



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR



**FORMAÇÃO DE BIOFILMES DE *Pseudomonas aeruginosa* EXPOSTAS
A EFLUENTES DE LABORATÓRIO DIDÁTICO MULTIUSUÁRIO DE
SAÚDE**

Débora Conceição da Silva Amaral

JOÃO PESSOA - PB

2024

**FORMAÇÃO DE BIOFILMES DE *Pseudomonas aeruginosa* EXPOSTAS
A EFLUENTES DE LABORATÓRIO DIDÁTICO MULTIUSUÁRIO DE
SAÚDE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes

JOÃO PESSOA - PB

2024

FICHA CATALOGRÁFICA

Catálogo na publicação Seção de Catalogação e Classificação

A485f Amaral, Débora Conceição da Silva.

Formação de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*
expostas a efluentes de laboratório didático
multiusuário de saúde / Débora Conceição da Silva
Amaral. - João Pessoa, 2024.

61 f. : il.

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

1. *Pseudomonas aeruginosa* - Contaminação hídrica. 2.
Contaminação - Laboratório didáticos - Lavatórios. 3.
Saúde pública. I. Gomes, Ulrich Vasconcelos da Rocha.
II. Título.

UFPB/BC

CDU 582.28(043)



MINISTERIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA

FOLHA Nº 1 / 2024 - CBIOTEC - DB (18.62)

Nº do Protocolo: 23074.02362212024-39

Joião Pessoa-PB, 22 de Março de 2024

DEBORA CONCEICÃO DA SILVA AMARAL

FORMAÇÃO DE BIOFILMES DE *Pseudomonas fluorescens* EXPOSTAS A EFLUENTES DE
LABORATÓRIO DIDÁTICO DE SAÚDE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFPB, como requisito para obtenção do grau de Mestre (área: Microbiologia) em 22 de março de 2024

Banca examinadora:

Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes (DBTC/UFPB)
Orientador

Prof.ª Dr.ª Eliângela Afonso de Moura Ktetzschmar (DBCT/UFPB)
Examinadora interna

Prof. Dr. José Soares Nascimento (DFPT/UFPB)
Examinador externo

(Assinado digitalmente em 25/03/2024 10:53)
ELISANGELA AFONSO DE MOURA KRETZSCHMAR
PROFESSOR DO MAGISTÉRIO SUPERIOR
Matrícula: 2177524

(Assinado digitalmente em 23/03/2024 10:09:10)
JOSE SOARES NASCIMENTO
PROFESSOR DO MAGISTÉRIO SUPERIOR
Matrícula: 1086661

(Assinado digitalmente em 22/03/2024 13:00)
ULRICH VASCONCELOS DA ROCHA GOMES
PROFESSOR DO MAGISTÉRIO SUPERIOR
Matrícula: 2009494

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufpb.br/doc1.1mentos/> informando seu número: 1. ano: **2024**, documento(especie): **FOLHA**, data de emissão: **2210312024** e o código de verificação: **2685b2f99a**

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de expressar minha profunda gratidão a Deus; sem os desígnios d'Ele, esta jornada jamais teria sido possível. A Ele, que é Senhor, dedico toda a glória. Os caminhos até aqui foram repletos de desafios, e só a Sua divina proteção e orientação, manifestadas através do amor, me sustentaram e guiaram até aqui.

Não posso deixar de reconhecer e agradecer o apoio inabalável da minha família e amigos, que suportaram minha ausência e me incentivaram diariamente. Em particular, quero agradecer a Marcus Paulo, meu noivo, e ao meu amigo Rodrigo Dutra, cuja presença foi fundamental desde minha aprovação no programa até a defesa da minha dissertação. Sem o auxílio deles, essa conquista não teria sido possível.

Sou eternamente grata ao meu orientador, Ulrich Vasconcelos. Ele é um exemplo tanto profissional quanto humano, e sua orientação será uma bússola constante em minha jornada acadêmica. Seu comprometimento inspira não apenas seus orientandos, mas todos ao seu redor. Ter o Professor Ulrich como orientador e mestre foi uma grande honra.

