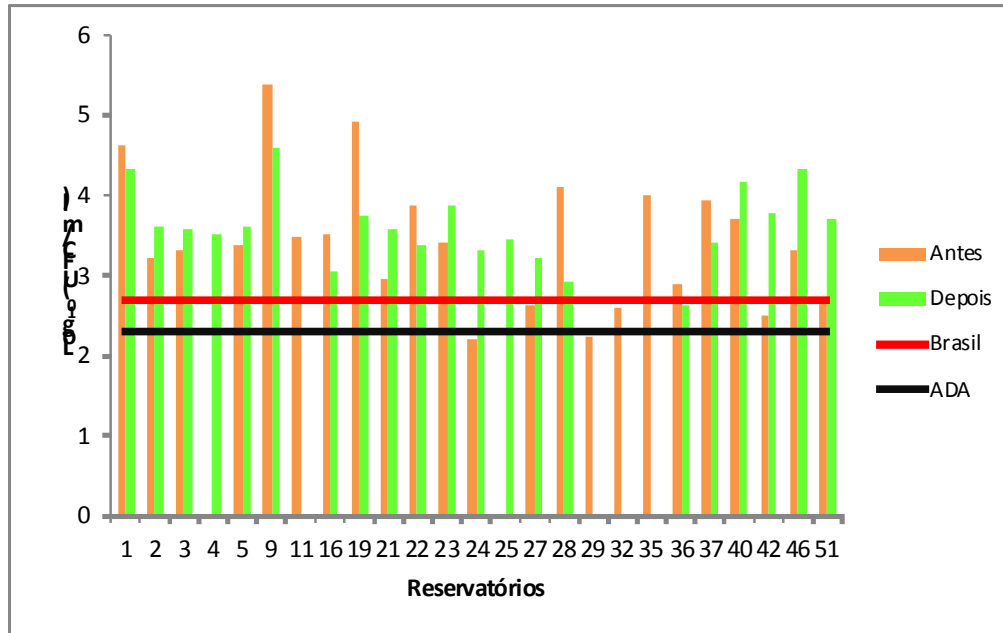


Figura 4: UFC/ml no meio PD em Log presentes nos reservatórios.

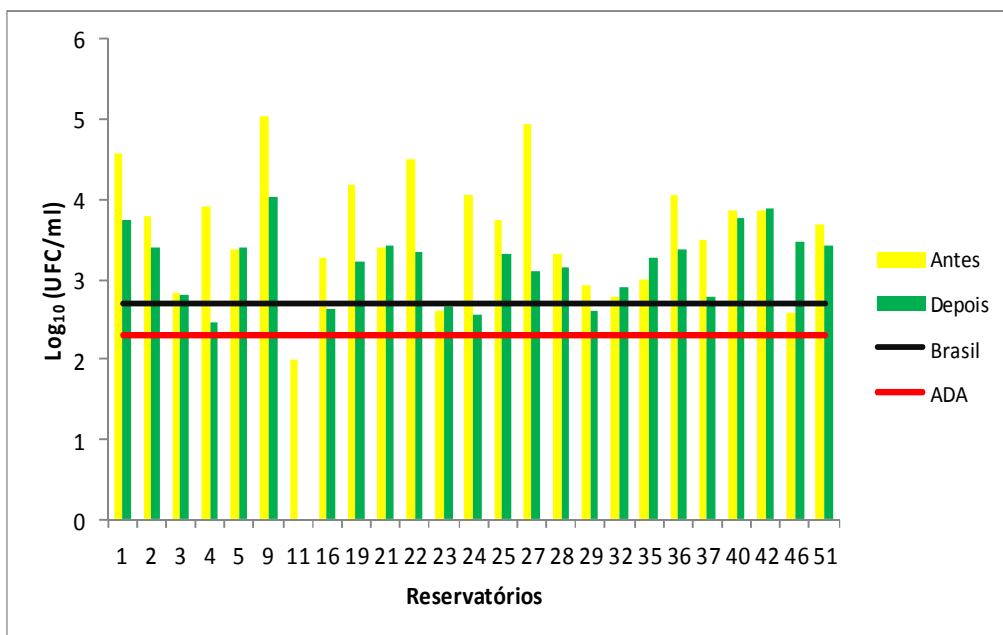


Figura 5: UFC/ml no meio PCA em Log presentes nos reservatórios.

4.2 Identificação bacteriana

Nesta etapa foram submetidas à identificação 51 amostras provenientes de 13 reservatórios dos 25 avaliados, conforme apresentado na tabela 2, entretanto 11 amostras não puderam ser recuperadas. Das 40 amostras reativadas que foram

submetidas ao método de gram, 35 (87,50%) foram confirmadas como bacilos gram negativos e 5 (12,50%) como cocos gram negativos e foi possível a identificação de 6 espécies de bacilos e para os cocos não foi possível a identificação das espécies, conforme apresentado na tabela 3.

Tabela 2: Amostras identificadas a partir dos reservatórios analisados.

Reservatório	Amostra (n°)
2	5
4	11/16/22/25/39/44
9	6/8/14/26/33/42/45/50
11	3/28/51
16	46
23	13/21/34/41
25	1/4/24/38
29	7/32/37
32	9/10/23/29/40
35	15/17/19/27/36/43/47/48
40	35
42	18/20/49
46	2/12/30/31
13	51

Verificamos que dos 13 reservatórios, 4 (30,77%) foram colonizados por uma única espécie bacteriana (R2, R11, R16 e R29), enquanto 2 espécies foram detectadas nos reservatórios R23, R25 e R46 (23,07%), 3 espécies em R32 e R42 (15,38%), 4 espécies nos reservatórios R9 e R35 (15,38%) e 5 espécies no reservatório R4 (7,69%) enquanto somente no R40 (7,69%) a colônia não foi recuperada (tabela 5).

