



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR

RAY RAVILLY ALVES ARRUDA

**ASSOCIAÇÃO DOS EXOMETABÓLITOS NA INTERAÇÃO ENTRE
PSEUDOMONAS AERUGINOSA E *ESCHERICHIA COLI* EM MEIO AQUOSO**

JOÃO PESSOA

2019

RAY RAVILLY ALVES ARRUDA

**ASSOCIAÇÃO DOS EXOMETABÓLITOS NA INTERAÇÃO ENTRE
PSEUDOMONAS AERUGINOSA E *ESCHERICHIA COLI* EM MEIO AQUOSO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia celular e Molecular da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Biologia celular e molecular.

Orientador: Prof. Dr Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes

JOÃO PESSOA

2019

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

A779a Arruda, Ray Ravilly Alves.
ASSOCIAÇÃO DOS EXOMETABÓLITOS NA INTERAÇÃO ENTRE
PSEUDOMONAS AERUGINOSA E ESCHERICHIA COLI EM MEIO
AQUOSO / Ray Ravilly Alves Arruda. - João Pessoa, 2019.
55 f. : il.

Orientação: Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN.

1. Piocianina, Indol, Acetato, Ecologia microbiana. I.
Gomes, Ulrich Vasconcelos da Rocha. II. Título.

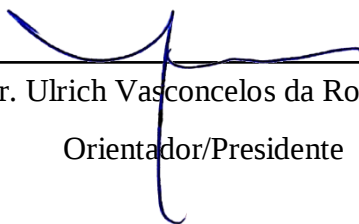
UFPB/BC

RAY RAVILLY ALVES ARRUDA

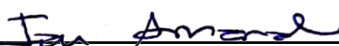
**ASSOCIAÇÃO DOS EXOMETABÓLITOS NA INTERAÇÃO ENTRE
PSEUDOMONAS AERUGINOSA E *ESCHERICHIA COLI* EM MEIO AQUOSO**

Aprovado em: João Pessoa – PB, 31/07/2019

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes
Orientador/Presidente



Prof. Dr. Ian Porto Gurgel do Amaral
Examinador Externo



Prof. Dra. Maria Soraya Pereira Franco Adriano
Examinador Interno

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus primeiramente por todas as bênçãos a mim proporcionadas e por me conceder saúde e força para realizar todas as minhas metas. Obrigado Senhor pela família especial que me colocaste e por todos os amigos que fizeste cruzar meu caminho para fortalecer minha jornada.

A toda minha família, em especial a minha amada mãe Maria do Socorro Alves Arruda, pela garra, esforço, amor, cuidado e fé em mim depositados. A todos os meus irmãos, Renatta Arruda, Júnor Arruda, Rafael Arruda, Renally Arruda e Amanda Arruda, que são a base de tudo em minha vida. Também a minhas sobrinhas Íris, Isabel e Clarice que enchem nossos dias de alegria. Amo todos vocês eterna e incondicionalmente.

A minha irmã Renally Arruda, por sempre estar presente em minha vida, sendo meu exemplo durante minha iniciação na vida acadêmica e me ajudando a enfrentar todos os obstáculos. Sou teu fã e espero ser uma excelente pessoa e profissional como você.

Ao meu excelente orientador, Ulrich Vasconcelos, que é uma fonte de inspiração não só para mim, mas para todos os alunos que possuem a honra de sua orientação. Um exemplo de orientador, professor, conselheiro e amigo. Ter um ótimo orientador na pós-graduação me ajudou a enfrentar todos os obstáculos mais facilmente.

Aos melhores e eternos amigos Hallana Bonifácio e Tarcísio Bonifácio, que enfrentaram todos os momentos possíveis ao meu lado, que me incentivaram, acompanharam e alegraram minha vida durante todo esse período, pessoas em que posso depositar toda minha confiança e lealdade. Em especial Tarcísio Bonifácio, que me acompanha desde de a graduação, me acompanhando tanto na vida pessoal, quanto acadêmica.

Aos bons amigos que a vida me trouxe, que são presentes, e que facilitaram o dia-a-dia durante todo o processo da pós-graduação, com uma conversa agradável e leve ou com um bom café

para colocar sempre tudo no lugar, muito obrigado Bianca Teixeira, Hallana Bonifácio, Laryssa Bonifácio, José Roberto, Tarcísio Bonifácio e Venâncio Junior.

Ao Professor Ian Amaral, por todo suporte intelectual e pelos ensinamentos passados durante todo o tempo de duração do mestrado. Ao Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMA) e todos os seus componentes, por todo suporte e ajuda, um laboratório que me orgulho de fazer parte de sua história.

A todos os outros amigos e colegas que fizeram parte de alguma forma da realização desse projeto.

A Universidade Federal da Paraíba, pelo espaço cedido para realização do projeto e por todas as dificuldades que nos forçam a ser melhores pessoas e pesquisadores. A CAPES pelo apoio financeiro.

A todos, Muito Obrigado!

RAVILLY, Ray Alves Arruda. Associação dos exometabólitos na interação entre *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* em meio aquoso. João Pessoa, 2019. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular – Microbiologia) – Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, 2019.

RESUMO

A secreção de metabólitos com atividade antimicrobiana é uma das estratégias empregadas por bactérias como resposta aos estímulos negativos promovidos durante a competição interespecie. Em sua fase estacionária *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* podem sintetizar exometabólitos difusíveis cuja ação é inibir mutuamente as células expostas, garantindo o equilíbrio de ambas as populações num determinado sítio. A primeira pode levar vantagem em razão da produção de piocianina. Entretanto, a excreção de indol e acetato pela *E. coli* pode equilibrar esta vantagem. Este trabalho teve o objetivo de detectar a influência do indol e acetato sobre a síntese de piocianina e adesão da *P. aeruginosa*, bem como a ação da piocianina sobre as células viáveis de *E. coli*, bem como de sua adesão. Para isso, foram conduzidos ensaios *in vitro* de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), de extração e quantificação de piocianina e da adesão, pelo método do cristal violeta. A síntese de piocianina por *Pseudomonas aeruginosa* foi reduzida em até 50% na presença do indol. Por outro lado, não foi observada alteração na produção do pigmento na presença de acetato, isoladamente ou associado com concentrações menores que 0,5 mM, refletindo um aumento de mais de 20% da produção de piocianina. O indol também se mostrou eficaz na redução da adesão de células de *Pseudomonas aeruginosa*, comparadas ao controle. Para as linhagens de *E. coli*, a CIM de piocianina foi 37,5 µg/mL, reduzindo também a adesão celular. Observou-se que apesar da inibição ter ocorrido, nenhum exometabólito promoveu efeito biocida nas linhagens avaliadas. Os resultados contribuem para a auxiliar a compreensão dos mecanismos ecológicos que ocorrem durante a competição entre estas duas espécies bacterianas em meio aquoso.

Palavras-chave: Piocianina, Indol, Acetato, Ecologia microbiana, Coexistência

RAVILLY, Ray Alves Arruda. Associação dos exometabólitos na interação entre *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* em meio aquoso. João Pessoa, 2019. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular – Microbiologia) – Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, 2019.

ABSTRACT

The secretion of metabolites with antimicrobial activity is one of the strategies employed by bacteria in response to negative stimuli promoted during interspecies competition. In its stationary phase *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* can synthesize diffusible exometabolites whose action is to mutually inhibit the exposed cells, ensuring the balance of both populations in a given place. The former may have an advantage due to the production of pyocyanine. However, the excretion of indol and acetate by *E. coli* can balance this advantage. This study aimed to detect the influence of indol and acetate on the synthesis of pyocyanin and adhesion of *P. aeruginosa*, as well as the action of pyocyanin on viable *E. coli* cells, as well as its adhesion. For this purpose, in vitro tests were conducted to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), extraction and quantification of pyocyanin and adhesion by the violet crystal method. The synthesis of piocyanin by *Pseudomonas aeruginosa* was reduced by up to 50% in the presence of indol. On the other hand, no change in pigment production was observed in the presence of acetate, alone or associated with concentrations lower than 0.5 mM, reflecting an increase of more than 20% in piocyanine production. Indol was also effective in reducing the adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* cells compared to control. For the *E. coli* strains, the MIC of pyocyanin was 37.5 µg/mL, also reducing cell adhesion. It was observed that despite the inhibition having occurred, no exometabolite promoted biocidal effect in the evaluated strains. The results contribute to the understanding of the ecological mechanisms that occur during the competition between these two bacterial species in aqueous medium.

Key words: Pyocyanin, Indole, Acetate, Microbial ecology, Coexistence

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Cultura de <i>Escherichia coli</i> , linhagem UFPEDA 224, desenvolvida em ágar nutriente.....	12
Figura 2 – Cultura de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , linhagem TGC04, desenvolvida em ágar King A.....	14
Figura 3 – Fórmula estrutural da piocianina	15
Figura 4 – Passos da biossíntese de piocianina por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15
Figura 5 – Etapas de formação de um biofilme em <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
Figura 6 – Aspectos da extração de piocianina	22
Figura 7 – Influência do indol e acetato na produção de piocianina por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> TGC02.....	28
Figura 8 – Influência do indol e acetato na produção de piocianina por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> TGC04.....	29
Figura 9 – Comparação do percentual de adesão entre as linhagens de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> tratadas com indol (48 h) e o controle (ausência de indol)	31
Figura 10 – Comparação do percentual de adesão entre as linhagens de <i>Escherichia coli</i> tratadas com 37,5 µg/mL de piocianina e o controle, sem piocianina (48 h).....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Condições do ensaio da ação de exometabólitos de <i>Escherichia coli</i> sobre a produção de piocianina por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> TGC02 e TGC04	24
Tabela 2 – Concentração inibitória mínima sobre linhagens de <i>Escherichia coli</i>	26
Tabela 3 – Concentrações de piocianina (µg/mL) exibida por TGC02 e TGC04 na presença de exometabólitos de <i>Escherichia coli</i>	27
Tabela 4 – Densidade ótica e características dos biofilmes formados pelas linhagens de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> na presença de indol em 48 h.....	29
Tabela 5 – Densidade ótica e características dos biofilmes formados pelas linhagens de <i>Escherichia coli</i> na presença de 37,5 µg/mL de piocianina em 48 h	32

SUMÁRIO

<u>1</u>	<u>INTRODUÇÃO.....</u>	<u>12</u>
1.1	BIOFILMES	16
1.2	<i>ESCHERICHIA COLI</i>	12
1.3	<i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	13
1.4	RELAÇÕES ECOLÓGICAS ENTRE BACTÉRIAS	19
<u>2</u>	<u>OBJETIVOS</u>	<u>21</u>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	21
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
<u>3</u>	<u>MATERIAL E MÉTODOS</u>	<u>22</u>
3.1	LOCAL DE ESTUDO	22
3.2	MICROORGANISMOS	22
3.3	PRODUÇÃO, EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PIOCIANINA	22
3.4	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA	24
3.5	TESTE <i>IN VITRO</i> DA AÇÃO DO INDOL E ACETATO SOBRE A SÍNTESE DE PIOCIANINA.....	24
3.6	ENSAIOS <i>IN VITRO</i> DE FORMAÇÃO DE BIOFILME	25
3.7	TRATAMENTO ESTATÍSTICO	26
<u>4</u>	<u>RESULTADOS</u>	<u>27</u>
4.1	AÇÃO ANTIMICROBIANA DA PIOCIANINA SOBRE <i>ESCHERICHIA COLI</i>	27
4.2	TESTE <i>IN VITRO</i> DO INDOL E ACETATO SOBRE A PRODUÇÃO DE PIOCIANINA POR <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	27
4.3	ENSAIO <i>IN VITRO</i> DA FORMAÇÃO DE BIOFILME DE <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	30
4.4	ENSAIO <i>IN VITRO</i> DA FORMAÇÃO DE BIOFILME DE <i>ESCHERICHIA COLI</i>	33
<u>5</u>	<u>DISCUSSÃO</u>	<u>35</u>
<u>6</u>	<u>CONCLUSÃO.....</u>	<u>40</u>
	<u>REFERÊNCIAS.....</u>	<u>41</u>

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Escherichia coli*

A *E. coli* é um bacilo Gram-negativo facultativo, não formador de esporos, medindo entre 1,1-1,5 μm por 2,0-6,0 μm , móvel devido a presença de flagelos peritríquios. A bactéria pertence ao grupo coliforme, sendo considerada o único coliforme fecal verdadeiro, pois ocorre no trato intestinal de animais de sangue quente (THAKER, 2007; BARBOSA et al., 2009; APHA, 2012; SHARMA et al., 2016).

Em 1884, o pediatra e microbiologista alemão Theodor Escherich, descobriu uma bactéria de rápido crescimento, inicialmente denominada por *Bacterium coli commune*, posteriormente alterado por Migula, para *Escherichia coli*, em homenagem ao seu descobridor (SHULMAN et al., 2007; ZIMMER, 2008). Características importantes relacionadas à ecologia e fisiologia da *E. coli* (Figura 1), tais como ocorrência, facilidade no manejo e alta taxa de crescimento, tornaram a bactéria um organismo modelo desde o início do século XX (BLOUNT, 2015). Desde sua descoberta, a *E. coli* contribuiu para importantes pesquisas e descobertas no ramo da ciência, servindo como base de estudos inovadores sobre fisiologia bacteriana, virologia e biologia molecular. A bactéria também foi o organismo em que os aspectos mais básicos da vida foram primeiramente explorados, por exemplo, o código genético e os processos de replicação, transcrição e tradução do material genético celular (CRICK et al., 1961; NIREMBERG et al., 1965; DAEGELEN et al., 2009; KAWECKI et al., 2013).