Também não posso deixar de mencionar e agradecer a parceria do time do LAMA, especialmente a contribuição essencial de Ton Borchardt, que foi essencial para obtenção dos resultados desta pesquisa.

À UFPB e ao programa de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, expresso minha sincera gratidão por me proporcionarem a realização deste grande sonho. Agradeço o apoio e aprendizado ao longo de minhas atividades acadêmicas.

Por fim, aos estimados professores do PPBCM, agradeço por compartilharem seu conhecimento e dedicarem o recurso mais valioso que temos: o tempo, à nobre, doce e amarga tarefa da docência.

*“Mas aqueles que esperam no Senhor
renovam as suas forças.
Voam alto como águias;
correm e não ficam exaustos,
andam e não se cansam”.*
Isaías 40:31

AMARAL, Débora Conceição da Silva. Formação de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* expostas a efluentes de laboratório didático multiusuário de saúde. João Pessoa, 2024. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular – Microbiologia) – Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, 2024.

RESUMO

A formação de biofilmes por *Pseudomonas aeruginosa* representa uma preocupação significativa devido à sua capacidade de persistência e resistência a fatores ambientais. Esses biofilmes não apenas conferem vantagens adaptativas ao microrganismo, mas também apresentam riscos para a saúde pública e ao ambiente, especialmente quando provenientes de meios com alta carga de estresse, como laboratórios. Este estudo avaliou a formação de biofilmes em isolados de *Pseudomonas aeruginosa* obtidos das pias de laboratórios didáticos multiusuários de saúde, gerador de efluentes com alta carga de substâncias tóxicas. Os isolados foram submetidos a ensaios para determinar a quantificação de piocianina e susceptibilidade a antimicrobianos. Foi preparado uma solução contendo resíduos de material manipulado nas pias e os isolados foram testados quanto à formação de biofilme em diferentes substratos e alteração da motilidade. Foram obtidos 12 espécimes, dos quais 11 foram positivas para *Pseudomonas* spp. e 4 confirmadas como *Pseudomonas aeruginosa* (2A, 2B, 3A e 3B), e duas delas (2A e 3A), produtoras de piocianina. Todos os isolados foram sensíveis à cefoxitina, porém o isolado 3A destacou-se como o mais resistente, incluindo ao cefepime. Observou-se adesão preferencialmente em superfícies hidrofílicas em detrimento das hidrofóbicas, além de alterações na motilidade. O lixiviado 1% foi considerado tóxico para 100% de *Artemia salina*. Esses resultados destacam a alta capacidade de adaptação da *Pseudomonas aeruginosa* a ambientes com elevado grau de estresse ambiental, fornecendo *insights* importantes para o entendimento dos mecanismos de resistência e persistência desse patógeno em ambientes laboratoriais de ensino, além de trazer um alerta para resistência crescente de antibióticos de quarta geração em isolados de *P. aeruginosa*.

Palavra-chave: Saúde única, contaminação hídrica, lavatórios, laboratório didáticos, *Pseudomonas aeruginosa*.

AMARAL, Débora Conceição da Silva. Formation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to effluents from a multi-user laboratory at health education school. João Pessoa, 2024. Dissertation (Master's in Cellular and Molecular Biology – Microbiology) – Center for Exact and Natural Sciences, Federal University of Paraíba, 2024.