Das 40 amostras, 35 eram bacilos gram negativos, sendo encontradas 6 espécies distintas: *Achromobacter xylosoxidans* (5,71%), *Alcaligenes faecalis* (20%), *Caulobacter diminuta* (11,42%), *Caulobacter vesicularis* (11,42%), *Comamonas acidovorans* (28,57%), e *Sphingomonas paucimobilis* (22,85%), para os 5 cocos gram negativos, não foi possível a identificação.

Tabela 3: Identificação das 51 amostras, obtidas de 13 reservatórios analisados.

Número	R	Espécie
5	2	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
11	4	<i>Caulobacter vesicularis</i>
16	4	<i>Alcaligenes faecalis</i>
22	4	Não Identificado
25	4	Não Identificado
39	4	<i>Comamonas acidovorans</i>
44	4	<i>Caulobacter diminuta</i>
6	9	NR
8	9	<i>Caulobacter vesicularis</i>
14	9	<i>Caulobacter diminuta</i>
26	9	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
33	9	NR
42	9	NR
45	9	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
50	9	<i>Alcaligenes faecalis</i>
3	11	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
28	11	NR
51	11	NR
46	16	<i>Alcaligenes faecalis</i>
13	23	<i>Caulobacter vesicularis</i>
21	23	<i>Caulobacter vesicularis</i>
34	23	<i>Comamonas acidovorans</i>
41	23	NR
1	25	<i>Alcaligenes faecalis</i>
4	25	<i>Comamonas acidovorans</i>
24	25	<i>Comamonas acidovorans</i>
38	25	<i>Alcaligenes faecalis</i>
7	29	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
32	29	NR
37	29	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
9	32	<i>Achromobacter xylooxidans</i>
10	32	<i>Alcaligenes faecalis</i>
23	32	<i>Comamonas acidovorans</i>
29	32	<i>Comamonas acidovorans</i>
40	32	<i>Comamonas acidovorans</i>
15	35	<i>Caulobacter diminuta</i>
17	35	<i>Comamonas acidovorans</i>
19	35	Não Identificado
27	35	Não Identificado
36	35	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
43	35	NR
47	35	<i>Caulobacter diminuta</i>

Número	R	Espécie
48	35	<i>Comamonas acidovorans</i>
35	40	NR
18	42	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
20	42	<i>Comamonas acidovorans</i>
49	42	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>
2	46	Não Identificado
12	46	<i>Alcaligenes faecalis</i>
30	46	NR
31	46	NR

NR: Não Recuperadas

4.3 Detecção de fungos

No apêndice B (página 49) é apresentado o número de unidades formadoras de colônias (UFC/ml) dos fungos, presentes nos 25 reservatórios de água dos equipos odontológicos do Laboratório de Dentística, Endodontia e Materiais Dentários. Os valores médios dos 25 reservatórios antes e após a ação do ultrassom no meio de cultura Sabouraud com Cloranfenicol a 1% são apresentados na tabela 4.

Tabela 4: Média UFC/ml de antes e depois da ação do ultrassom em relação aos fungos.

Ultrassom	Meio de cultura	Média	Desestruturação
Antes	Sb	444,80	51.44%
Depois	Sb	228,80	

Na avaliação dos 25 reservatórios de água, não foi detectada a presença de fungos em somente um reservatório (4%) antes da aplicação do ultrassom (R23), após a ação do ultrassom, não foi detectada a presença de fungos em 7 (28%), R2, R3, R17, R27, R44, R46 e R51.

4.4 Identificação dos fungos

Foram submetidas à identificação em nível de gênero 50 amostras, provenientes dos 25 reservatórios, conforme apresentado na tabela 5, sendo

encontradas 6 gêneros distintos na forma filamentosa: *Acremonium* sp (figuras 6 e 7), *Cladosporium* sp (figuras 8 e 9), *Fusarium* sp (figuras 10 e 11), *Paecilomyces* sp (figuras 12 e 13), *Penicillium* sp (figuras 14, 15 e 16) e *Rhinochadiella* sp (figuras 17 e 18).

Tabela 5: Identificação dos fungos em nível de Gênero antes e após a ação do ultrassom

Reservatório	Gênero
2	<i>Penicillium</i> sp
2 US	NHC
3	<i>Penicillium</i> sp
3 US	NHC
6	<i>Penicillium</i> sp
6 US	<i>Fusarium</i> sp
7	<i>Paecilomyces</i> sp
7 US	<i>Penicillium</i> sp + <i>Paecilomyces</i> sp
8	<i>Paecilomyces</i> sp
8 US	<i>Penicillium</i> sp + <i>Paecilomyces</i> sp
12	<i>Paecilomyces</i> sp
12 US	<i>Penicillium</i> sp + <i>Paecilomyces</i> sp
15	<i>Paecilomyces</i> sp
15 US	<i>Penicillium</i> sp + <i>Acremonium</i> sp
16	<i>Paecilomyces</i> sp
16 US	<i>Rhinochadiella</i> sp
17	<i>Penicillium</i> sp + <i>Acremonium</i> sp
17 US	NHC
21	<i>Penicillium</i> sp
21 US	<i>Penicillium</i> sp
22	<i>Paecilomyces</i> sp
22 US	<i>Penicillium</i> sp
23	NHC
23 US	<i>Paecilomyces</i> sp
25	<i>Penicillium</i> sp
25 US	<i>Penicillium</i> sp
27	<i>Penicillium</i> sp
27 US	NHC
31	<i>Penicillium</i> sp + <i>Paecilomyces</i> sp
31 US	<i>Penicillium</i> sp
32	<i>Penicillium</i> sp
32 US	<i>Paecilomyces</i> sp
33	<i>Paecilomyces</i> sp
33 US	<i>Cladosporium</i> sp
35	<i>Paecilomyces</i> sp
35 US	<i>Paecilomyces</i> sp
36	<i>Cladosporium</i> sp