Figura 1 – Cultura de *Escherichia coli*, linhagem UFPEDA 224, desenvolvida em ágar nutriente



Fonte: Ray Arruda, 2019)

A temperatura ótima de crescimento em *E. coli* é 37°C. A bactéria utiliza fermentação como via metabólica alternativa e assimila diferentes açúcares, incluindo uma variedade de mono- e dissacarídeos, entretanto não possui a capacidade de crescimento em polissacarídeos complexos, por não constituir de hidrolases necessárias para quebra destes compostos. *E. coli* forma dois importantes exometabólitos: indol e acetato. Em condições de estresse celular, levados por pressões exercidas pelo ambiente, com destaque à competição, ambos exometabólitos resultam na perturbação do crescimento de outros microrganismos competidores (FABICH et al., 2008; LEE et al., 2011).

O indol é formado a partir da metabolização do triptofano (CHU et al., 2011). Concentrações entre 0,5 a 1 mM podem regular as respostas da *E. coli* aos estresses exercidos quando em competição com *Pseudomonas aeruginosa* (GAMSTER et al., 2014). O indol é importante metabólito em *E. coli*, pois modula características fisiológicas importantes, tais como quimiotaxia (BANSAL et al., 2007), motilidade (LOPES et al., 2011), adesão à superfícies (HIRAKAWA et al., 2009) e proteção contra uma variedade de antibióticos (LEE et al., 2010).

Por outro lado, o acetato é formado, em aerobiose, como subproduto do metabolismo, quando a taxa de absorção da fonte de carbono, por exemplo, glicose é maior que sua conversão para biomassa e CO₂. Primariamente o acetato serve como fonte alternativa de energia, porém o composto pode atuar retardando o crescimento de organismos competidores, mesmo em concentrações cerca de 6,09 mM, possivelmente pela inibição da síntese proteica (KLEMAN; STROHL, 1994; MEY et al., 2007).

1.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa (Figura 2) é um bacilo não fermentador Gram-negativo, aeróbio, dotado de flagelo monotríquio e medindo 0,5 µm de largura, por 1,5 µm de comprimento. A bactéria é o principal membro do grupo das pseudomonadas fluorescentes e inicialmente foi descrita como *Bacterium aeruginosarum*, *Bacillus pyocyaneus* e *Pseudomonas pyocyanea* (MIGULA, 1894; 1900 apud BERGEY'S MANUAL, 1984; YI-CHI; ZAO-HONG; YING, 2015). *P. aeruginosa* ocorre preferencialmente no solo e na água doce e fresca. Uma de suas maiores características diz respeito à alta adaptabilidade às variadas condições físico-químicas, conferindo ubiquidade, bem como uma destacada versatilidade metabólica e

resiliência em vários ambientes com alta carga de pressão seletiva, atribuindo à espécie, vantagens seletivas sob condições desfavoráveis (PIRNAY et al., 2005; ARRUDA, 2013).

Figura 2 – Cultura de *Pseudomonas aeruginosa*, linhagem TGC04, desenvolvida em ágar King A



Fonte: Ray Arruda, 2018)

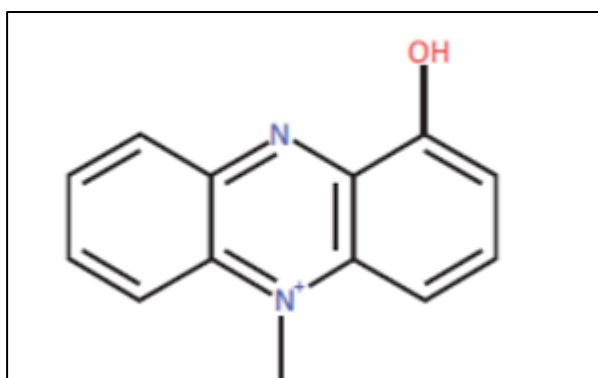
Versátil metabolicamente, *P. aeruginosa* pode assimilar diferentes moléculas orgânicas dentre carboidratos, proteínas, ácidos graxos, hidrocarbonetos e outros substratos, sendo descrito na literatura o uso de mais de 90 moléculas como fonte de carbono e energia. Além disso, apresenta resistência a uma série de compostos antimicrobianos. Isto é atribuído à baixa permeabilidade de membrana, que atua como barreira seletiva, como também à sua habilidade em formar biofilme. Neste contexto, *P. aeruginosa* é dotada de diversos mecanismos que a conferem vantagens frente a outros microrganismos, os quais incluem a produção de enzimas inativadoras, motilidade, produção de alginato, utilização de bombas de efluxo, mutações cromossômicas e a síntese de betalactamases, dentre outros (MAIA et al., 2009; SCOTT-THOMAZ, 2010; STREETER; KATOULI, 2016).

A bactéria sintetiza pelo menos seis pigmentos, importantes para sua manutenção nos diferentes ambientes: fluoresceína (amarelo), pioverdina (verde), aeruginosina A (vermelho), aeruginosina B (vermelho), piomelanina (marrom) e piocianina. Este último, de coloração azul brilhante é um composto fenazínico, sintetizado exclusivamente por 90-95% das linhagens e seu principal mecanismo de ação envolve a redução e eliminação do íon ferro (Fe^{3+}). Porém, a piocianina apresenta outras atividades, tais como antibacteriana e antifúngica (FERGUSON et al., 2007; ABU et al., 2013; JAYSEELAN; RAMASWAMY; DHARMAJ, 2014). Em complemento, o pigmento está associado à participação nas reações de óxido-redução que

culmina na produção e acúmulo de peróxido e superóxido de hidrogênio (O'MALLEY et al., 2003; BAHARI et al., 2017).

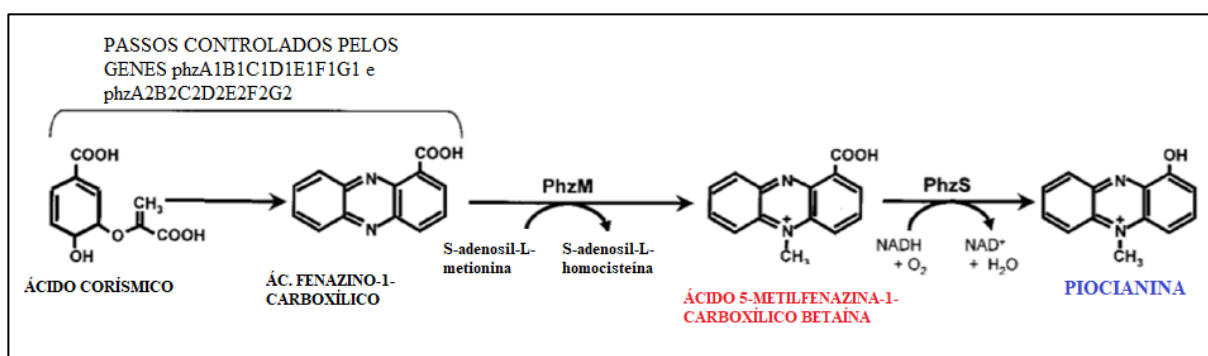
A piocianina (Figura 3) foi a primeira fenazina natural descrita na literatura. O composto deriva da via do ácido chiquímico, a partir do ácido corísmico e possui duas subunidades de N-metil-1-hidroxifenazina em sua composição (MAVRODI et al., 2001; DIETRICH et al., 2013).

Figura 3 – Fórmula estrutural da piocianina (adaptado de Rada e Leto, 2013).



A Figura 4 ilustra os passos de síntese da piocianina.

Figura 4 - Passos da biossíntese de piocianina por *Pseudomonas aeruginosa*. (adaptado de MAVRODI et al., 2001).



A conversão do ácido corísmico em ácido fenazino-1-carboxílico (PCA) é codificada por dois operons e controlada por sete genes. Em seguida, dois passos são sugeridos para a síntese de piocianina, regulados por outros dois genes, *phzM* e *phzS*, a partir do PCA. No primeiro é formado o ácido 5-metilfenazina-1-carboxílico betaína, catalizado pela enzima metiltransferase fenazina-específica (PhzM), que é uma S-adenosilmetionina transferase metil-dependente. Já o segundo passo é catalisado pela enzima mono-oxigenase flavina dependente (PhzS), que promove

a hidroxilação da betaína do ácido 5-metilfenazina-1-carboxílico betaína em 1-hidróxi-5-metil fenazina, isto é, piocianina, de cor azul brilhante (JAYASEELAN; RAMASWAMY e DHARMARAJ, 2014; MAVRODI et al., 2001). A síntese de piocianina é regulada pelo sistema *rhl*, responsável pelo fenômeno de *quorum-sensing*, processo dependente da densidade celular e mantido pela secreção e assimilação de autoindutores, especialmente homosserrina lactonas (BAHARI et al., 2017; PRICE-WHELAN et al., 2006; PRICE-WHELAN et al., 2007; KIPNIS et al., 2006).

1.3 Biofilmes

Nos microambientes, as bactérias podem exibir dois estilos de vida: o primeiro, planctônico, caracterizado pela vida livre, em que as células se dispersam isoladamente, parte de um importante processo de proliferação e propagação do microrganismo no ambiente (TRENTIN et al., 2014). A segunda, séssil, representada por estruturas complexas denominadas por biofilmes. O termo biofilme foi cunhado no final dos anos 1970, porém os estudos que sugerem tais formações datam da década de 1930 (COSTERTON, 1995). Entretanto, há cerca de 30 anos é estabelecido que os biofilmes constituem o sistema preferencial de vida microbiana. Entretanto, não é consenso entre a comunidade científica, pois parte dos especialistas acreditam que tais estruturas sejam “berçários” para células planctônicas, considerada por eles, a forma preferencial de vida microbiana (EMERENINI et al. 2015).

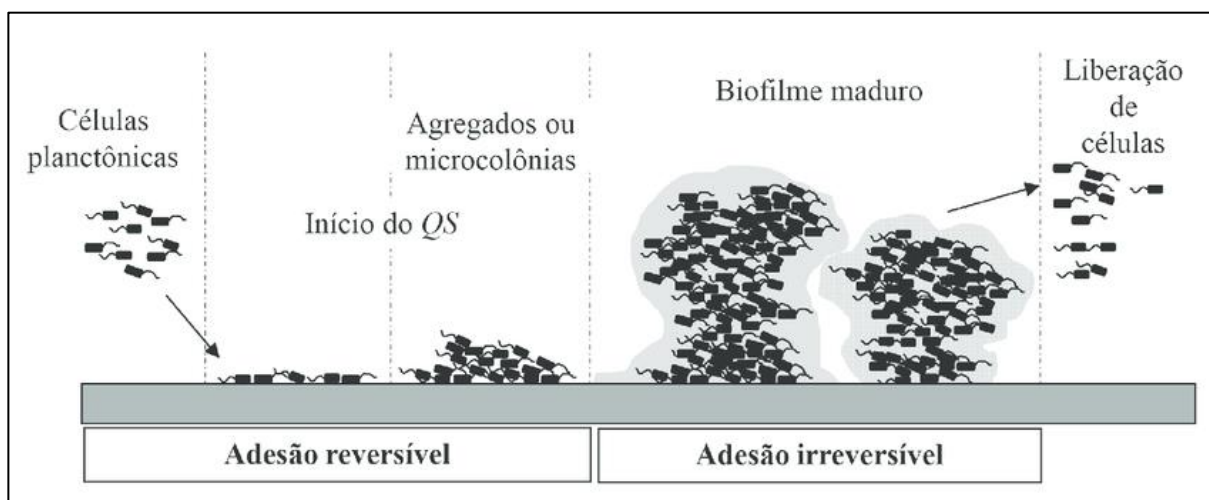
Os biofilmes são compostos por comunidades biológicas com elevado grau de organização, porém altamente dinâmicas, envoltas por uma matriz polimérica de aspecto gelatinoso, composta por exopolissacarídeos (EPS), frequentemente encontrados aderidos em superfícies sólidas e nos ambientes úmidos (MANGWANI; KUMARI; DAS, 2015). Ressalta-se que a organização das células em biofilmes oferece vantagens que tornam as bactérias mais resistentes e virulentas, visto que protege as células da perda de umidade, aumenta proporcionalmente a concentração de nutrientes, proporciona as trocas horizontais de material genético, por meio de plasmídios e dificulta a penetração de antibióticos convencionais, tornando as células menos susceptíveis a agentes antimicrobianos (ITO et al., 2009; MITTAL et al., 2015).

O biofilme possui uma arquitetura extremamente organizada. A matriz extracelular representa tipicamente 60-65% do volume do biofilme, ao passo que as células representam de 5-35% (JAMALA et al., 2018). Diferentes tipos de componentes estão presentes nas matrizes poliméricas extracelulares: água (97%), proteínas (>2%), polissacarídeos (1-2%), DNA (<1%), RNA (<1%) e íons. O fluxo de nutrientes essenciais dentro de um biofilme é atribuído ao teor

de água (LU; COLLINS, 2007) e a arquitetura exibida, seja na forma de pilar, seja na forma de cogumelo, também depende da natureza e concentração de nutrientes (KLAUSEN et al., 2003).

Os modelos atuais de organização e arquitetura dos biofilmes bacterianos foram propostos a partir de estudos com *Pseudomonas aeruginosa* (PASSOS DA SILVA et al., 2017). O ciclo de formação de biofilmes, dependendo do autor, pode ser dividido em 4 ou 5 etapas, quando a migração das células planctônicas em direção ao substrato é considerada (BUSSCHER et al. 1995). Neste trabalho, será considerado que as etapas de formação de um biofilme são quatro (Figura 5), a saber: (I) adesão ou fixação inicial (reversível), (II) desenvolvimento precoce da estrutura de biofilme (irreversível), (III) maturação e (IV) dispersão (SUTHERLAND, 2001; LAVERTY et al., 2014).

Figura 5 – Etapas da formação de um biofilme em *Pseudomonas aeruginosa*



QS – Quorum sensing

Fonte: Trentin et al. (2014)

Na etapa de adesão (I), o biofilme pode ser formado em ambientes que apresentem condições favoráveis ao microrganismo. A presença dos nutrientes regerá se a adesão ocorrerá de forma definitiva, razão pela qual esta etapa pode ser interrompida. A superfície ou matriz para adesão das células, também denominado por substrato condicionante, pode ser de natureza abiótica (metal, vidro, rocha, concreto, cerâmica, madeira e plástico, dentre outros). As superfícies bióticas podem ser exemplificadas por células epiteliais, tecidos animais e tecidos vegetais (BELOIN et al., 2008; HENRIQUES et al., 2013).