ABSTRACT

The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa* represents a significant concern due to its persistence and resistance to environmental factors. These biofilms not only confer adaptive advantages to the microorganism but also pose risks to public health and the environment, especially when originating from environments with a high stress load, such as laboratories. This study evaluated biofilm formation in isolates of *Pseudomonas aeruginosa* obtained from the sinks of multi-user didactic laboratories, which generate effluents with a high load of toxic substances. The isolates were quantified pyocyanin and susceptibility to antimicrobials. A solution containing residues of material manipulated in the sinks was prepared, and the isolates were tested for biofilm formation on different substrates and motility alteration. Twelve specimens were obtained, of which 11 were positive for *Pseudomonas* spp. and 4 confirmed as *Pseudomonas aeruginosa* (2A, 2B, 3A, and 3B), with two of them (2A and 3A) producing pyocyanin. All isolates were sensitive to ceftiofur, but isolate 3A stood out as the most resistant, including to cefepime. Preferential adhesion was observed on hydrophilic surfaces over hydrophobic ones, as well as alterations in motility. The 1% leachate was considered toxic to 100% of *Artemia salina*. These results highlight the high adaptability of *Pseudomonas aeruginosa* to environments with a high degree of environmental stress, providing important insights into the mechanisms of resistance and persistence of this pathogen in education laboratory settings, as well as raising an alert about the increasing resistance of fourth-generation antibiotics in *P. aeruginosa* isolates.

Key-words: One health, water contamination, sinks, didactic laboratories, *Pseudomonas aeruginosa*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Etapas de formação de um biofilme	15
Figura 2 – Interações físico-químicas na adesão inicial de células bacterianas na formação do biofilme.	16
Figura 3 – Distribuição e interações de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
Figura 4 – Mecanismos de virulência, adaptabilidade e resistência influenciados pelo <i>Quorum sensing</i> na patogenicidade de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
Figura 5 – Representação visual das etapas dos experimentos.....	24
Figura 6 – Amostra bacteriana exposta à luz UV.	31
Figura 7 – Resultado do crescimento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em caldo acetamida	31
Figura 8 – Produção de pioverdina e piocianina em ágar cetrimida	32
Figura 9 – Formação do biofilme nos corpos de prova hidrofílicos e hidrofóbicos	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Isolados bacteriano em caldo asparagina	31
Tabela 2 – Isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em caldo acetamida	31
Tabela 3 – Produção de pigmentos em ágar cetrimida	32
Tabela 4 – Concentração de piocianina produzida por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	32
Tabela 5 – Linhagens selecionada de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e respectivos acessos no SisGen.....	32
Tabela 6 – Antibiograma realizado com isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	35
Tabela 7 – Resultado do ensaio <i>in vitro</i> para formação de biofilme em superfícies hidrofílicas e hidrofóbicas.....	36
Tabela 8 – Resultados quantitativos da motilidade <i>Swimming</i> , evidenciando o deslocamento individual em um meio semissólido na presença e ausência de lixiviado	38
Tabela 9 – Análise quantitativa da motilidade <i>Swarming</i> , revelando alterações no deslocamento coletivo em um meio sólido com a adição de lixiviado	38
Tabela 10 – Resultados quantitativos da motilidade <i>Twitching</i> , destacando as modificações no deslocamento na presença do lixiviado	38

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 Biofilmes Bacterianos	14
2.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e mecanismos de adaptabilidade.....	18
3 OBJETIVOS.....	23
3.1 OBJETIVO GERAL	23
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 LOCAL DO EXPERIMENTO	24
4.2 MICRORGANISMO	25
4.2.1 Isolamento e identificação	25
4.2.2 Quantificação da piocianina em base sólida	25
4.3 ENSAIOS DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO	26
4.3.1 Reagentes.	26
4.3.2 Antibiograma realizado com isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26
4.4 ENSAIO DE FORMAÇÃO DO BIOFILME	27
4.4.1 Descrição dos corpos de prova	27
4.4.2 Ensaio de hidrofobicidade	27
4.4.3 Preparação do Lixiviado	27
4.4.4 Ensaio <i>in vitro</i> da formação do biofilme	28
4.4.5 Ensaio de Motilidade	29
4.4.6 Ensaio de citotoxicidade em <i>Artemia Salina</i>	29
5 RESULTADOS	31
6 DISCUSSÃO.....	40
7 CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS.....	49

APÊNDICE A - Effluents from a university clinical analysis teaching laboratory: an inductive study on adhesion and cellular response of *Pseudomonas aeruginosa*