Reservatório	Gênero
36 US	<i>Paecilomyces</i> sp
37	<i>Cladosporium</i> sp
37 US	<i>Cladosporium</i> sp
40	<i>Paecilomyces</i> sp
40 US	<i>Paecilomyces</i> sp
44	<i>Paecilomyces</i> sp
44 US	NHC
46	<i>Penicillium</i> sp
46 US	NHC
50	<i>Paecilomyces</i> sp
50 US	<i>Penicillium</i> sp
51	<i>Penicillium</i> sp + <i>Paecilomyces</i> sp
51 US	NHC

Das 50 amostras avaliadas, foram encontradas 13 amostras (26%) de *Penicillium* sp, 16 (32%) de *Paecilomyces* sp, 4 (8%) de *Cladosporium* sp e um amostra dos gêneros *Fusarium* sp (2%) e *Rhinochlamydia* sp (2%). Para as associações entre *Penicillium* sp com *Paecilomyces* sp foram encontrados 5 amostras (10%) e entre *Penicillium* sp com *Acremonium* sp somente 2 amostras (4%). Sendo que, em uma amostra (2%) não houve crescimento de colônia antes da aplicação do ultrassom, e após a ação do ultrassom, não houve crescimento em 7 (14%) amostras.



Figura 6: *Acremonium* sp

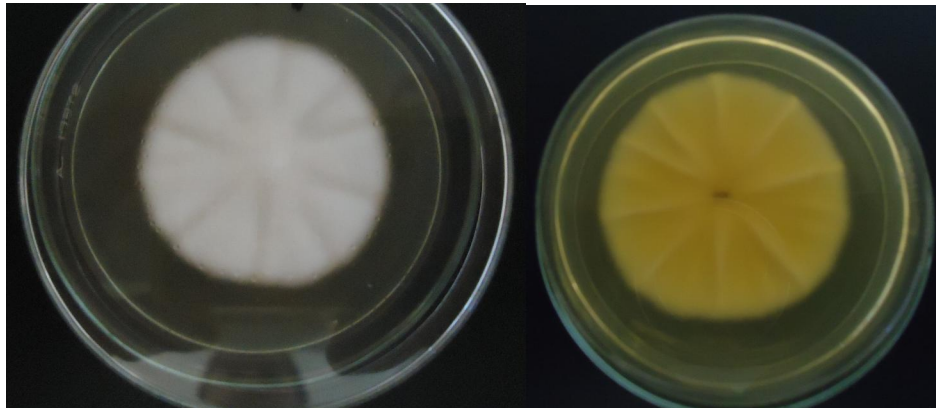


Figura 7: Verso e reverso da colônia de *Acremonium* sp

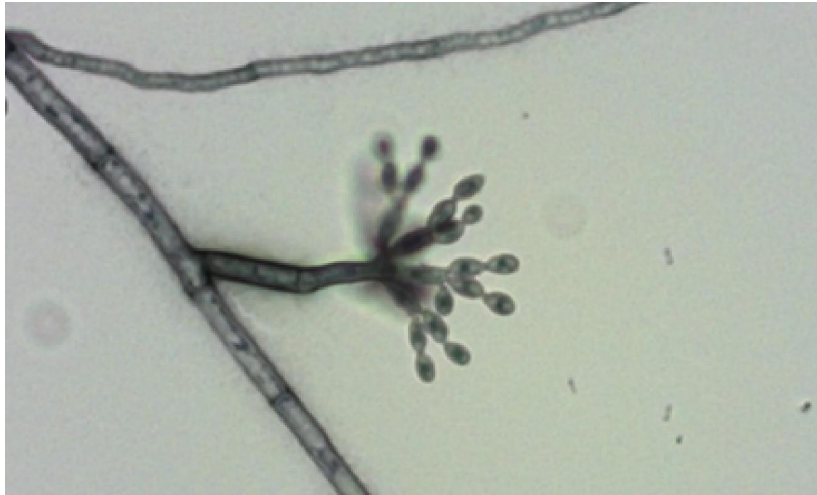


Figura 8: *Cladosporium* sp

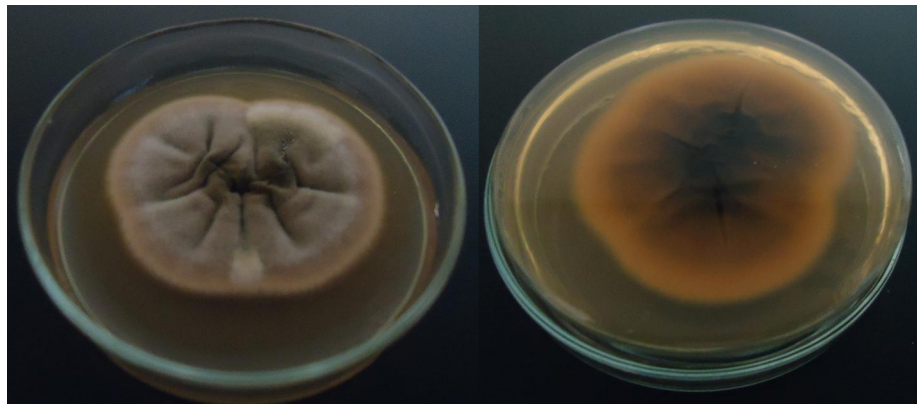


Figura 9: Verso e reverso da colônia de *Cladosporium* sp

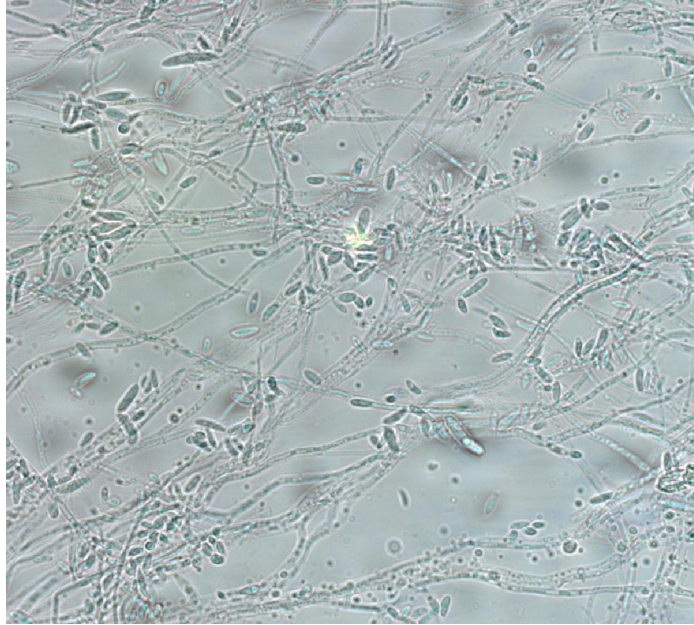


Figura 10: *Fusarium* sp



Figura 11: Colônia de *Fusarium* sp

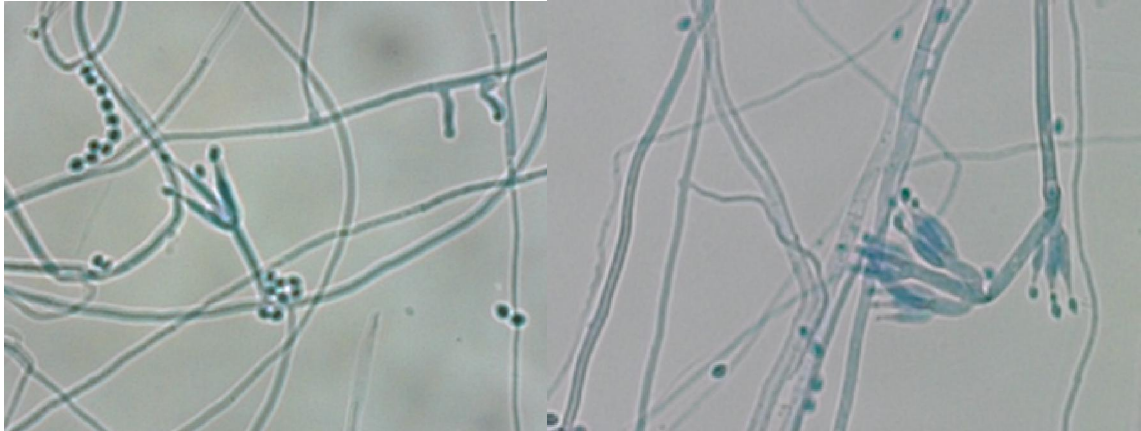


Figura 12: *Paecilomyces* sp



Figura 13: Verso e reverso da colônia de *Paecilomyces* sp.

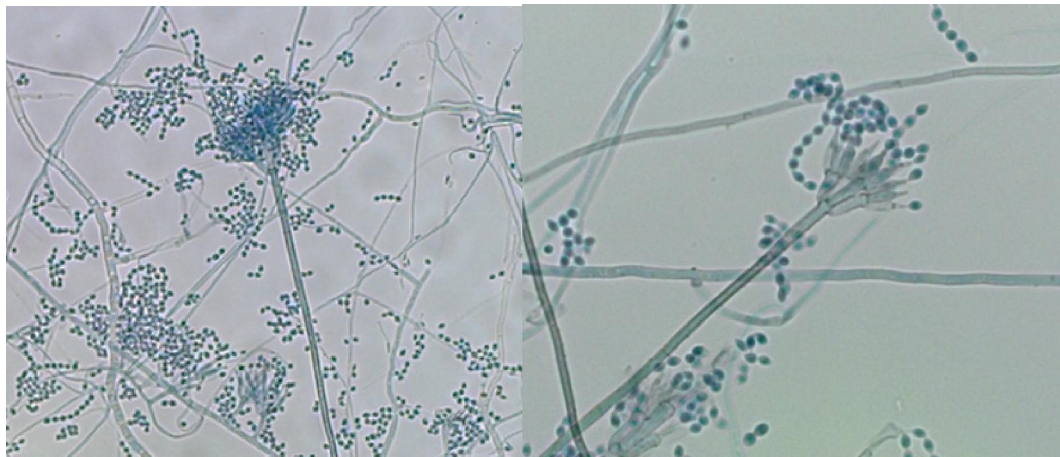


Figura 14: *Penicillium* sp

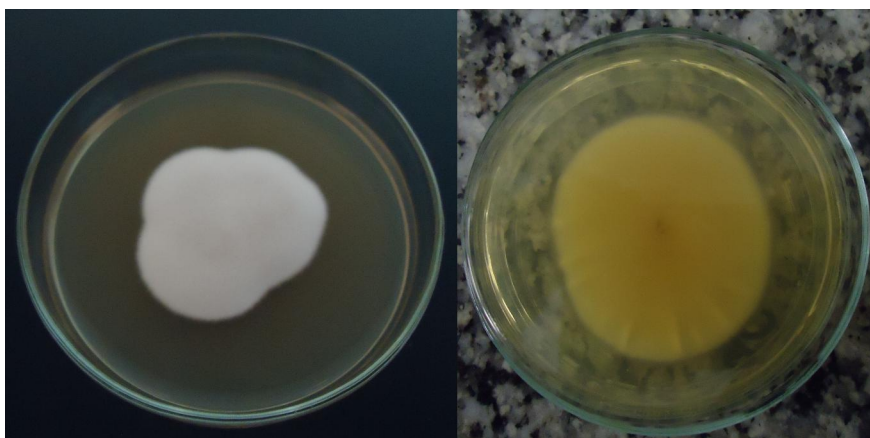


Figura 15: Verso e reverso da colônia de *Penicillium* sp.