Condições ambientais, forças eletrostáticas e hidrodinâmicas repulsivas podem atuar sobre a adesão de células em determinadas superfícies, inibindo assim formação do biofilme, dessa forma essa fase se caracteriza como reversível visto que em condições não favoráveis o microrganismo pode se dispersar em busca de um novo ambiente (BELOIN et al., 2008). O sucesso na adesão de bactérias Gram-negativas, por exemplo *Escherichia coli*, é extremamente dependente da presença de apêndices celulares como *pili* e flagelos, essenciais para que as células bacterianas superem as forças repulsivas atuantes entre a superfície celular e a superfície do material de adesão, ambas de carga negativa. Neste contexto, os apêndices celulares encontrados nas diferentes linhagens de células bacterianas contribuem ao processo primário de formação do biofilme, auxiliado também por forças eletrostáticas, tais como forças de van der Waals e pontes de hidrogênio, dentre outras (DOREL et al., 2006; MACIA et al., 2014; JAMALA et al., 2018).

Após a adesão do microrganismo à superfície, ocorre a ligação definitiva e irreversível das células bacterianas à matriz, caracterizada por um intenso processo de multiplicação e divisão celular que se inicia por meio de estímulos químicos ocorridos no interior da matriz exopolissacarídica. Todo esse processo culmina na formação de microcolônias, que se coordenam entre si em múltiplos aspectos, tais como a troca de substrato, distribuição de metabólicos e intermediários, assim como excreção de produtos finais do metabolismo (COSTERTON et al, 1999; JAMALA et al., 2018).

A terceira etapa da formação de um biofilme é denominada por maturação. Nela, o número de células bacterianas aumenta e o biofilme adquire uma conformação tridimensional em pilar ou cogumelo, unidos por canais intersticiais preenchidos com água que auxiliam no transporte de nutrientes, bem como a dispersão de metabólitos e gases. Nesta etapa também, mais EPS é produzido. Conforme a densidade populacional bacteriana aumenta, os níveis de sinalizadores químicos ou autoindutores podem se acumular e induzir a transcrição de genes específicos, os quais atuam na regulação de várias respostas, dentre elas, motilidade, resistência, produção de matriz exopolissacarídica e expressão de flagelina. Este processo de comunicação química, densidade celular dependente, em que moléculas de baixa massa molecular, produzidas em níveis basais, após serem assimiladas, participam da transcrição de genes específicos é definido por *Quorum sensing* (QS) (TRENTIN et al., 2013; JAMALA et al., 2018).

A quarta e última fase do biofilme consiste na dispersão celular. Esta fase não é mais considerada um evento passivo, mas sim totalmente orquestrada, que desencadeia o

desprendimento de células na sua forma planctônica da matriz polimérica do biofilme. As células que irão sofrer a dispersão reprimem a expressão de genes que codificam EPS e fímbrias e, simultaneamente, aumentam a expressão de genes que culminam na síntese de proteínas quimiostáticas e flagelinas. Além disso, a região de dispersão é mais frouxa em razão da expressão de liases, que participam da quebra e liberação das células planctônicas em direção do fluxo (KUMAR et al., 2017).

1.4 Relações ecológicas entre bactérias

As interações entre duas populações bacterianas podem ocorrer, em tese, por meio de oito tipos de relações ecológicas, denominadas por positivas (comensalismo, protocooperação e mutualismo) ou negativas (inibição mútua por competição, competição pela utilização de recursos, amensalismo e parasitismo). O neutralismo, como sugere o nome, não há interferências entre as populações (ODUM, 2004).

Essas interações se dão pelo reconhecimento ambiental, seguido da transferência de informações moleculares e genéticas que incluem uma diversidade de mecanismos e classes moleculares (JIMENEZ et al., 2012; BRAGA et al., 2016). Os microrganismos dificilmente são encontrados em habitats como populações axênicas. As populações existentes nos variados habitats, tais como solo, sedimento, rizosfera, água e até o ar, revelam uma população mista, extremamente diversa, sugerindo que as interações realizadas por eles são essenciais para sua implantação e manutenção, bem como na existência do próprio ecossistema, implicando no fato de que a interação resulta o equilíbrio e não a exaustão ou eliminação dos organismos competidores, uma vez que cada um possui papel definido no meio (FAUST; RAES, 2012).

Em ambientes naturais os microrganismos comumente formam comunidades complexas multicelulares que respondem coletivamente a sinais advindos do local em que estão inseridos. Estas comunidades podem ser formadas por bactérias da mesma espécie ou bactérias de espécies distintas (LOPES et al., 2011; MOLINA-SANTIAGO et al., 2017). Nos ambientes aquáticos, espécies distintas podem coexistir sob competição em comunidades mistas na forma de biofilmes. Geralmente, a relação de antagonismo ocorre nesses ambientes, representada pela antibiose, originada pela competição por nutrientes, interações diretas entre competidores ou indução à resistência (BENNING et al., 2003).

No contexto das interações entre bactérias, os sistemas de sinalização dependente de densidade celular, QS, também participam e regulam as respostas. Os autoindutores se

caracterizam por baixa massa molecular, fácil assimilação e produção em níveis basais. Dentre eles, os mais estudados são acil-homosserinas lactonas, alguns antibióticos, compostos voláteis, peptídeos de sinalização e piocianina, dentre outros (DUAN et al., 2009; FLEMMING et al., 2016; MADSEN et al., 2016). As propriedades desses sinais e a resposta por eles desencadeada são importantes para garantir o desenvolvimento e resistência bacteriana em ambientes naturais onde coexistem centenas de espécies bacterianas (JAYARAMAN e WOOD, 2008).

Moléculas autoindutoras sintetizadas e excretadas por microrganismos podem não só estimular mecanismos de QS em outras espécies que estejam inseridos em um mesmo ambiente, como também são capazes de gerar a indução do efeito *Quorum quenching* (QQ), que se dá quando determinado composto químico atua na inibição da sinalização química que ocorreria entre microrganismos, ou seja, é a inibição do mecanismo comum de *Quorum sensing* (WEIHUA et al, 2012). Algumas espécies bacterianas podem utilizar o efeito QQ visando seu estabelecimento no meio.

Atualmente o acesso do homem a água potável tem se tornado uma questão bastante preocupante em nível mundial. A distribuição de uma água com a melhor qualidade sanitária possível é essencial para o consumo humano, visto que sua contaminação resulta num meio para transmissão de doenças.

Parâmetros físicos, químicos e biológicos podem ser empregados visando atestar a qualidade da água, agentes biológicos como bactérias, fungos e protozoários são importantes fontes de contaminação da água (CANTÚSIO; SANTOS; FRANCO, 2008). *Escherichia coli*, é aceita como o principal indicador de contaminação fecal e sua presença pode determinar a potabilidade da água (BRASIL, 2005).

Dessa forma, o presente trabalho possuiu o intuito de buscar compreender a interação ecológica existente entre *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, visto que de certa forma essa relação pode mascarar uma provável contaminação da água, caso a presença da *Pseudomonas aeruginosa* impeça a detecção nos testes da *Escherichia coli* nas amostras.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade de exometabólitos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, importantes para a coexistência entre estas espécies em meio aquoso.

2.2 Objetivos específicos

- ❖ Produzir, extrair e quantificar a piocianina sintetizada pelas linhagens de *P. aeruginosa*;
- ❖ Determinar a concentração inibitória mínima de piocianina nas linhagens de *E. coli*;
- ❖ Testar o efeito do indol e acetato frente a produção de piocianina nas linhagens de *P. aeruginosa*;
- ❖ Identificar o efeito do indol sobre a formação de biofilme das linhagens de *P. aeruginosa*;
- ❖ Analisar o efeito da piocianina sobre a formação de biofilme das linhagens de *E. coli*;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de estudo

Os estudos e experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMA), localizado no Centro de Biotecnologia (CBiotec) da Universidade Federal da Paraíba – UFPB campus I.

3.2 Microrganismos

Foram utilizadas três *P. aeruginosa*, duas selvagens e uma padrão, UFPEDA 416, cedida pela Prof^a Gláucia Manoella de Souza Lima, curadora pela coleção de cultura do Departamento de Antibióticos da UFPE. Os isolados selvagens TGC02 e TGC04, são originados de solo de posto de gasolina da cidade de João Pessoa, Brasil (CAVALCANTI et al., 2019). Todas as linhagens exibiram a síntese de piocianina pelo cultivo à 30°C por 72h em caldo King A (KING et al., 1954) e ágar cetrimida (GENHARDT et al., 1994).

Quatro *E. coli*, três selvagens, provenientes de ralos de salões de beleza da região metropolitana de João Pessoa, AV01, AV12 e AV14 (VIANA et al., 2017) e uma linhagem padrão UFPEDA 224, igualmente cedida da coleção do Departamento de Antibióticos da UFPE.

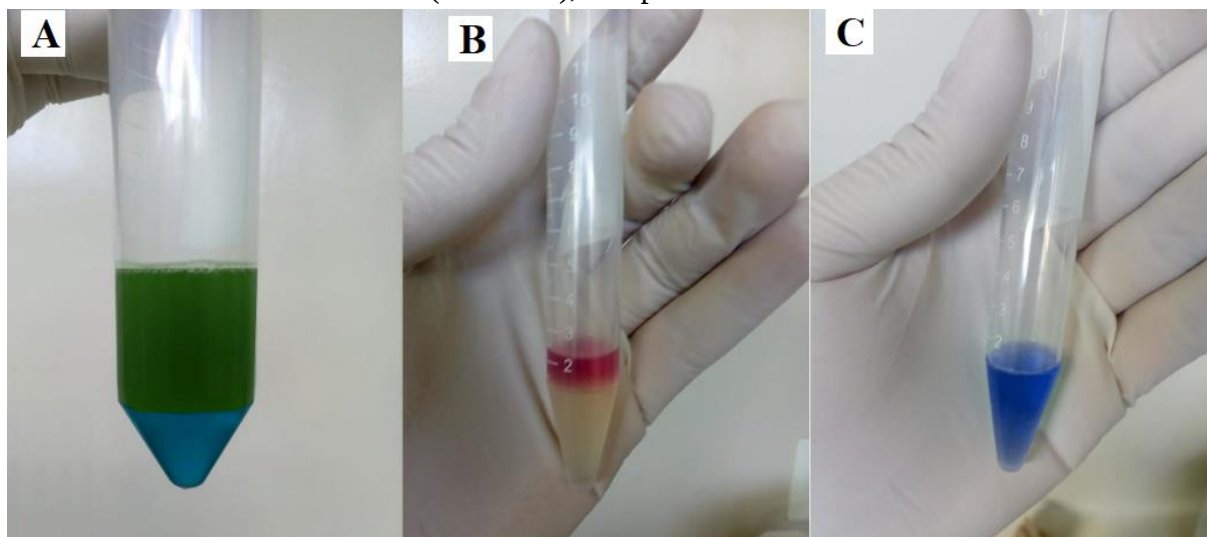
Os isolados escolhidos, atenderam o critério de serem provenientes de ambientes, considerados para este estudo, com elevado grau de pressão seletiva. Os isolados selvagens de *P. aeruginosa* e *E. coli* estão registrados no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associados (SisGen), sob o número, respectivamente, A6B80BD e ABDD69C.

3.3 Produção, extração e quantificação de piocianina

Para estimular a produção de piocianina, a inoculação das linhagens de *P. aeruginosa* foi realizada por meio da transferência de 1 mL de uma suspensão preparada com células de cultivo recente em solução de NaCl 0,85%, padronizada com o tubo nº 1 da escala de MacFarland, para erlenmeyers contendo 200 mL de caldo King A (HASSANI et al., 2011), cuja composição, em g/L é: peptona de carne (20,0), MgCl₂ (1,4), K₂HPO₄ (10,0) e glicerol (10,0 mL/L), pH 7,2±0,2 (KING; WARD e RANEY, 1954). A incubação ocorreu sob agitação constante de 150 rpm à 29±1°C (Nova Instruments NI 1713) por 72h, período necessário para a síntese de piocianina, correspondente à fase estacionária tardia (EL-FOULY et al., 2015).

A extração da piocianina foi conduzida segundo adaptação da metodologia descritas por Devnath, Uddin, Ahamed (2017). O conteúdo dos frascos contendo as células e o pigmento dissolvido foi transferido para tubos falcon com capacidade para 50 mL e em seguida centrifugados a 10.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi retirado e a extração da piocianina foi realizada com a adição de clorofórmio na proporção 2:1. Os tubos foram agitados vigorosamente em vórtex (Warmnest VX-28) e deixados em repouso por uma hora até formação de duas fases. A piocianina na forma protonada ficou retida na fase do clorofórmio, que se tornou azul (Figura 6A). Após o período, adicionou-se uma solução de HCl 0,2 mol/L à uma alíquota da fase protonada, e novamente levou para o vórtex obtendo-se a piocianina em sua forma ácida, de cor vermelha (Figura 6B). Após novo período de repouso de uma hora até separação total das fases. A forma ácida foi reservada para a neutralização com solução tampão Tris-Base até obtenção da piocianina (Figura 6C).

Figura 6 - Aspectos da extração de piocianina: A - forma protonada (azul), B - forma ácida (vermelha), C – piocianina isolada



Crédito da imagem: Ray Arruda

Após 1h de repouso, a concentração da piocianina foi quantificada pela medida da densidade óptica da solução acidificada em $\lambda = 690$ nm (Quimis U2M), tomando como base uma curva padrão, preparada com piocianina com 98% de pureza (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) ($r = 0,9999$).

3.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima

A determinação da CIM da piocianina sobre *E. coli* foi realizada pela técnica de microdiluição (MARTINS et al., 2014). O teste foi realizado para aplicação nos ensaios *in vitro* de inibição da formação do biofilme.