1 INTRODUÇÃO

A habilidade de viver em comunidade é uma característica de diversos seres vivos, em ambientes naturais é possível encontrar espécies bacterianas com a habilidade de formar comunidades complexas, tal feito só é possível devido à alta capacidade de adesão em superfícies bióticas e abióticas (Rollet; Gal; Guzzo, 2009; Thi; Wibowo; Rehm, 2020). As bactérias presentes nos biofilmes estão organizadas em uma matriz autogerada contendo material genético e substâncias poliméricas extracelulares (EPS), de composição heterógena, com canais para fluxo de água e nutrientes e elementos não celulares (Donlan, 2002), que podem variar de acordo com o local de fixação da macrocolônia bacteriana

A formação do biofilme é uma importante estratégia de manutenção no ambiente, sendo responsável pelo estabelecimento desses microrganismos em diferentes locais, de sistemas e tubulações de água a equipamentos médicos e industriais. Além disso, diferentemente das suas contrapartes livres, a presença do biofilme e o estabelecimento em comunidade, confere maior capacidade de persistência em ambientes com grande variação de nutrientes, temperatura e disposição de substâncias químicas (Donlan, 2002) conferindo proteção contra estresses ambientais (Haney *et al.*, 2018).

Didaticamente são descritas 5 etapas para formação do biofilme. A primeira consiste na adesão das células livres à uma superfície, podendo ser reversível; seguida pela sua fixação e formação da matriz exopolissacarídica. Na terceira etapa, ocorre o estabelecimento e crescimento da microcolônia, mas ainda existem espaços não colonizados; posteriormente, toda superfície é colonizada por bactérias, sendo possível observar o crescimento tridimensional da macrocolônia, que é a quarta etapa e é conhecida como maturação do biofilme. A dispersão é a última etapa, as bactérias, que estavam em estado sésil, se desprendem do biofilme para colonizar outros locais (Rasamiravaka *et al.*, 2015; Neves *et al.*, 2021).

Pseudomonas aeruginosa é o organismo modelo em estudos relacionados a biofilmes (Thi; Wibowo; Rehm, 2020). São classificadas como bactérias Gram-negativas, oportunistas, saprófitas e altamente difundidas na natureza. A bactéria apresenta forma de bacilo e sua locomoção ocorre por meio de flagelos. Além disso, *P. aeruginosa* não fermentam açúcar, mas utilizam outras substâncias como fonte de carbono e energia (Gholami *et al.*, 2017).

Após o estabelecimento no local de colonização, processos de sinalização celular dependente da densidade populacional, i.e., *quorum sensing* (QS), permitem que a estrutura do biofilme seja mantida. O QS é um sistema de transmissão entre as células que compõem o biofilme. Em *P. aeruginosa* três sistemas de comunicação são descritos: *las*, *rhl* e *pqs*,

responsáveis pela regulação da expressão de outros fatores de resistência da bactéria, como a síntese de piocianina, pigmento hidrossolúvel, fluorescente e específico, que confere coloração azulada difundida nos meios de cultura (Neves *et al.*, 2021). Devido a sua ação intracelular, oxidando e reduzindo moléculas, a piocianina é tóxica nas células de organismos competidores de *P. aeruginosa*.

Neste contexto, o biofilme apresenta-se como outro importante mecanismo de persistência, assegurando condições ideais para troca de genes entre as células que compõem a macrocolônia, dissipando entre as bactérias que o compõem genes de resistência às mais variadas substâncias (Ribeiro *et al.*, 2016; Mulcahy *et al.*, 2014). O QS também atua como fator regulador de vários processos fisiológicos no biofilme, como tolerância ao estresse, interações interespecíficas e regulação metabólica. A depender do nível e tempo de exposição à diferentes substâncias, o metabolismo do microrganismo pode sofrer alterações fisiológicas, na capacidade de disseminação e interação com a biodiversidade local; tornando-se tolerante, resiliente ou resistente (Destoumieux-Garzón *et al.*, 2018).

Com tantos mecanismos de persistência e adaptabilidade, *P. aeruginosa* é encontrada nos mais diversos locais, principalmente ambientes úmidos, tais como tubulações e instalações de água. A presença desse microrganismo nos efluentes confere grande risco à saúde pública, quando não tratados de maneira adequada, visto que se tornam um meio de dispersão da bactéria em águas superficiais e subterrâneas, podendo chegar até em sistemas de abastecimento de água (Fuentefria *et al.*, 2008; Vecchia *et al.*, 2009).