Figura 16: Verso e reverso da colônia de *Penicillium* sp.



Figura 17: *Rhinocladia* sp

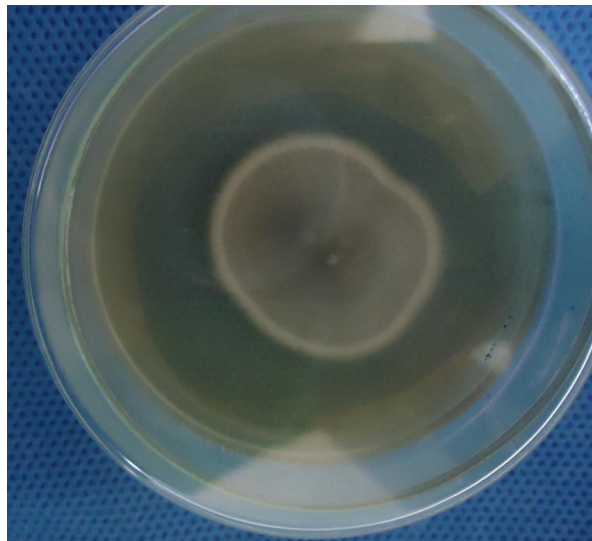


Figura 18: Verso da colônia de *Rhinocladia* sp.

5. DISCUSSÃO

Várias medidas foram sugeridas para reduzir a contaminação da água dos equipamentos odontológicos, como a adição de hipoclorito de sódio (1:10) e posterior fluxo de 30 segundos (SCHAEFER, 1990), uso de água estéril ou solução salina nos reservatórios para procedimentos cirúrgicos, desinfecção das unidades de água uma vez por semana (WILLIAMS et al., 1993), a instalação de válvulas anti-refluxo (SHEARER, 1996). Independente do procedimento a ser realizado, ARAÚJO; LOPES-SILVA (2002) sugeriram que os cirurgiões-dentistas devem adotar medidas para manter a qualidade da água dos equipamentos odontológicos e reduzir o risco de contaminação.

A presença de micro-organismos nos reservatórios da FOB-USP, confirma os resultados pioneiros obtidos por BLAKE em 1963 e KELSTRUP; FUNDER-NIELSEN; THEILADE em 1977, que constataram que este local e as tubulações de água, abrigavam organismos com potencial de causar doenças aos pacientes e a equipe odontológica.

A multiplicação e desenvolvimento de uma população microbiana nos reservatórios de água são favorecidos pela estruturação do biofilme, sendo que os micro-organismos nestas condições apresentam maior resistência aos agentes antimicrobianos (COSTERTON et al., 1987; MARSH; MARTIN, 2005). A produção de polissacarídeos (COSTERTON; LEWANDOWSKI, 1997; COSTERTON; COOK; LAMONT, 1999; AUGSPURGER et al., 2010; FLEMMING; WINGENDER, 2010), dificulta a remoção do biofilme por meios químicos e o emprego de meios mecânicos (POTERA, 1996) poderia ser uma alternativa para o controle destes micro-organismos.

Unidades odontológicas em uso por tão pouco tempo, quanto 2 semanas apresentaram bactérias aderentes e, após 6 meses, um biofilme contínuo estava formado (PUTNINS, DI GIOVANNI, BHULLAR, 2001). Nosso estudo detectou a presença de micro-organismos em todos os 25 reservatórios de água do Laboratório de Dentística, Endodontia e Materiais Dentários da FOB-USP, sendo constatada a presença de elevada quantidade de bactérias, corroborando outros estudos da literatura (GROSS; DEVINE; CUTRIGHT, 1976; AGUIAR; PINHEIRO, 1999; XAVIER et al., 2000; WATANABE, 2007).

O emprego dos meios de cultura PCA, PD e R2A na detecção de micro-organismos em reservatórios de água dos equipos odontológicos não é uma conduta encontrada em todas as pesquisas, o que dificulta a comparação dos resultados. Em nosso trabalho, verificamos que o meio R2A possibilitou o isolamento de bactérias em todos os 25 reservatórios, enquanto WATANABE (2007) não detectou em 8 (32%) dos casos. Resultado semelhante ao nosso foi encontrado por WALKER et al., em 2000, que ao avaliarem 55 reservatórios, detectou a presença de bactérias em todos os casos quando usou o meio R2A.

A falta de protocolos para avaliar amostras de água proveniente dos reservatórios odontológicos dificulta a comparação entre os trabalhos de pesquisa e, segundo YABUNE; IMAZATO; EBISU (2005) que empregaram o meio R2A a 25 °C, após 7 dias de incubação, verificaram ser estas condições altamente favoráveis ao crescimento das bactérias heterotróficas, indicando uma sensibilidade de aproximadamente 100 vezes àquela obtida pelo uso do Trypticase Soy Agar (TSA) a temperatura de 37°C, que apresentou uma variação de 10^3 a 10^5 UFC/ml. Fato semelhante foi observado em nosso trabalho quando da estocagem das amostras em PD, que não possibilitou a recuperação de 12/25 (48%) reservatórios e, quando mantidas e estocadas em Agar R2A, foi possível a sua recuperação e identificação. Essa opinião é compartilhada por MONTEBUGNOLI et al., (2004), que associa a grande variabilidade entre as amostras dentro de cada unidade dentária, assim como o tipo de meio de cultura, tempo e temperaturas de incubação, são fatores que influenciam tanto o número como o tipo de micro-organismo recuperado de cada reservatório.