Em placas de microdiluição foram adicionados aos poços, 100 µL de Caldo Nutriente e 100 µL da solução de piocianina. Por meio de uma diluição seriada 1:2, foram obtidas concentrações de 300 até 18,75 µg/mL. Por fim, foram adicionados 10 µL do inóculo das linhagens teste nos poços, preparadas em solução de NaCl 0,85%, padronizada com o tubo nº 1 da escala de MacFarland.

As placas foram incubadas a 37°C por até 48 horas para a realização da leitura. Os valores de CIM foram determinados pela análise visual da inibição do crescimento em cada poço, verificado pela presença de turbidez, comparando os testes com o controle. A CIM foi definida como a menor concentração capaz de inibir 100% o crescimento bacteriano observado nas cavidades. O experimento foi realizado em triplicata (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016).

3.5 Teste *in vitro* da ação do indol e acetato sobre a síntese de piocianina

O teste teve por objetivo conhecer o efeito da adição das concentrações de exometabólitos de *E. coli* sobre a síntese da piocianina por TGC02 e TGC04. Os exometabólitos foram testados isoladamente e em combinação. Os resultados nortearam o ensaio *in vitro* da inibição do biofilme de *P. aeruginosa* por exometabólitos de *E. coli*.

Células de cultivo recente de TGC02 e TGC04 foram suspensas em solução de NaCl 0,85% e a turbidez foi padronizada com o tubo nº 1 da escala de MacFarland. Em seguida, 5 mL da suspensão foram transferidos para frascos contendo 50 mL de caldo King A, adicionado de indol nas concentrações 0,25; 0,5 e 1,0 mM (GAMSTER et al., 2014) e acetato de sódio 1,0, 2,0 e 4,0 mM (KLEMAN; STROHL, 1994), totalizando 16 condições, incluindo controle (Tabela 1). Os frascos foram incubados sob agitação constante de 150 rpm à 29±1°C por 72h (El-Fouly et al., 2015). O teste foi conduzido em triplicata.

Tabela 1 – Condições do ensaio da ação de exometabólitos de *Escherichia coli* sobre a produção de piocianina por *Pseudomonas aeruginosa* TGC02 e TGC04

Condições	Indol (mM)	Acetato (mM)	Condições	Indol (mM)	Acetato (mM)
1	0,00	0,00	9	0,50	0,00
2	0,00	1,00	10	0,50	1,00
3	0,00	2,00	11	0,50	2,00
4	0,00	4,00	12	0,50	4,00
5	0,25	0,00	13	1,00	0,00
6	0,25	1,00	14	1,00	1,00
7	0,25	2,00	15	1,00	2,00
8	0,25	4,00	16	1,00	4,00

3.6 Ensaios *in vitro* de formação de biofilme

O ensaio foi realizado pela técnica do cristal violeta, com adaptações à metodologia descrita por Khare e Arora (2011). Foram testadas duas condições, das quais se buscou verificar a perturbação na formação ou manutenção do biofilme de *E. coli* ou *P. aeruginosa* na presença, respectivamente de piocianina e indol.

O ensaio foi realizado em tubos de microdiluição, contendo 1 ml de caldo nutriente (para *E. coli* e para *P. aeruginosa*). Aos tubos foram adicionados 10 µl de solução da cultura teste, preparadas em solução de NaCl 0,85%, padronizada com o tubo nº 1 da escala de MacFarland. Foram preparados 12 tubos para cada microrganismo-teste. Em seguida, o sistema foi incubado estaticamente à 30°C por um período de 96 h. A cada intervalo de 24 h, o volume de um dos tubos era descartado e as paredes lavadas de 3-5 vezes com água destilada, para remoção de qualquer célula planctônica que possa ter se depositado, reservando-se posteriormente os tubos para secagem de 1h. Em seguida, foram transferidos cerca de 1,5 ml de cristal violeta 1% (Newprov, Pinhais-PR, Brasil) e após 20 minutos, o corante foi descartado. O excesso de corante nas paredes foi removido com água destilada. Uma vez seco, os tubos receberam 1,5 ml de etanol P.A. (Química Moderna, Barueri- SP, Brasil). Após um repouso por 30 minutos, a densidade óptica da solução de cristal-violeta-etanol foi determinada à 590 nm (UV-1601-1601 PC, Shimadzu). O experimento foi conduzido em triplicata.

A partir da determinação da absorbância das amostras foram calculados: (1) o percentual de adesão das células aderidas, empregando a diferença entre as densidades ópticas do teste pelo controle, dividindo pela densidade óptica obtida no teste, multiplicando por 100. O valor encontrado significa uma adesão fraca ($< 40\%$), moderada ($> 40-80\%$) ou forte ($> 80\%$) (RODRIGUES et al., 2010); (2) a presença de células aderentes, conhecida se o valor da absorbância no teste for maior que três vezes a absorbância do caldo empregado no ensaio (PAGANO et al., 2004); (3) a razão entre as densidades ópticas do controle, em, comparação ao obtido no teste. Se esta relação foi > 1 , indica que a presença do exometabólito é indiferente quanto a formação do biofilme, enquanto < 1 , revela um efeito aditivo (LEWIS et al., 2002).

3.7 Tratamento estatístico

Os resultados como média $\pm$ desvio padrão das amostras. A análise estatística foi realizada pelo teste *t the student* e Anova *One-Way*, com teste de Dunnett visando refinar os resultados, para avaliar a diferença dos resultados do teste de contato na presença e na ausência de exometabólitos no meio de formação de biofilme e coloração com violeta de cristal. Foi utilizado o programa Graph Prism 8[®], considerando significativa se o $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Ação antimicrobiana da piocianina sobre *Escherichia coli*

Foi observado um efeito antagônico da piocianina em todas as linhagens de *E. coli* testadas no experimento, em que as linhagens UFPEDA 224, AV01, AV12 e AV14 tiveram seu crescimento inibido pela presença da piocianina. A Tabela 2 mostra os resultados, nos quais o CIM do pigmento foi estabelecido, a partir da detecção de células viáveis em 72 horas.

Tabela 2 – Concentração Inibitória Mínima sobre linhagens de *Escherichia coli*

Concentração (µg/mL)	UFPEDA 224, AV01, AV12, AV14		
	24h	48h	72h
300,0	- - - -	- - - -	- - - -
150,0	- - - -	- - - -	- - - -
75,0	- - - -	- - - -	- - - -
37,5	- - - -	- - - -	- - - -
18,7	- + - +	+ + + +	+ + + +

(+) indica viabilidade das células após período do contato

Todas as linhagens testadas apresentaram sensibilidade à mesma concentração de piocianina. A CIM para as quatro linhagens de *E. coli* foi de 37,5 µg/mL. Observou-se que nas linhagens UFPEDA 224 e AV12, a piocianina exibiu um efeito antimicrobiano inicial na concentração de 18,7 µg/mL com 24h, entretanto, o crescimento microbiano foi verificado no intervalo seguinte, permanecendo assim até o final do ensaio.

4.2 Teste *in vitro* do indol e acetato sobre a produção de piocianina por *Pseudomonas aeruginosa*

Ambos exometabólitos promoveram alterações na produção da piocianina para os isolados TGC02 e TGC04, especialmente o indol. Os resultados estão sumarizados na Tabela 3 e ilustrados nas Fig. 7 e 8. As concentrações de piocianina estão expressas como a média dos três ensaios, com desvio padrão de $\pm 0,10$.

Tabela 3 – Concentração de piocianina ($\mu\text{g/mL}$) exibida por TGC02 e TGC04 na presença dos exometabólitos de *Escherichia coli* (dp $\pm 0,1$)

Condições	Exometabólitos		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	Indol (mM)	Acetato (mM)	TGC02	TGC04
1	0,00	0,00	52,3	52,8
2	0,00	1,00	61,3	54,1
3	0,00	2,00	52,5	54,2
4	0,00	4,00	52,5	53,6
5	0,25	0,00	53,1	55,0
6	0,25	1,00	50,9	53,5
7	0,25	2,00	68,0	52,3
8	0,25	4,00	57,2	53,1
9	0,50	0,00	40,5	38,0
10	0,50	1,00	39,2	35,5
11	0,50	2,00	48,6	40,1
12	0,50	4,00	48,8	41,2
13	1,00	0,00	31,8	28,8
14	1,00	1,00	34,0	35,9
15	1,00	2,00	45,2	37,4
16	1,00	4,00	43,5	40,5

Na ausência dos inibidores, os isolados TGC02 e TGC04 produziram um pouco mais de $50 \mu\text{g/mL}$ de piocianina. Apenas o indol, na concentração a partir de $0,5 \text{ mM}$, garantiu maior perturbação aos isolados de *P. aeruginosa* do ponto de vista da produção de piocianina, reduzindo a síntese cerca de 40 e 50%, para TGC02 e TGC04, respectivamente. Em contrapartida, a concentração de $0,25 \text{ mM}$ de indol não promoveu redução da síntese de piocianina para ambos isolados. Este mesmo resultado foi observado nas condições testadas com o acetato, isoladamente. Surpreendentemente, comparada ao controle, houve um aumento de 15% na produção de piocianina no isolado TGC02 na presença de 1 mM de acetato. Nas demais condições, a concentração de pigmento não foi diferente ao observado no controle, com o aumento de acetato no meio.

Quando associados, indol e acetato, ambos TGC02 e TGC04 também exibiram uma redução da produção de piocianina, a medida que a concentração de indol aumentou. Entretanto, ressalta-se que a concentração do pigmento obtida foi maior quando comparadas aos resultados nas condições apenas em presença do indol.

Figura 7 - Influência do indol e acetato na produção de piocianina por *Pseudomonas aeruginosa* TGC02. A coloração do gráfico de superfície demonstra o nível de produção de piocianina, em que a proximidade do roxo indica uma menor taxa de produção enquanto a proximidade do vermelho mostra uma maior taxa de produção do pigmento

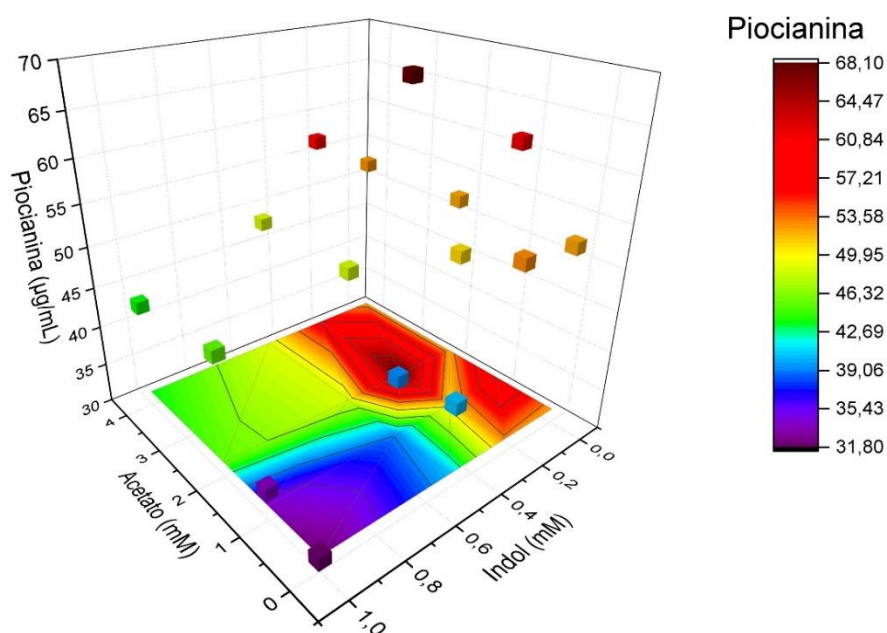
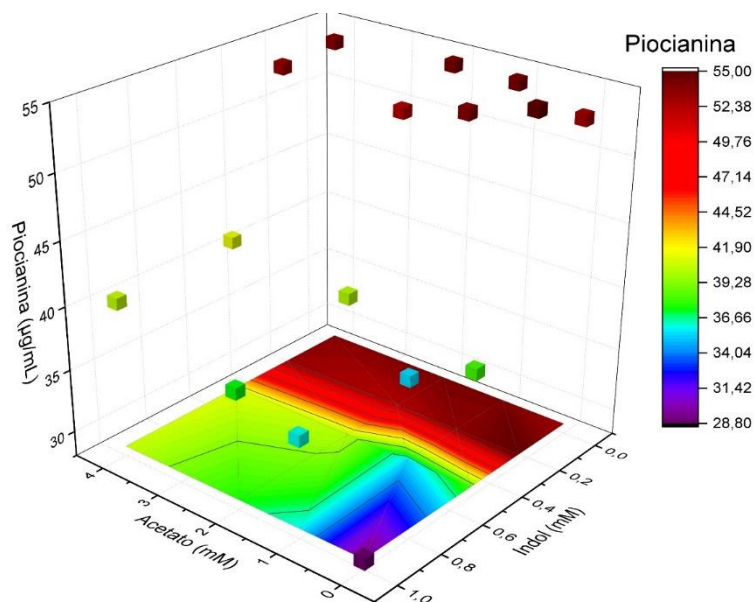


Figura 8 – Influência do Indol e Acetato na produção de piocianina por *Pseudomonas aeruginosa* TGC04. A coloração do gráfico de superfície demonstra o nível de produção de piocianina, em que a proximidade do roxo indica uma menor taxa de produção enquanto a proximidade do vermelho mostra uma maior taxa de produção do pigmento.



4.3 Ensaio *in vitro* da formação de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*

Os resultados referentes à formação de biofilme de *P. aeruginosa* UFPEDA 416, TGC02 e TGC04 (48 horas), na presença do indol, estão sumarizados na Tabela 4.