Neste cenário, a abordagem *One Health*, também conhecida como Saúde Única, tem se destacado como um tema amplamente debatido nos últimos anos, enfatizando a interligação entre a saúde humana e a saúde do ecossistema circundante. Essa perspectiva incentiva uma compreensão integrada da saúde, estimulando reflexões sobre a promoção de forma integral, multiprofissional e diversa (Destoumieux-Garzón *et al.*, 2018; Bonilla-Aldona; Dhama; Rodriguez Morales, 2020).

Devido à sua notável capacidade de adaptação, de acordo com Fusch *et al.*, (2015), Moradali e Rehm (2020) e Moradali; Ghods e Rehm (2017) *P. aeruginosa* torna-se especialmente preocupante quando proveniente de ambientes com elevada carga de estresse químico, como em pias, e conseqüentemente ralos, de laboratórios didáticos e ambientes hospitalares. O lançamento dessas bactérias ao ambiente, seja por respingos de água, efluentes ou sistemas de águas residuais, representa um risco significativo para a sociedade e o ambiente. A adaptabilidade a condições adversas, como antissépticos e desinfetantes, pode

potencializar a sua patogenicidade, manutenção e propagação, tornando sua presença em ambientes acadêmicos, laboratórios e instalações hospitalares preocupante.

Considerando a presença de diferentes compostos químicos descartados em tubulações que transportam efluentes de um laboratório multiusuário didático, supõe-se que tais condições propiciam um ambiente favorável para a seleção e prevalência de linhagens resistentes de *P. aeruginosa*. Essas linhagens, possuindo potencial resistência a antimicrobianos e a capacidade de formar biofilmes persistentes, representam um risco direto para a saúde humana e ambiental. Diante disso, esta dissertação apresenta resultados do estudo sobre a formação de biofilmes por isolados de *P. aeruginosa* nesse contexto específico, visando contribuir para o entendimento dos fatores que influenciam a persistência e resistência dessa bactéria diante de pressões ambientais seletivas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Biofilmes Bacterianos

Os microrganismos apresentam a notável capacidade de existir em duas formas distintas: individualmente, e em comunidade, formando os biofilmes. Esses últimos são definidos como ambientes dinâmicos de troca e organização interna, respondendo a estímulos externos, tais como temperatura, disponibilidade de nutrientes, presença de fármacos e a ameaça de predadores. Nos biofilmes, os microrganismos aderem a uma matriz de substância polimérica extracelular (EPS), produzida pela comunidade, facilitando a adesão entre eles e a substratos vivos ou inertes. Essa matriz não apenas promove a coesão interna, mas também confere propriedades específicas ao biofilme, influenciando também nas taxas de crescimento, resistência e seu formato (Maier, 2021; Rather, Gupta, Mandal, 2021; Matz *et al.*, 2004), refletindo a adaptação dinâmica da comunidade às condições do ambiente.

Os biofilmes, exemplificados em sua estrutura clássica assemelhando-se a cogumelos, são especialmente bem representados no modelo característico da bactéria *P. aeruginosa*, frequentemente escolhida como organismo modelo em estudos biofilmáticos. Este processo, composto por cinco etapas distintas, é influenciado por diversas forças, como a gravidade, a composição da superfície habitada, sinais químicos e as forças hidrodinâmicas, todos trabalhando em conjunto com a expressão gênica (Sauer, 2022; Kim, 2020; Zhao *et al.*, 2017).

Internamente, a matriz do biofilme supera a simples composição de EPS, incorporando uma variedade essencial de componentes, como a adesina polissacarídica intercelular (PIA), outros polissacarídeos, proteínas, lipídios e DNA extracelular (eDNA), todos compartilhados entre os microrganismos que constituem a comunidade (Maier, 2021). Essa composição diversificada não apenas fortalece a coesão estrutural, mas também desempenha um papel fundamental nas interações e na funcionalidade global da comunidade microbiana.