Outro fator que apresenta grande variação nas pesquisas é o tempo e temperatura de incubação. Ainda com relação ao meio R2A, WALKER et al., em 2000, incubou as placas por 48 horas a 37°C, WATANABE (2007) por 7 dias a 24°C e optamos por 24°C por 72 horas, que proporcionou melhor seleção e isolamento de colônias das bactérias heterotróficas.

O meio de cultura PCA detectou micro-organismos em todos os reservatórios por nós avaliados, enquanto XAVIER et al. (2000) encontrou em 63/68 (92,7%) a presença de bactérias heterotróficas. Estes pesquisadores empregaram a técnica de *pour plate* para semear as placas, que foram incubadas a 37 °C por 48 horas, enquanto em nosso estudo as placas foram semeadas pela técnica da gota (WESTERGREN; KRASSE, 1978). A técnica da gota por ser mais econômica e não

utilizar o meio de cultura aquecido, como na técnica de *pour plate*, poderia ter interferido com o desenvolvimento dos micro-organismos, fato que nos permitiu maior detecção de bactérias em relação ao obtido por XAVIER et al. (2000). As possíveis alterações verificadas com relação aos resultados dos trabalhos citados poderiam estar associadas com as diferentes técnicas de semeadura e de incubação utilizadas.

O uso do ultrassom para o controle de micro-organismos foi avaliado em suspensões bacterianas por SCHERBA; WEIGEL; O'BRIEN (1991) e antes do processo de cloração e filtração no tratamento de água por CHEMAT et al. (2001). Estratégias desenvolvidas para controlar a contaminação dos reservatórios de água das unidades dentárias procuram reduzir ou eliminar o biofilme e as bactérias heterotróficas (WALKER et al., 2000). Apesar do uso do ultrassom não eliminar completamente o biofilme, o seu emprego foi efetivo na redução do mesmo, conforme foi constatado nos 3 meios de cultura empregados (tabela 1) indicando que este procedimento pode ser implementado nas condutas de limpeza dos reservatórios de água dos equipos odontológicos como uma alternativa em melhorar a qualidade da água.

Das 51 amostras identificadas em 13 reservatórios, a presença de *Sphingomonas paucimobilis* (22,85%) foi semelhante observada por SZYMANSKA J. (2007) que encontrou a mesma bactéria em 6/25 (24%) reservatórios avaliados, porém não foram utilizados os mesmos meios de cultura.

Das 50 amostras de fungos recuperadas de 25 reservatórios, foram detectados seis gêneros (*Acremonium* sp, *Cladosporium* sp, *Fusarium* sp, *Paecilomyces* sp, *Penicillium* sp e *Rhinochlamydia* sp) que corroboram os dados relatados por KELLEY et al., 2003 que verificaram a presença de 16 gêneros isolados com maior frequência na água para consumo humano (*Acremonium* sp, *Alternaria* sp, *Aspergillus* sp, *Candida* sp, *Cladosporium* sp, *Cryptococcus* sp, *Fusarium* sp, *Geotrichium* sp, *Mucor* sp, *Paecilomyces* sp, *Penicillium* sp, *Phialophora* sp, *Phoma* sp, *Rodotorula* sp, *Thichoderma* sp e *Verticillium* sp) que estão associados a produção de substâncias que causam mau gosto.

GONÇALVES et al., (2006) verificaram que os gêneros *Penicillium* sp (40,6%) e *Acremonium* sp (38,8%) foram encontrados com maior incidência nas amostras de água da rede pública analisada, enquanto nos reservatórios dos equipos odontológicos verificamos a maior incidência para *Paecilomyces* sp em 16 (32%)

casos, seguido por *Penicillium* sp 13 (26%) e *Cladosporium* sp em 4 (8%). Associação de *Acremonium* sp e *Penecillium* sp foi encontrado em 2 (4%) reservatórios, sendo os gêneros obtidos em nossa pesquisa, semelhantes aos resultados encontrados na literatura.

HEDAYATI et al., (2011) verificaram a presença de fungos em torneiras de quatro hospitais na cidade de Sari , no Irã. Foram selecionadas 498 colônias durante o período de janeiro a dezembro de 2009 e 12 gêneros foram identificados, sendo *Aspergillus* sp (29,7%), *Cladosporium* sp (26,7%) e *Penicillium* sp (23,9%) os mais isolados. A detecção de *Penicillium* sp em 26% das amostras isoladas em nosso trabalho é semelhante a obtida por HEDAYATI et al., (2011), indicando que provavelmente a contaminação ocorreu quando teve o abastecimento dos reservatórios.

No caso do reservatório (R23) em que somente foi detectado fungo após o uso do US, podemos inferir que o mesmo estava no interior do biofilme e, que a desestruturação produzida pela ação do mesmo, possibilitou a detecção do *Paecilomyces* sp, fato que podemos associar com a efetividade do US em desagregar o biofilme e como uma medida complementar para a garantir a qualidade de água.

Os resultados desta pesquisa indicam que o ultrassom foi capaz de desestruturar o biofilme, sem eliminar totalmente os micro-organismos, sendo necessário monitorar regularmente a qualidade da água nos reservatórios dos equipos odontológicos.