Tabela 4 – Densidade ótica e características dos biofilmes formados pelas linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* na presença de indol em 48h

Linhagens	Indol (mM)	DO _t (ABS)	PA (%)	TA	PCA	DO _c :DO _t
UFPEDA 416	0,5	1,334	21,1	Fraca	+	0,8
TGC02	0,5	0,366	50,3	Moderada	+	0,5
TGC04	0,5	1,850	43,9	Moderada	+	0,6
UFPEDA 416	1,0	1,554	32,3	Fraca	+	0,7
TGC02	1,0	0,224	25,4	Fraca	+	0,7
TGC04	1,0	1,618	35,8	Fraca	+	0,6

DO – densidade ótica (590 nm) com desvio padrão de 0,01, PA – percentual de adesão das células ao substrato condicionante, TA – tipo da adesão, PCA – presença de células aderentes, DO_c:DO_t – razão da DO do controle e do teste. DO dos controles: UFPEDA 416 (1,052), TGC02 (0,167) e TGC04 (1,038)

A adesão das linhagens de *P. aeruginosa* foi perturbada em função da concentração do indol presente. A concentração de 0,5 mM do exometabólito favoreceu mais os isolados selvagens do que a linhagem padrão UFPEDA 416. O aumento da concentração do indol reduziu a adesão ao substrato condicionante, entretanto, nas duas condições testadas, havia células com potencial aderente. Isto é conhecido determinando-se a média da densidade óptica do meio, em mesmo comprimento de onda (PAGANO et al., 2004). Neste caso foi de $0,062 \pm 0,001$. A presença de células aderentes no ensaio é conhecida pelo teto estabelecido, representado por três vezes este valor (0,186). Assim, todo valor de absorbância acima deste teto é indicativo da presença de células com potencial adesão ao substrato condicionante. Para as linhagens testadas, esta adesão foi fraca, com exceção para TGC02 e TGC04 na presença de 0,5 mM de indol.

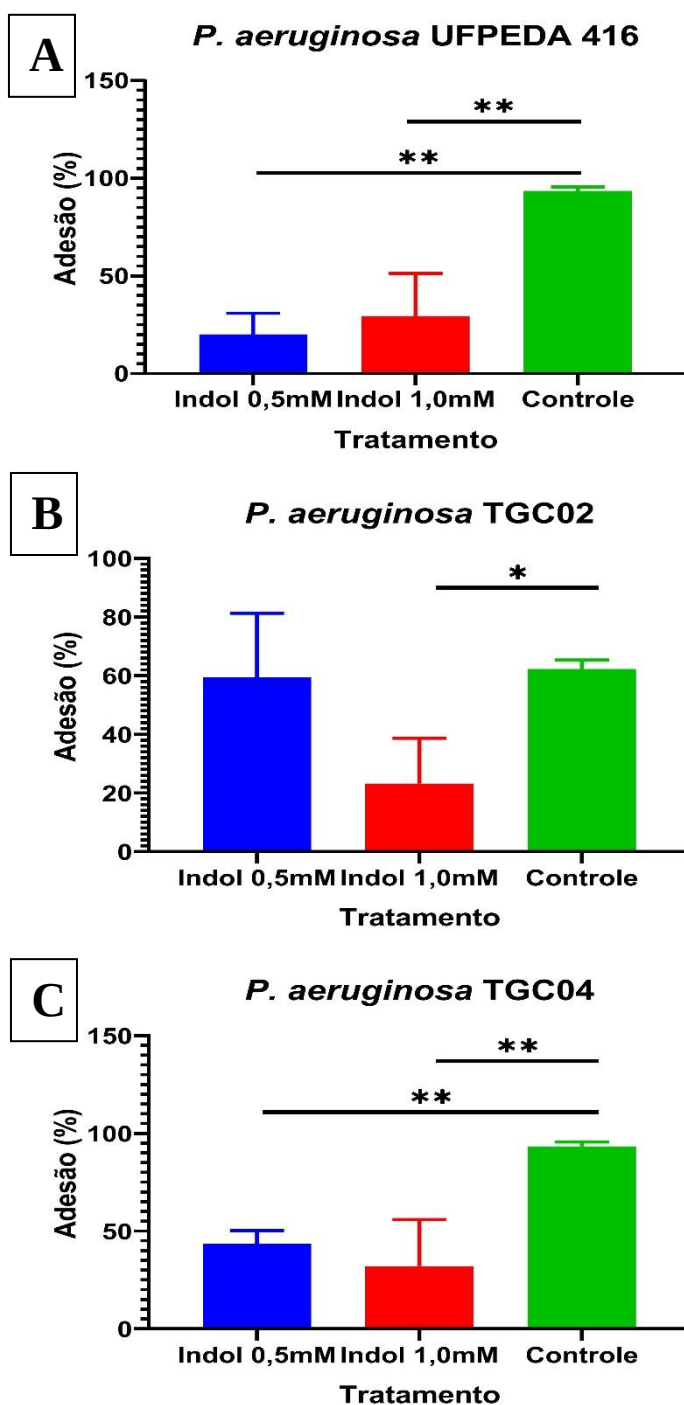
Adicionalmente, o cálculo da razão entre as absorbâncias no controle e no teste revelam o efeito da substância bioativa sobre a adesão das células. Valores entre 0,5 e 1 indicam um efeito aditivo (LEWIS et al., 2002), ou seja, mesmo reduzindo a produção de piocianina, o indol não interferiu na adesão das células de *P. aeruginosa* UFPEDA 416, TGC02 e TGC04 e mesmo ocorrendo fraca ou moderada, em todas as condições, o efeito foi aditivo.

No ensaio da formação do biofilme, quando comparadas as densidades ópticas do controle (isolados de *P. aeruginosa* em caldo) com as densidades ópticas dos isolados submetidos ao estresse representado pela presença do indol nas concentrações de 0,5 e 1,0 mM, observou-se uma redução significativa no percentual de adesão (Figura 9).

O percentual de adesão de *P. aeruginosa* UFPEDA 416 em caldo foi de 93,5%. Ao correlacionar este percentual com os resultados do tratamento com indol, a redução foi significativa, porém não houve diferença estatística nas concentrações testadas de indol, 0,5 e 1,0 mM. Um percentual de adesão semelhante foi observado com *P. aeruginosa* TGC04 em caldo, 93,3%, resultando uma diferença significativa entre o percentual de adesão do controle com relação ao tratamento com indol, assim como entre as concentrações testadas do exometabólito, apontando um efeito mais perturbador da adesão com a concentração 0,5 mM.

Por outro lado, os resultados obtidos com *P. aeruginosa* TGC02, nas concentrações de indol testadas, comparadas ao controle, observou-se uma diferença estatística da aderência das células na maior concentração de indol testada.

Figura 9 – Comparação do percentual de adesão entre as linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* tratadas com indol (48 h) e o controle (ausência de indol): A – UFPEDA 416; B – TGC02 e C – TGC04. A análise de variância *one way* seguida do pós-teste de Dunnett foi utilizada para avaliar os dados de formação de biofilme, considerando significativos * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.



4.4 Ensaio *in vitro* da formação de biofilme de *Escherichia coli*

A Tabela 5 sumariza os resultados referentes à formação de biofilme de *E. coli* UFPEDA 224, AV02, AV12 e AV14 (48 horas), na presença da CIM de piocianina, 37,5 µg/mL.

Tabela 5 – Densidade ótica e características dos biofilmes formados pelas linhagens de *Escherichia coli* na presença de 37,5 µg/mL de piocianina em 48h

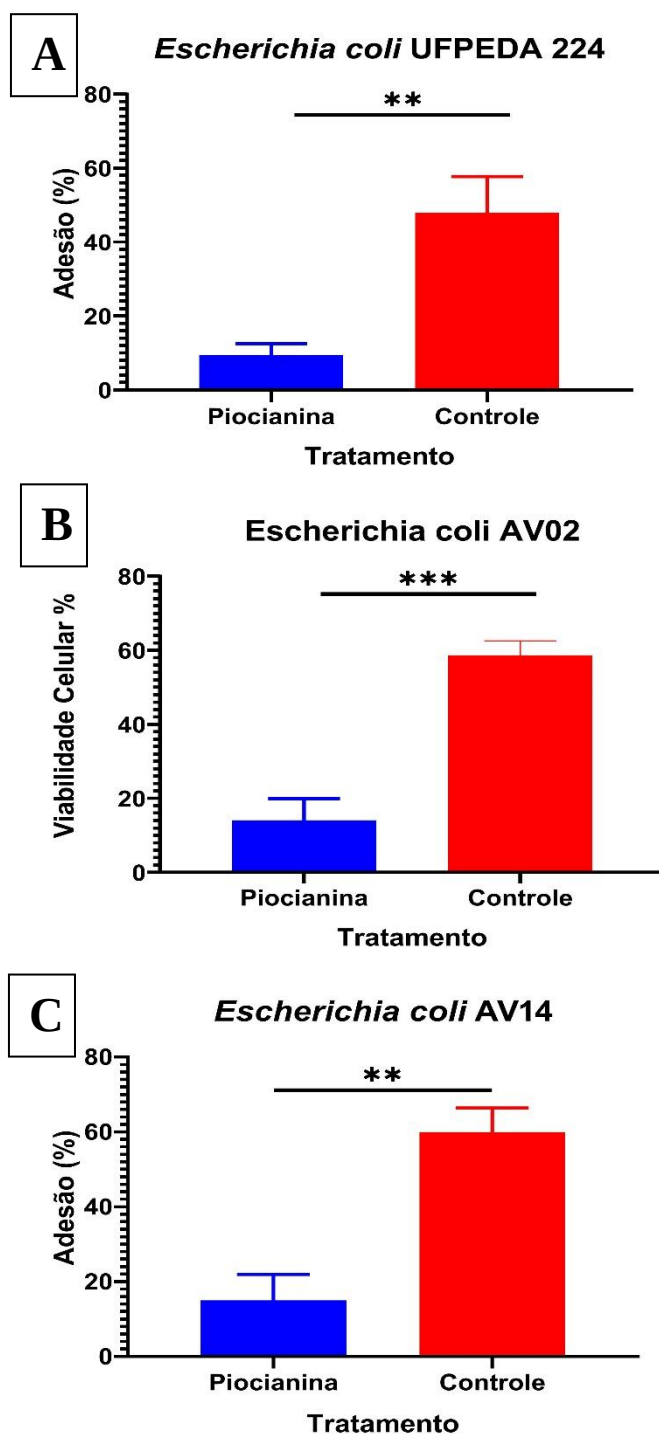
Linhagens	DO _t (ABS)	PI (%)	PA (%)	TA	PCA	DO _c :DO _t
UFPEDA 224	0,137	---	9,5	Fraca	+	0,9
AV02	0,172	---	11,0	Fraca	+	0,9
AV12	0,128	29,3	---	---	+	1,4
AV14	0,189	---	15,3	Fraca	+	0,8

DO – densidade ótica (590 nm) com desvio padrão de 0,01, PI – percentual de inibição da adesão no substrato condicionante, PA – percentual de adesão das células ao substrato condicionante, TA – tipo da adesão, PCA – presença de células aderentes, DO_c: DO_t – razão da DO do controle e do teste
DO dos controles: UFPEDA 224 (0,124), AV02 (0,153), AV12 (0,181) e AV14 (0,160)

A concentração inibitória mínima de piocianina perturbou a adesão das linhagens de *E. coli* de forma estatisticamente significativa, comparada ao controle (Figura 10). No entanto, esta inibição não ocorreu de forma completa, mesmo no caso do isolado AV12. Quando comparados os valores percentuais obtidos neste e no teste de adesão de *P. aeruginosa* na presença do indol, ficou evidente que a piocianina possui mais atividade frente *E. coli* do que o indol à *P. aeruginosa*.

Ressalta-se, no entanto, que em todas as condições, incluindo a que resultou uma inibição da adesão das células cerca de 30% (AV12), havia presença de células com potencial aderente, mesmo esta adesão ter sido considerada fraca. Em complemento, a razão entre as absorbâncias no controle e no teste revelam o efeito aditivo da piocianina sobre a adesão das linhagens de *E. coli*, com exceção para AV12, tratada como indiferente, uma vez que quando os valores desta razão estão acima de 1, indicam tal efeito (LEWIS et al., 2002), ou seja, mesmo inibindo a adesão, na condição do teste, as células de AV12, embora perturbadas, ainda exibiam condições de adesão ao substrato condicionante, mesmo que de forma fraca.

Figura 10 – Comparação do percentual de adesão entre as linhagens de *Escherichia coli* tratadas com 37,5 µg/mL de piocianina e o controle, sem piocianina (48 h): A – UFPEDA 224; B – AV02 e C – AV12. A análise de variância teste t student foi utilizada para avaliar os dados de formação de biofilme, considerando significativos ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$



5 DISCUSSÃO

Há duas formas de vida microbiana na natureza: planctônica e sésil. A segunda, mais ocorrente, garante a formação de comunidades mistas, com elevado nível de organização, cuja manutenção da população em coexistência é garantida por meio de vários mecanismos, nos quais a concentração de nutrientes e a sinalização química se destacam (HIBBING et al., 2010; TASHIRO et al., 2013).

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo Gram-negativo aeróbio, membro das pseudomonadas fluorescentes (ABDUL-HUSSEIN; ATTIA, 2016), caracterizada por uma notável versatilidade metabólica, que a confere ubiquidade, assegurando a persistência em ambientes que exercem diferentes graus de pressão seletiva (PIRNAY et al., 2005; MAIA et al., 2009). Cerca de 90-95% das linhagens produzem piocianina (MAVRODI et al., 2001), pigmento envolvido na produção de espécies reativas de oxigênio (MULLER; MERRET, 2014), pelos quais se acredita constituir um dos principais mecanismos que garantem vantagem da *P. aeruginosa* frente outras bactérias (EL-FOULY et al., 2015).

É de conhecimento na comunidade científica de que em meio aquoso, *P. aeruginosa* e *E. coli* podem interagir (GONZALES-SILES; SJOLING, 2016). Esta associação por vezes representa perturbações especialmente aos coliformes, porém com efeito bioestático e não biocida (VASCONCELOS et al., 2010; VIANA et al., 2017). Para evitar um dano maior que a estase da população de *E. coli*, a bactéria lança do seu arsenal metabólico, visando a sua manutenção no meio, até encontrar condições favoráveis para seu crescimento (CHU et al., 2012; MOLINA-SANTIAGO et al., 2017).

Dessa forma pode-se observar a ação inibitória da piocianina frente as bactérias testadas, onde as linhagens UFPEDA 224, AV02, AV12 e AV14 possuíram uma mesma concentração inibitória mínima do exometabólito testado, onde o CIM estabelecido foi de 0,178 mM de piocianina. Diversos trabalhos na literatura abordam a ação inibitória que a piocianina, onde seu primeiro relato de ação antimicrobiana ocorreu durante a Segunda Guerra Mundial, em um estudo que relata a inibição do crescimento de *E. coli* (WAKSMAN; WOODRUFF, 1940). Acredita-se que o efeito causado pela piocianina, seja ele biocida ou bioestático, é dependente de sua concentração e relatos indicam que sua atividade envolve diferentes mecanismos de ação intracelular, podendo atuar a nível de cadeia respiratória e rompimento do mecanismo de transporte ativo pela membrana, diminuição no suprimento de oxigênio para as células, levando ao acúmulo de superóxido e peróxido de hidrogênio. Além disso, a piocianina

pode degradar o fluxo de elétrons, promovendo um efeito tóxico nas células afetadas (BARON; ROWE, 1981; PRICE-WHELAN et al., 2007; JAYASEELAN et al., 2014).

Mesmo quando aplicadas em concentrações sub-inibitórias, características importantes das enterobactérias podem ser alteradas na presença da piocianina, cinética de crescimento, perfil bioquímico, mecanismos contra o estresse oxidativo, motilidade e produção de biofilme são alguns dos possíveis alvos da ação do composto fenazínico (ANDRADE et al., 2016). Geralmente, a investigação do efeito gerado pela interação composto antimicrobiano/bactéria é realizada apenas para morte (concentração bactericida mínima) ou inibição do crescimento (concentração inibitória mínima) da linhagem bacteriana testada e dar-se menos importância ao estudo de fatores de virulência comumente expressos, como adesinas de superfície polissacarídicas (BRAGA et al., 2000; PAGANO et al., 2004).

Fenômenos ocorridos na superfície externa bacteriana, como a síntese de biofilme, são tão importantes para seu estabelecimento quanto os mecanismos que ocorrem no interior celular. Dessa forma, nosso experimento avaliou a ação da piocianina sobre a adesão de linhagens de *E. coli* (UFPEDA 224, AV02, AV12 e AV14), observando seu efeito quanto a formação de biofilme, já estabelecidos em 24 e 48 horas, em superfícies de poliestireno. Em nossas condições experimentais, a piocianina demonstrou uma potente atividade antiadesão contra os isolados de *E. coli*, onde todas as linhagens tratadas apresentaram taxa de adesão ao poliestireno menores que 20%. Resultados que se assemelham aos ensaios realizados por Pagano e colaboradores (2004), onde a ação da linezolida e vancomicina foi visualizada perante a adesão celular bacteriana a superfície do poliestireno, relatando um efeito antiadesão ocasionado pelos compostos.

Da mesma maneira foi avaliado a ação do indol, um importante exometabólito sintetizado por *E. coli*, testado em isolados de *P. aeruginosa* (UFPEDA 416, TGC02 e TGC04) visando estabelecer seu efeito perante a adesão celular bacteriana em superfície de poliestireno. Resultados se mostraram dependentes a concentração testada, onde a concentração de 1 mM de indol causou maiores reduções na adesão quando comparado a concentração de 0,5 mM. Dados contrários a nossos resultados foram relatados por Kim e colaboradores (2015), onde foi mostrado que o indol, na concentração de 0,4 mM, foi capaz de estimular a síntese de biofilme em *P. aeruginosa*. Relatos científicos indicam que linhagens de *P. aeruginosa* são capazes de sintetizar um composto químico chamado de antranilato, que pode antagonizar os efeitos do indol sobre a formação de biofilme (LEE et al., 2007; KIM et al., 2015). Fator esse que não foi

observado em nossos experimentos, visto que a redução da taxa de adesão celular foi relatada quando ocorreu o contato com o indol.

Outro experimento foi realizado visando estabelecer a relação que ocorre entre exometabólitos produzidos por *E. coli* e suas ações na virulência bacteriana mediada pela síntese de piocianina, realizado em dois isolados de *P. aeruginosa* (TGC02 e TGC04). Dentre os exometabólitos testados, o indol se mostrou mais inibitório à produção de piocianina por ambas TGC02 e TGC04, quando comparado ao acetato, possivelmente em razão de sua toxicidade. Por outro lado, sabe-se que o acetato também pode promover efeito negativo sobre organismos coexistentes com *E. coli*. Concentrações cerca de 20mM de acetato podem retardar o crescimento ou inibir a formação de proteínas em organismos competidores, porém tal concentração não ocorre naturalmente (MEY et al., 2007). Molina-Santiago et al. (2017) demonstraram que o acetato foi um dos principais mecanismos de defesa de *E. coli* K-12 MG1655 frente *P. putida* DOT-T1E.

Por outro lado, enfatiza-se que o acetato reduziu o efeito inibitório do indol sobre os isolados TGC02 e TGC04, quando as duas moléculas estavam associadas, especialmente nas condições em que a concentração do indol foi 0,25 mM, como observado na condição 2mM de acetato e 0,5 mM de indol, quando TGC02 produziu 68 µg/mL de piocianina, representando um aumento cerca de 20% em relação ao controle. Este aparente equilíbrio é sugestivo de que o acetato pode ter sido utilizado como fonte adicional de carbono, baseado numa observação prévia de utilização de acetato por uma linhagem *P. putida* na presença de *E. coli* (MOLINA-SANTIAGO et al., 2017).

E. coli excreta de 10 a 30% do fluxo de carbono da glicose para o acetato em meio contendo glicose, mesmo quando a cultura está totalmente aerada (FARMER; LIAO, 1997). O acetato também pode ser consumido por *E. coli* em termos de fornecer suporte nutricional ao crescimento sob condições de estresse, podendo ser metabolizado por duas vias alternativas: a primeira, Pta-AckA, reversível e a segunda, pela acetil-coA sintetase, irreversível e de alta afinidade (ENJALBERT et al., 2017). Ressalta-se que por também servir como fonte alternativa de carbono para produção de biomassa e energia para *P. aeruginosa*, o acetato é um exometabólito menos danoso para a célula (LOPES et al. 2011).

É importante lembrar que embora houve um maior aporte de carbono, via acetato, em algumas condições, isto não promoveu diferenças significativas na produção de piocianina quando a concentração de indol foi igual ou maior que 0,5 mM, reforçando a hipótese de que o

indol é uma molécula potencialmente mais inibitória. Conhecer a quantidade de indol e de acetato produzidos quando *E. coli* é perturbada em seu ambiente pode contribuir para a elucidação da dinâmica populacional das duas espécies em comunidade mista.

Kuznetsova et al. (2013) reportaram a redução da produção de piocianina em três linhagens-padrão de *P. aeruginosa* quando cultivada em cultura mista com a *E. coli*, atribuindo esta redução à presença de exoprodutos, sem nomeá-los. Entretanto, Chu et al. (2012) estudaram o crescimento de *E. coli* em cultura mista, identificando o indol como molécula anti-quorum sensing para *P. aeruginosa*, o que garantiu a persistência de *E. coli* no meio. Em complemento, Lee et al. (2009) demonstraram que o indol, na concentração de 1,0 mM inibiu 444 genes de *P. aeruginosa*, incluindo aqueles que regulam a produção dos intermediários da síntese da piocianina, tais como *phzC2*, *phzD2*, *phzE2* e *phzF2*, imprescindíveis na conversão do ácido 5-metilfenazina-1-carboxílico betaína (PCA), em 1-hidróxi-5-metil fenazina, i.e., piocianina (MAVRODI et al., 2001).

A biossíntese de piocianina é mediada pelo sistema de quorum sensing (QS) via sistema PQS (MANGWANI et al., 2015). O QS é um mecanismo de sinalização química dependente da densidade celular, utilizado pela *P. aeruginosa* para garantir, dentre outras respostas, a estabilidade de sua população em um determinado ambiente sob pressões de diferentes naturezas (BRUGER; WALTERS, 2016). Adicionalmente, a piocianina foi descrita como sinal fisiológico, assumindo o papel de regulador de sensores de quorum sensing, controlando genes durante a fase estacionária de *P. aeruginosa* (DIETRICH et al., 2006). A participação da piocianina como sinalizador molecular em *P. aeruginosa* foi identificada como importante fator durante a formação e estabilidade de biofilmes (KHARE; ARORA, 2011; SKARIYACHAN et al., 2018), bem como acredita-se que a piocianina é requerida como autoindutor da expressão de certas características fenotípicas de *P. aeruginosa*, dentre elas, a biossíntese de agentes tensoativos, favorecendo com isso, a degradação de hidrocarbonetos (DAS; MA, 2013; VIANA et al., 2018).

As interações microbianas ocorrem com o intuito de promover a estabilidade das populações no ambiente, garantindo o reconhecimento de substratos, bem como da transferência de informações genéticas, resultando uma diversidade de fenótipos (JIMENEZ et al., 2012; BRAGA et al., 2016). No mundo microbiano, a competição é um evento comum e esperado. No entanto, evidências sugerem que as interações interespecies são fracas, uma vez que podem ser resolvidas pela separação espacial (GHOUL; MITRI, 2016). Para os microrganismos, o equilíbrio entre as populações traz muito mais vantagens do que a

eliminação de uma determinada população. Isto talvez reforce e justifique o fato da redução da produção de piocianina, porém, não mais que a metade.

Portanto, através de relatos elucidados nesse estudo, pode-se afirmar que *E. coli* e *P. aeruginosa* possuem a capacidade de sintetizar e excretar compostos químicos que são capazes de prejudicar a aderência do biofilme caso venha ocorrer uma possível interação entre essas espécies. Fortalecendo dessa maneira relatos que indicam que *E. coli* e *P. aeruginosa* podem estabelecer uma relação de antibiose, onde a *E. coli* pode sintetizar compostos que inibem o crescimento da *P. aeruginosa* e o contrário também se faz verdadeiro, porém, ambas as espécies não visam a depleção umas das outras do ambiente em que estão inseridas (KUSNETSOVA et al., 2013; MOLINA-SANTIAGO et al., 2017). Resultados esses que nos ajudam a construir novas estratégias experimentais antiaderência, que se mostra como um fator essencial para contornar o estabelecimento e manutenção de espécies bacterianas na forma de biofilme.

6 CONCLUSÃO

Nas condições estabelecidas e avaliadas por este estudo, os exometabólitos sintetizados por *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, possuem atividade inibitória na interação microbiana. Demonstrando que espécies bacterianas possuem a capacidade de sintetizar e excretar compostos químicos capazes de atuar em diversos alvos celulares e também em seu biofilme, porém, esses compostos não possuem o intuito de debelar espécies do meio, apenas visam a inibição do seu crescimento, ocasionando assim apenas um efeito bioestático.

A piocianina produziu um efeito inibitório, concentração-dependente, sobre as linhagens de *Escherichia coli* testadas, além de causar uma interferência na adesão celular dos isolados a superfície. Resultados observados para as linhagens UFPEDA 224, AV02, AV12 e AV14.

Os exometabólitos indol e acetato, produziram efeitos anti *Quorum sensing* nas linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* avaliadas, onde as linhagens UFPEDA 416, TGC02 e TGC04 apresentaram variações na produção de piocianina, quando em contato com os exometabólitos. O indol também gerou uma redução na adesão celular das linhagens testadas no estudo.

REFERÊNCIAS

- ABU, E. A.; SU, S.; SALLANS, L.; BOISSY, R. E.; GREATENS, A.; HEINEMAN, W. R.; HASSETT, D. J. Cyclic voltammetric, fluorescence and biological analysis of purified aeruginosin A, a secreted red pigment of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Microbiol.** v. 159, p. 1736-1747, 2013.
- ABDUL-HUSSEIN, Z.R.; ATIA, S.S. Antimicrobial Effect of Pyocyanin Extracted from *Pseudomonas aeruginosa*. **Eur J Exp Bio.** 2016.
- ANDRADE, J.P.; DE MACEDO FARIAS, L.; FERREIRA, J.F.; BRUNA-ROMERO, O.; DA GLÓRIA DE SOUZA, D.; DE CARVALHO, M.A.; DOS SANTOS, K.V. Sub-inhibitory concentration of piperacillin-tazobactam may be related to virulence properties of filamentous *Escherichia coli*. **Curr Microbiol**, 72(1), 19-28, 2016.
- APHA, AWWA, WEF – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION, WATER ENVIRONMENT FEDERATION. Standard methods for the examination of water and wastewater. 22nd. ed. **Baltimore: APHA, AWWA, WEF**, 2012.
- ARRUDA, K.L.S. Resistência das *Pseudomonas* à ciprofloxacina e sua relação com a saúde ambiental. **(Trabalho de Conclusão de Curso)**. Bacharelado em Engenharia Sanitária e Ambiental. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.
- BAHARI, S.; ZEIGHAMI, H.; MIRSHAHABI, H.; ROUDASHTI, S.; HAGHI, F. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing by subinhibitory concentrations of curcumin with gentamicin and azithromycin. **J Global Antimicrob Resist.** v. 10, n. 1, p. 21-28, 2017.
- BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S.K. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. **J. Pharm. Anal** 6 ;71–79. 2016.
- BANSAL, T., ENGLERT, D., LEE, J., HEGDE, M., WOOD, T. K. & JAYARAMAN, A. Differential effects of epinephrine, norepinephrine, and indole on *Escherichia coli* O157:H7 chemotaxis, colonization, and gene expression. **Infect Immun** 75, 4597–4607. 2007.