6. CONCLUSÃO

Em função dos resultados obtidos podemos concluir que:

1. Na avaliação dos 25 reservatórios de água, verificamos a presença de bactérias em todos os reservatórios, nos meios de cultura R2A e PCA, antes da aplicação do ultrassom e somente para o PD não foi detectado em 2 (8%) casos (R4 e R25) a presença de micro-organismos. Com a aplicação do US houve a presença de bactérias em todos os reservatórios no meio R2A, no PCA não verificamos o crescimento em somente um caso (R11) e no PD não foi detectado em 4 casos (R11, R29, R32 e R35).
2. A ação do ultrassom foi efetiva na desestruturação do biofilme, independente dos meios de cultura utilizados (R2A, PCA, PD e Sb).
3. A comparação entre os meios de cultura utilizados (R2A, PCA e PD) na quantificação de micro-organismos, mostrou ser estatisticamente não significante, indicando que todos foram capazes de recuperar micro-organismos.
4. Foram identificadas 6 espécies bacterianas em 51 amostras obtidas de 13 reservatórios analisados e 6 gêneros de fungos em 50 amostras avaliadas de 25 reservatórios.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, C. M.; PINHEIRO, J. T. Avaliação bacteriológica da qualidade da água utilizada nos equipos odontológicos. **Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.**, v. 53, n. 3, p. 228-235, 1999.

ARAÚJO, C. M.; LOPES-SILVA, A. M. S. Análise da qualidade da água de reservatórios de equipamentos odontológicos. **Biocienc. Taubaté**. v. 8, n. 1, p. 29-36, jan-jun, 2002.

AMERICAN DENTAL ASSOCIATION. ADA statement on dental unit waterlines. *J. Am. Dent. Assoc.*, Chicago, v. 127, n. 11, p. 185-186, Nov. 1996.

AUGSPURGER, C. et al. Drivers of bacterial colonization patterns in stream biofilms. **FEMS Microbiology Ecology**. v. 72, p. 47-57, 2010.

BLAKE, G. C. The incident and control of bacterial infection in dental spray reservoirs. **Br. Den. J.**, London, v. 115, n. 3, p. 413-416, Nov. 1963.

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

CARDOSO, M. L. et al. Qualidade microbiológica da água utilizada em turbinas de alta rotação em três condições diferentes. **Ver. Assoc. Paul. Cir. Dent.**, São Paulo, v. 53, n. 5, p. 387-393, setembro/outubro, 1999.

CDC - Center for Disease Control and Prevention. Recommended infection-control practices for dentistry. **Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, Atlanta, v. 28, n. 42 (RR-8), p. 1-12, May, 1993.

CHEMAT, F. et al. Sono-oxidation treatment of humic substances in drinking water. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 8, p. 247 – 250, 2001.

COSTERTON, J. W.; COOK, G.; LAMONT, R. The community architecture of biofilms: dynamic structures and mechanisms. In: NEWMAN, H.N.; WILSON, M (eds). **Dental plaque revisited: oral biofilms in health and disease**. London, Cardiff: Bioline, p. 5-13, 1999.

COSTERTON, J. W.; LEWANDOWSKI, Z. The biofilm lifestyle. **Adv. Dent. Res.**, Washington, v. 11, n. 2, p. 192-195, Apr. 1997.

COSTERTON, J. W. et al. Bacterial biofilms in nature and disease. **Annu. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v. 41, p. 435-464, Oct. 1987.

Difco™ & BBL™ Manual. **Manual of microbiological culture media**. 2 ed. s.l, 2009. <<http://www.bd.com/ds/technicalCenter/>> Acesso em 07/05/2011.

FANTINO, V. et al. Exame bacteriológico da água em clínica odontológica. **Ver. Assoc. Paul. Cir. Dent.**, São Paulo, v. 46, n. 4, p. 829-831, julho/agosto. 1992.

FINEGOLD, S.M; BARON, E. J. **Diagnóstico microbiológico**. 7 edição. São Paulo: Ed. Paramericana, 1989.

FLEMMING, C. H; WINGENDER, J. **The biofilm matrix**. v. 8, sept, 2010.

FUNASA. Fundação Nacional da Saúde, Ministério da Saúde. **Manual prático de análise de água**. Brasília, v. 1, 2004.

GONÇALVES A. B. et al. FISH and Calcofluor staining techniques to detect in situ filamentous fungal biofilms in water. **Revista Iberoamericana de Micologia**. v. 23, p. 194-198, 2006.

GROSS, A.; DEVINE, M. J.; CUTRIGHT, D. E. Microbial contamination of dental units and ultrasonic scalers. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 47, n. 11, p. 670-673, Nov. 1976.

GUERRA, N. M. M. et al. Ocorrência de *Pseudomonas aeruginosa* em água potável. **Acta Sci. Biol. Sci.**, v. 28, n. 1, p. 13-18, 2006.

HEDAYATI, M. T. et al. Study on fungal flora of water as a potencial reservoir of fungi in hospitals in Sari city, Iran. **J. de Mycologie Médicale**, v. 21, p. 10-14, 2011.

KELLEY J. et al. Identification and control of fungi in distribution systems. **AWWA Research Foundation and American Water Works Association**, Denver, Colo, 2003.

KELSTRUP, J.; FUNDER-NIELSEN, T. D.; THEILADE, J. Microbial aggregate contamination of water lines in dental equipment and its control. **Acta. Pathol. Microbiol. Scan.**, Copenhagen, v. 85, n. 3, p. 177-183, June, 1977.

KONEMAN, E. et al. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2008.

LINGER, J. B. et al. Evaluation of hydrogen peroxide disinfectant for dental unit waterline. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v. 132, n. 9, p. 1287-1291, Sept. 2001.

MAKI, J. S. et al. Recovery and Diversity of Heterotrophic Bacteria from Chlorinated Drinking Waters. **Applied and Environmental Microbiology**, American Society for Microbiology, p. 1047-1055, 1986.

MARSH, P.; MARTIN, M. V. **Microbiologia Oral.**, São Paulo: Livraria Santos Editora, v. 4, p. 58, 2005.

MONDELLI, J. et al. Dentística pré-clínica. São Paulo: **Sarvier.**, 1987.

MONTEBUGNOLI, L. et al. A between-patient disinfection method to control water line contamination and biofilm inside dental units. **Elsevier**, v. 56, p. 297-304, 2004.