BARBOSA, D.B.; LAGE, M.M.; BADARÓ, A.C.L. Qualidade microbiológica da água dos bebedouros de um Campus universitário de Ipatinga, Minas Gerais. **NUTRIR GERAIS – Ver. Dig. Nutri.**, Ipatinga, v. 3. n. 5. p. 505-517,. 2009.

BARON, S.S.; ROWE, J.J. Antibiotic action of pyocyanin. **Antimicrob Agents Chemother**, 20(6), 814-820, 1981.

BELOIN, C.; ROUX, A.; GHIGO, J. M. *Escherichia coli* biofilms. **Curr Top Microbiol Immunol**. 322, 249–289. 2008.

BENNING, N.; TOZE, S.; MEE, B.J. Persistence of biofilm-associated *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* in groundwater and treated effluent in a laboratory model system. **Microbiol**. v. 149, n. 1, p. 47-55, 2003.

BERGEY’S MANUAL. Manual os systematics bacteriology. **Baltimore: Williams & Wilkins**, v.1. 9th ed., p, 141-165, 420-22, 463-3, 465-9. 1984.

BLOUNT, Z. D. The unexhausted potential of *E. coli*. **eLife**. 2015.

BRAGA, E.S.; BONETTI, C.V.D.H.; BURONE, L.; BONETTI, J.F. Eutrophication and Bacterial Pollution caused by Industrial and Domestic Wastes at the Baixada Santista Estuarine System- Brazil. **Mar. Poll. Bull.**, 40 (2): 165-173. 2000.

BRAGA, R.M.; DOURADO, M.N.; ARAÚJO, W.L. Microbial interactions: ecology in a molecular perspective. **Braz. J. Microbiol.** vol.47 supl.1 São Paulo Dec. 2016.

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente. *Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA*. Resolução N°357, de 17 de março de 2005.

BUSSCHER, H.J.; BOS, R.; VAN DER MEI, H.C. Initial microbial adhesion is a determinant for the strength of biofilm adhesion. **FEMS Microbiol. Lett.** 128 229-234. 1995.

CANTÚSIO, R.; SANTOS, L. U.; FRANCO, R. M. B. Águas: escassez e qualidade. **Revista Higiene Alimentar**. São Paulo: V.22; 1.ed. p.3-4, out. 2008.

CAVALCANTI, T. G.; OLIVEIRA, B. T. M. ; VASCONCELOS, U. Caracterização fenotípica de isolados de *Pseudomonas aeruginosa* oriundos de ambientes hostis. In: ONE, G.M.C.; ALBUQUERQUE, H. N. (Org.). (Org.). **Meio Ambiente: uma visão interativa**. 1ed.João Pessoa: IMEA- Instituto Medeiros de Educação Avançada, v. 2, p. 810-828. 2019.

CHU, W.; ZERE, T. R.; WEBER, M. M.; WOOD, T. K.; WHITELEY, M.; HIDALGO ROMANO, B.; VALENZUELA, E. J.; McLEAN, R. J. C. Indole Production Promotes *Escherichia coli* Mixed-Culture Growth with *Pseudomonas aeruginosa* by Inhibiting Quorum Signaling. **J Appl Environ Microbiol**, p. 411–419. 2011.

COSTERTON, J.W. Overview of microbial biofilms. **J Ind Microbiol**, 15, 137-140. 1995.

COSTERTON, J.W.; STEWART, P.S.; GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, 284, pp. 1318-1322. 1999.

CRICK, F. H.; BARNETT, L.; BRENNER, S.; WATTS-TOBIN, R. J. General nature of the genetic code for proteins. **Nature**. 192:1227–1232., 1961.

DAEGELEN, P.; STUDIER, F.W.; LENSKI, R. E.; CURE, S.; KIM, J. F. Tracing ancestors and relatives of *Escherichia coli* B, and the derivation of B strains REL606 and BL21 (DE3). **J. Mol. Biol.** 394:634–643. 2009.

DANESE, P. N.; PRATT, L. A.; KOLTER, R. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilms. **J Bacteriol** 182 , 3593–3596., 2000.

DAS, P.; MA, L. Z. Pyocyanin pigment assisting biosurfactant-mediated hydrocarbon emulsification. **Int Biodeterior Biodegrad.** v. 85, p. 278-283, 2013.

DEVNATH, P., UDDIN, M.K., AHAMED, F., HOSSAIN, M.T., MANCHUR, M.A. Extraction , purification and characterization of pyocyanin produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Int. Res. J. Biological Sci.** V.6, 1-9. 2017.

DIETRICH, L.E.P.; OKEGBE, C.; PRICE-WHELAN, A.; SAKHTAH, H.; HUNTER, R.C.; NEWMAN, D.K. Bacterial community morphogenesis is intimately linked to the intracellular redox state. **J Bacteriol** 195: 1371-1380. 2013.

DOREL, C.; LEJEUNE, P.; RODRIGUE, A. The Cpx System of *Escherichia coli*, a Strategic Signaling Pathway for Confronting Adverse Conditions and for Settling Biofilm Communities?. **Res. Microbiol.**, 157, 306–314. 2006.

DUAN K, SILBEY CD, DAVIDSON CJ, SURETTE MG. Chemical interactions between organisms in microbial communities. **Contrib Microbiol** 16:1–17.2009.

EL-FOULY, M.Z.; SHARAF, A.M.; SAHIM, A.A.M.; EL-BIALY, H.A. Biosynthesis of pyocyanin pigment by *Pseudomonas aeruginosa*. **J Rad Res Appl Sci**. v. 8, n. 1, p. 36-48, 2015.

EMERENINI, B.O.; HENSE, B.A.; KUTTLER, C.; EBERL, H.J. A Mathematical Model of Quorum Sensing Induced Biofilm Detachment. **PLoS ONE** 10(7): e0132385. doi:10.1371/journal.pone.0132385. 2015.

ENJALBERT, B.; MILLARD, P.; DINCLAUX, M.; PORTAIS, J.C.; LÉTISSE, F. Acetate fluxes in *Escherichia coli* are determined by the thermodynamic control of the Pta-AckA pathway. **Sci Rep**. 7:42135 | DOI: 10.1038/srep42135. 2017.

FABICH A.J.; JONES S.A.; CHOWDHURY F.Z.; CERNOSEK A.; ANDERSON A.; SMALLEY D.; MCHARGUE J.W.; HIGHTOWER G.A.; SMITH J.T.; AUTIERI S.M.; LEATHAM M.P.; LINS J.J.; ALLEN R.L.; LAUX D.C.; COHEN P.S.; CONWAY T. Comparison of carbon nutrition for pathogenic and commensal *Escherichia coli* strains in the mouse intestine. **Infect Immun**. 76:1143–1152. 2008.

FARMER, W.R.; LIAO, J.C. Reduction of Aerobic Acetate Production by *Escherichia coli*. **Appl Environ Microbiol.**, p. 3205–3210. 1997.

FAUST, K.; RAES, J. Microbial interactions: from networks to models. **Nat Rev Microbiol.**;10:538-550. 2012.

FERGUSON, D.; CAHILL, O. J.; QUILTY, B. Phenotypic, molecular and antibiotic resistance profiling of nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from two Irish hospitals. **J Med Biol Sci**. v. 1, p. 1-15, 2007.

FLEMMING, H.C., WINGENDER, J., SZEWZYK, U., STEINBERG, P., RICE, S.A, AND KJELLEBERG, S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nat Rev Microbiol** 14: 563–575. 2016.

FREIRES, I. A.; ALVES, L. A.; JOVITO, V. C.; ALMEIDA, L. F. D.; CASTRO, R. D.; PADILHA, W. W. N. Atividades antibacteriana e antiaderente in vitro de tinturas de *Schinus terebinthifolius* (Aroeira) e *Solidago microglossa* (Arnica) frente a bactérias formadoras do biofilme dentário. **Odontol. Clín.-Cient. (Online)** vol.9 no.2 Recife Abr./Jun. 2010.

GAIMSTER, H.; CAMA, J.; HERNÁNDEZ-AINSA, S.; KEYSER, U. F.; SUMMERS, D.K. The Indole Pulse: A New Perspective on Indole Signalling in *Escherichia coli*. **PLoS ONE**.9(4): e93168. doi: 10.1371/journal.pone.0093168. 2014.

GENHARTDT, P.; MURRAY, R.G.E.; WOOD, W.A.; KIEG, N.R. Methods for general and molecular bacteriology. 1st ed. **Washington: American Society for microbiology**, 791p. 1994.

GHOUL, M.; MITRI, S. The ecology and evolution of microbial competition. **Trends in Microbiol.**, 24(10), 833–845. 2016.

GONZALES-SILES, L.; SJOLING, A. The different ecological niches of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Environ Microbiol** 18: 741–751. 2016.

HASSANI, H. H.; HASAN, H. M.; AL-SAADI, A.; ALI, A. M.; MUHAMMAD, M. H. A comparative study on cytotoxicity and apoptotic activity of pyocyanin produced by wild type and mutant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **Eur J Experiment Biol.** v. 2, n. 5, p. 1389-1394, 2011.

HIBBING, M.E.; FUQUA, C.; PARSEK, M.R.; PETERSON, S.B. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. **Nat Rev Microbiol** 8: 15-25. 2009.

HIRAKAWA, H., KODAMA, T., TAKUMI-KOBAYASHI, A., HONDA, T. & YAMAGUCHI, A. Secreted indole serves as a signal for expression of type III secretion system translocators in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7. **Microbiol.**, 155, 541–550. (2009).

ITO, A.; TANIUCHI, A.; MAY, T.; KAWATA, K.; OKABE, S. Increased antibiotic resistance of *Escherichia coli* in mature biofilms. **Appl Environ Microbiol** 75, 4093–4100., 2009.

JAMALA, M.; AHMADA, W.; ANDLEEBC, S.; JALILB, F.; IMRANE, M.; NAWAZD, M.A.; HUSSAINA, T.; ALID, M.; RAFIQA, M.; KAMIL, M.A. Bacterial biofilm and associated infections. **J Chin Med Assoc.** Volume 81, Issue 1, , Pages 7-11. January 2018.

JAYARAMAN A, WOOD TK. Bacterial quorum sensing: signals, circuits, and implications for biofilms and disease. **Annu Rev Biomed Eng** 10:145–167. 2008.

JAYASEELAN, S.; RAMASWAMY, D.; DHARMARAJ, S. Pyocyanin: production, applications, challenges and new insights. **World J Microbiol Biotechnol.** v. 30, p. 1159-1168, 2014.

JIMENEZ, P. N.; KOCH, G.; THOMPSON, J. A.; XAVIER, K. B.; COOL, R. H.; QUAX, W. J. The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology. Mol. Biol. Rev.** 76(1): 46-65. doi:10.1128/MMBR.05007-11. PMID:22390972. 2012.

KAWECKI, T.J.; LENSKE, R.E.; EBERT, D.; HOLLIS, B.; OLIVIERI, I.; WHITLOCK, M.C. Experimental evolution. **Trends in Ecol. & Evolut.** 27:547–560., 2013.

KHARE, E.; ARORA, N.K. Dual activity of pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa* - antibiotic against phytopathogen and signal molecule for biofilm development by rhizobia. **Can. J. Microbiol.** 57: 708–713. 2011.

KING, E.O.; WARD, M.K.; RANEY, D.E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. **J Lab Clin Med.** v. 44, n. 2, p. 30-307, 1954.

KIPNIS, E.; SAWA T.; WIENER- KRONISH J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. **Medical Malpractice Infect. J.** v.36. p.78-91, 2006.

KIM, S.K.; PARK, H.Y.; LEE, J. H. Anthranilate Deteriorates the Structure of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms and Antagonizes the Biofilm-Enhancing Indole Effect. **Appl Environ Microbiol** 81:2328 –2338. doi:10.1128/AEM.03551-14. 2015.

KLAUSEN, M.; AAES-JORGENSEN, A.; MOLIN, S.; TOLKER-NIELSEN, T. Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Mol. Microbiol.** 50 (1), 61–68. 2003.

KLEMAN, G.; STROHL, W. Acetate Metabolism by *Escherichia coli* in High-Cell-Density Fermentation. **Appl Environ Microbiol.**, p. 3952-3958. Nov. 1994.

KUMAR, A.; ALAM, A.; RANI, M.; EHTESHAM, N.Z.; HASNAIN, S.E. Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens. **Int J Med Microbiol.** P, 1438-4221. 2017.

KUSNETSOVA, M.V.; MASLENNIKOVA, I.L.; KARPUNINA, T.I.; NESTEROVA, L.Y. DEMAKOV, V.A. Interactions of *Pseudomonas aeruginosa* in predominant biofilm or

planktonic forms of existence in mixed culture with *Escherichia coli* *in vitro*. **Can. J. Microbiol.** 59. 604-610. 2013.

LAVERTY, G.; GORMAN, S. P.; GILMORE, B. F. Biomolecular Mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* Biofilm Formation. **Pathog.** 3, 596-632. 2014.

LEE, J. H., KIM, Y. G., CHO, M. H., WOOD, T. K. & LEE, J. Transcriptomic analysis for genetic mechanisms of the factors related to biofilm formation in *Escherichia coli* O157 : H7. **Curr Microbiol** 62, 1321–1330. 2011.

LEE, J.; ATTILA, C.; CIRILLO, S.L.G.; CIRILLO, J.D.; WOOD, T.K. Indole and 7-hydroxyindole diminish *Pseudomonas aeruginosa* virulence. **Microb Biotechnol.** 2(1), 75–90. 2009.

LEE, J.; JAYARAMAN, A.; WOOD, T.K. Indole is an inter-species biofilm signal mediated by SdiA. **BMC Microbiol** 7:42. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-7-42>. 2007.

LEWIS, R.E.; DIEKEMA, D.J.; MESSER, S.A.; PFALLER, M.A.; KLEPSE M.E. Comparison of Etest, chequerboard dilution and time–kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. **J. Antimicrob. Chemother**, v. 49, p. 345–351, 2002.

LOPES, S. P.; MACHADO, I. M.; PEREIRA, M. O. Role of planktonic and sessile extracellular metabolic by production *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* intra and interspecies relationships. **J. Ind. Microbiology. Biotechnol.** 38(10): 133-140. doi:10.1007/s10295-010-0838-y. PMID:20811926. 2011.

LU, T.K.; COLLINS, J.J. Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage. **Proc Natl Acad Sci EUA** , 104, pp. 11197 – 11202, 2007.

MACIA, M.D.; ROJO-MOLINERO, E.; OLIVER, A. Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. **Clin Microbiol Infect.** Volume 20, Issue 10, Pages 981-990. October 2014.

MADSEN, J.S., RØDER, H.L., RUSSEL, J., SØRENSEN, H., BURMOLLE, M, AND SØRENSEN, S.J. Coexistence facilitates interspecific biofilm formation in complex microbial communities. **Environ Microbiol** 18: 2565–2574. 2016.

MAIA, A.A.; CANTISANI, M.L.; ESPOSTO, E.M.; SILVA, W.C.P.; RODRIGUES, E.C.P.; RODRIGUES, D.P.; LÁZARO, N.S. Resistência antimicrobiana de *Pseudomonas aeruginosa* isolados de pescado e de cortes e de miúdos de frango. **Ciência Tec Alim.**, v. 29, p. 114-119, 2009.

MANGWANI, N.; KUMARI, S.; DAS, S. Involvement of quorum sensing genes in biofilm development and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a marine bacterium *Pseudomonas aeruginosa* N6P6. **Clin Microbiol Infect**, v. 99, n. 23, p. 10283-10297., 2015.

MARTINS, V.V.; MACARENO, A.C.; GRADELLA, D.G.; STEHLING, E.G Antagonism between clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa* against coliforms. **Wat Sci Technol: Wat Supply**. v. 14, n. 1, p. 99-106, 2014.

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

MEY M.; LEQUEUX G.J.; BEAUPREZ J.J.; MAERTENS J.; ELLEN VAN HOREN, E.V.; SOETAERT W.K.; VANROLLEGHEM P.A.; VANDAMME E.J. Comparison of Different Strategies to Reduce Acetate Formation in *Escherichia coli*. **Biotechnol. Prog.**,23,1053–1063. 2007.

MITTAL, S.; SHARMA, M.; CHAUDHARY, U. Biofilm and multidrug resistance in uropathogenic *Escherichia coli*. **Pathog Glob Health** 109, 26-29., 2015.

MOLINA-SANTIAGO, C.; UDAONDO, Z.; CORDERO, B. F.; RAMOS, J. L. Interspecies cross-talk between co-cultured *Pseudomonas putida* and *Escherichia coli*. **Env Microbiol Rep**. 9(4), 441–448. 2017.

MULLER, M.; MERRETT, N. D. Pyocyanin production by *Pseudomonas aeruginosa* confers resistance to ionic silver. **Antimicrob. Agents Chemother**. v. 58, p. 5492-5499, 2014.

NIRENBERG, M.; LEDER, P.; BERNFIELD, M.; BRIMACOMBE, R.; TRUPIN, J.; ROTTMAN, F.; O'NEAL, C. RNA codewords and protein synthesis, VII. On the general nature of the RNA code. **Biochem**. 53:1161–1168., 1965.

O'MALLEY, Y.Q.; ABDALLA, M.Y.; McCORMICK, M.L.; RESZKA, K.J.; DENNING, G. M.; BRITIGAN, B.E. Subcellular localization of *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin cytotoxicity in human lung epithelial cells. **Am J Physiol Lung Cell Molec Physiol**. v. 284, n. 2, p. L-420-L430, 2003.

O'TOOLE, G.A.; KOLTER, R. Flagellar and Twitching Motility are Necessary for *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Development. **Mol. Microbiol.**, 30, 295–304. 1998.

ODUM, E. P. Fundamentos de Ecologia. 6ª ed. **São Paulo: Fundação Calouste Gulbenkian.** n. 820, p. 338-342. 2004.

PAGANO, P.J.; BUCHANAN, L.V.; DAILEY, C.F.; HAAS, J.V.; ENK, R.A.V.; GIBSON, J.K. Effects of linezolid on *Staphylococcal* adherence versus time of treatment. **Int. J. Antimicrob. Agents** 23. 226–234. 2004.

PASSOS DA SILVA, D.; SCHOFIELD, M.C.; PARSEK, M.R.; TSENG, B.S. An Update on the Sociomicrobiology of *Quorum Sensing* in Gram-Negative Biofilm Development. **Pathog.**, 6, 51; doi:10.3390/pathogens6040051. 2017.

PEIXOTO, M. M. R.; GRESSLER, L. T.; SUTILI, F. J.; COSTA, M. M.; VARGAS, A.C. Ação dos desinfetantes sobre a adesão e biofilme consolidado de *Staphylococcus spp.* **Pesq. Vet. Bras.** vol.35 no.2 Rio de Janeiro Feb. 2015.

PIRNAY, J.P., MATTHIJS, S., COLAK, H., CHABLAIN, P., BILOCQ, F., VAN ELDERE, J., DE VOS, D., ZIZI, M., TRIEST, L., CORNELIS, P. Global *Pseudomonas aeruginosa* biodiversity as reflected in a Belgian river. **Environ Microbiol.** v. 7, p. 969-980, 2005.

PRICE-WHELAN, A; DIETRICH, L.E.; NEWMAN, D.K. Pyocyanin alters redox homeostasis and carbon flux through central metabolic pathways in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. **J. Bacteriol.**, 189(17), 6372-6381, 2007.

RADA, B.; LETO, T.L.; Pyocyanin effects on respiratory epithelium: relevance in *Pseudomonas aeruginosa* airway infections. **Trends in Microbiol.** V.21. 73-81. 2013

SCOTT-THOMAS, A.; SYHRE, M.; PATTEMOREL, P. K.; EPTON, M.; LAING, R.; PEARSON, J.; CHAMBERS, S. T. 2-Aminoacetophenone as a potential breath biomarker for *Pseudomonas aeruginosa* in the cystic fibrosis lung. **BMC Pulmonary Med.** v. 10, p. 1-10, 2010.

SHARMA, G.; SHARMA, S.; SHARMA, P.; CHANDOLA, D.; DANG, S.; GUPTA, S.; GABRANI, R. *Escherichia coli* biofilm: developm ent and therapeutic strategies. **J Applied Microbiol.** ISSN 1364-5072., 2016.

SHULMAN, S. T.; FRIEDMANN, H. C.; SIMS, R. H. Theodor Escherich: the first pediatric infectious diseases physician?. **Clin Infect Dis.** 45:1025–1029., 2007.

SKARIYACHAN S, SRIDHAR VS, PACKIRISAMY S, KUMARGOWDA ST, CHALLAPILLI SB. Recent perspectives on the molecular basis of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and approaches for treatment and biofilm dispersal. **Folia Microbiol.**; 63:413-432. 2018.

STREETER, K.; KATOULI, M. *Pseudomonas aeruginosa*: A review of their Pathogenesis and Prevalence in Clinical Settings and the Environment. **Infect Epidemiol Med.** Winter; Volume 2, Issue 1: 25-32. 2016.

SUTHERLAND, I.W. Microbial Polysaccharides from Gram-negative Bacteria. **Int. Dairy J.**, 11, 663–674. 2001.

THAKUR, S. *Escherichia coli*. College Park (MD): **University of Maryland Department of Nutrition and Food Science.** 12 p., 2007.

TASHIRO, Y., YAWATA, Y., TOYOFUKU, M., UCHIYAMA, H.; NOMURA, N. Interspecies interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and other microorganisms. **Microbes Environ** 28: 13–24. 2013.

TRENTIN, D. S.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Rev. Liberato, Novo Hamburgo**, v. 14, n. 22, p. 113-238, jul./dez. 2013.

TRENTIN, D. S.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Rev. Liberato, Novo Hamburgo**, v. 14, n. 22, p. 113-238, jul./dez. 2014.

VASCONCELOS, U.; LIMA, M.A.G.A.; CALAZANS, G.M.T. *Pseudomonas aeruginosa* associated with negative interactions on coliform bacteria growth. **Can. J Pure and Applied Sci.**, 4(2), 1133- 1139, 2010.

VIANA, A. A. G; MARTINS, R.X.; FERREIRA, G.F.; NETO, H.Z.; AMARAL, I.P.G.; VASCONCELOS, U. *Pseudomonas aeruginosa* and pyocyanin negatively act on the establishment of *Enterobacteriaceae* biofilm on a ceramic surface. **Int. Int J Eng Res Appl.** www.ijera.com ISSN: 2248-9622, Vol. 7, Issue 8, (Part -2), pp.23-30. 2017.

WAKSMAN, S.A.; WOODRUFF, H.B. The soil as a source of microorganisms antagonistic to disease-producing bacteria. **J Bacteriol.**, 40(4), 581-600, 1940.

WEIHUA, C.; YAN, J.; LIU, Y.; WEI, Z. Role of the *quorum-sensing* system in biofilm formation and virulence of *Aeromonas hydrophila*. **Afr. J. Microbiol. Res.** Vol. 5(32) pp. 5819-5825, 2011.

YI-CHI, Z.; ZHAO-HONG, J.; YING, L. Application of electrochemically active bacteria as anodic biocatalyst in microbial fuel cells. **Chin J Anal Chem.** v. 43, n. 1, p. 155-163, 2015.

ZIMMER, C. Microcosm. **New York: Pantheon Books.**, 2008.

APÊNDICE A – Cadastro dos isolados no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen)



Ministério do Meio Ambiente CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº AA1970F

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro:	AA1970F
Usuário:	Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes
CPF/CNPJ:	445.546.802-15
Objeto do Acesso:	Patrimônio Genético
Finalidade do Acesso:	Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico

Espécie

Pseudomonas aeruginosa

Título da Atividade:	O microcosmo azul: desvendando as Interações da <i>Pseudomonas aeruginosa</i> com o melo
----------------------	--

Equipe

Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes	Universidade Federal da Paraíba
Tarciso Tarcio Corrêa Bonifácio	UEPB
Blanca Teixeira Morais de Oliveira	UEPB
Vinicius Cavalcante Morais	UEPB
Ray Ravilly Alves Arruda	UEPB
Maria Eduarda de Souza Mala	UEPB
Thiago Gonçalves Cavalcanti	UEPB

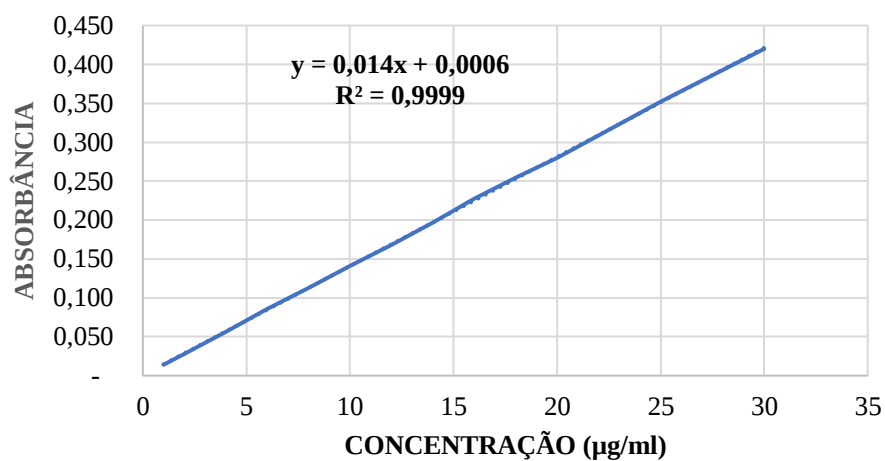
Data do Cadastro:	27/09/2018 11:40:36
Situação do Cadastro:	Concluído



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 12:24 de 27/09/2018.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**

APÊNDICE B – Curva de calibração da piocianina**CURVA ANALÍTICA PIOCIANINA**

APÊNDICE C – Carta de aceite da publicação do artigo



Ulrich Vasconcelos <u.vasconcelos@cbiotec.ufpb.br>

IJAERS Acceptance / DOI: 10.22161/ijaers- Activity of two exometabolites produced by Escherichia coli on the synthesis of pyocyanin

IJAERS Journal <editor.ijaers@gmail.com>
 Para: Ulrich Vasconcelos <u.vasconcelos@cbiotec.ufpb.br>

11 de julho de 2019 14:26

Dear Author,

Congratulations! We are glad to inform you that your manuscript **has been selected** for publication in International Journal of Advanced Engineering Research and Science (IJAERS).

ISSN: 2349-6495(P)| 2456-1908(O), Digital Object Identifier DOI: [10.22161/ijaers](https://doi.org/10.22161/ijaers), Qualis **CAPES- A2**, Redalyc, Neliti-Indonesia, Google Scholar, Index copernicus **ICV**: 81.49, Impact Factor: 4.192, SJIF: 4.072, IBI: 3.2, PIF: 2.465, ISRA-JIF: 1.317, NAAS Score: 3.18.

Paper Title: [Activity of two exometabolites produced by Escherichia coli on the synthesis of pyocyanin](#)

Corresponding Author Name : Ulrich Vasconcelos

Email: u.vasconcelos@cbiotec.ufpb.br

Address: [Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brazil](#)

Paper Id: [IJAERS-07201928](#)

To register your self reviewed manuscript for publication, please send Copyright form which is attached with this email, with publication fee transactions details **on before 17 July 2019**. IJAERS publish manuscript in the current issue **within 2 days** after submission of copyright form and publication fee details. Formatting of your paper in standard IJAERS template will be done by our tools.

Publication Charges are as below

120 USD (DOI, Online Publication and soft copy of certificates to each author of the paper)

150 USD (DOI, Online Publication, Soft copy and Hard copy of certificates to each author of the paper)

It is included of all Government Taxes and the cost of CrossRef for DOI generation.

Please note: If you also, need the Hard copy of the complete proceeding of IJAERS issue with your published article, then please pay 100 USD per copy extra to the publication fee (For Printing and