POTERA, C. Biofilms invade microbiology. **Science**, Washington, v. 273, n. 5283, p.1795-1797, Sept. 1996.

PREVOST, A. P. et al. Doctor, would you drink water from your dental unit? **New York State Dent.** v. 61, n. 10, p. 22-28, 1995.

PUTNINS, E. E; DI GIOVANNI, D.; BHULLAR, A. S. Dental unit waterline contamination and its possible implications during periodontal surgery. **J. Periodontal**, v. 72, n. 3, p. 393-400, 2001

RIDELL, R. W. **Permanent stained mycological preparation obtained by slide culture**. Mycologia, v. 42, p. 265-270, 1950.

SCHAEFER, M. E. Infection control, OSHA and hazards communication program. **J. Calif. Dent. Assoc.**, v. 18, n. 8, p. 53-58, Aug, 1990

SCHERBA, G.; WEIGEL, R. M.; O'BRIEN JR., W. D. Quantitative assessment of the germicidal efficacy as ultrasonic energy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 2079-2087, 1991.

SHEARER, B. G. Biofilm and the dental office. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v. 127. N. 2 p. 181-189, Feb, 1996.

SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. **Fundamentos clínicos e laboratoriais de micologia médica**. Ed. Guanabara, Koogan, 1999.

SZYMANSKA J. Bacterial contamination of water in dental units reservoirs. **Ann. Agric. Environ Med.** v. 14, p. 137-140, 2007.

TORRES, S. A. **Avaliação do agar SB20 e MSB na contagem de Streptococos do grupo Mutans na saliva e na placa dental de adolescentes**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Julio de Mesquita Filho - Faculdade de Odontologia de Araraquara, 1990.

WALKER et al. Microbial biofilm formation and contamination of dental-unit water systems in general dental practice. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 8, p. 3363-3367, Agu. 2000.

WATANABE, E. Água do equipo odontológico: técnicas convencionais e modernas para avaliar a contaminação microbiana. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo- Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2007.

WATANABE, E.; PIMENTA, F. C.; ITO, I. Y. Determinação do nível de contaminação microbiana da água de equipos odontológicos utilizando PetrifilmTM e SimPlate[®] WHPC. **STOMA**, Lisboa, n. 82, jan./fev./mar. 2007.

WESTERGRENN, G.; KRASSE, B. Evaluation of a micromethod for determination of Streptococcus mutans and Lactobacillus infection. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 7, n. 1, p. 82-83, Jan. 1978.

WHITEHOUSE, R. L. S. et al. Influence of biofilms on microbial contamination in dental unit water. **J. Dent. Bristol**, v. 19, n. 5, p. 290-295. Oct. 1991.

WILLIAMS, J. F. et al. Microbial contamination of dental unit waterline: prevalence, intensity and microbiological characteristics. **J Am. Dent. Assoc.** Chicago. v. 124, n. 10, p. 59-65. Oct, 1993.

XAVIER, H. V. M. et al. Análise bacteriológica da água de equipos odontológicos. **Acta Scientiarum.** v. 22, n. 2, p. 631-636, 2000.

YABUNE, T.; IMAZATO, S.; EBISU, S. Inhibitory effect of PVDF tubes on biofilm formation in dental unit waterlines. **Elsevier.** v. 21, p. 780-786, 2005.

APÊNDICE

Apêndice A: Valor total de bactérias em UFC/ml nos meios de culturas R2A, PCA e PD antes e depois da ação do ultrassom.

R	R2A sem US	R2A com US	PCA sem US	PCA com US	PD sem US	PD com US
1	92.533	24.400	38.400	5.440	41.800	22.200
2	18.820	16.213	6.140	2.453	1.700	4.107
3	8.413	3.667	660	640	2.040	3.800
4	1.720	5.100	8.000	290	0	3.400
5	4.346	3.146	2.280	2.520	2.420	4.140
9	224.000	12.300	112.000	10.800	240.000	38.000
11	1.070	6.000	100	0	3.000	0
16	4.573	4.680	1.813	440	3.360	1.160
19	51.540	3.366	14.906	1.720	84.400	5.360
21	3.260	3.933	2.480	2.680	940	3.780
22	32.740	5.346	31.920	2.240	7.707	2.400
23	2.300	1.100	420	462	2.600	7.200
24	18.200	6.560	11.600	360	160	2.120
25	7.400	8.200	5.400	2.080	0	2.800
27	3.300	1.860	86.000	1.300	440	1.680
28	89.066	2.140	2.160	1.440	12.400	840
29	300	8.400	850	410	180	0
32	890	2.700	590	813	390	0
35	17.400	3.800	1.006	1.920	10.000	0
36	9.493	7.200	11.600	2.293	760	440
37	6.660	2.680	3.200	600	8.520	2.620
40	10.733	23.560	7.053	5.666	5.093	14.413
42	5.347	12.746	7.506	7.560	320	5.760
46	790	4.500	380	3.040	2.100	22.000
51	1.600	8.693	4.800	2.680	500	5.280
MÉDIA	24.660	7.292	14.451	2.394	17.233	6.140

Apêndice B: Valor total de fungos em UFC/ml no meio de cultura Sabouraud com Cloranfenicol 1% antes e depois da ação do ultrassom.

R	Sb sem US	Sb com US
2	240	0
3	40	0
6	120	240
7	40	560
8	240	240
12	120	40
15	280	40
16	440	120
17	80	0
21	640	280
22	920	320
23	0	280
25	880	1.600
27	80	0
31	2.000	880
32	160	120
33	360	240
35	240	200
36	480	120
37	240	80
40	360	200
44	320	0
46	1.200	0
50	520	120
51	1.120	0
MÉDIA	444,80	228,80