Na matriz de biofilmes de *P. aeruginosa*, três exopolissacarídeos desempenham papéis cruciais. O alginato, *Psl* e *Pel*, produzidos pela bactéria, não apenas promovem a adesão dos diversos componentes, mas também contribuem para a construção do próprio biofilme e atuam como fatores de virulência em infecções (Gheorghita, 2023; Neves *et al.*, 2021). Essa inter-relação complexa destaca a multifuncionalidade desses exopolissacarídeos na dinâmica do biofilme, tanto como componentes estruturais quanto como elementos potenciais de manutenção, adaptabilidade e patogenicidade.

Para a consolidação da comunidade microbiana, são necessárias cinco etapas na formação do biofilme, conforme visualizado na Figura 1. A primeira dessas etapas, a adesão

inicial das células bacterianas, é crucial no processo de formação do biofilme, envolvendo estágios reversíveis que desempenham papel significativo na transição da vida livre para a comunidade biofilmática. Essa fase é marcada pelo fraco apego das bactérias à superfície do substrato, onde as inserções celulares ainda mantêm certa flexibilidade, permitindo que as células retornem ao estilo de vida original (Sharma *et al.*, 2023; Ma *et al.*, 2022).

Figura 1 – Etapas de formação de um biofilme

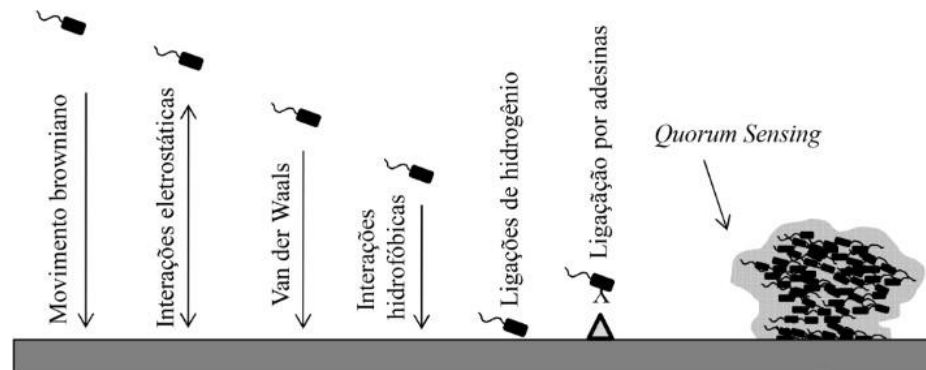


Na imagem, destaca-se a diversidade presente no biofilme bacteriano. As representações em verde evidenciam as células livres (flageladas) e as sésseis (sem flagelos). Em preto, são identificadas as mortas, enquanto em marrom as persistentes. Os canais de água são representados em amarelo. São perceptíveis outras moléculas biológicas, como lipídios, proteínas, polissacarídeos, DNA extracelular (eDNA) e substâncias sinalizadoras, como a acil-homosserina lactonas (AHL).

Fonte: adaptado de Rather; Gupta; Mandal (2021)

Para tal, estruturas extracelulares, como flagelos, *pili* e uma pequena quantidade de EPSs, desempenham um papel significativo no processo de adesão célula-substrato. Essa fixação inicial é transitória e influenciada por uma variedade de fatores, como composição do material, propriedades da superfície da célula bacteriana, temperatura e pressão. Forças como adesão hidrodinâmicas, interações hidrofóbicas, estérica, eletrostática, *van der Waals* e proteica contribuem para o grau de adesão, conforme ilustrado na Figura 2. Esse estágio preparatório, caracterizado pela adesão frouxa e reversível às superfícies, estabelece as bases para a subsequente formação estruturada do biofilme, marcada pela adesão irreversível (Sauer *et al.*, 2022; Zhao *et al.*, 2017).

Figura 2 – Interações físico-químicas na adesão inicial de células bacterianas na formação do biofilme.



Adesão inicial de células livre à uma superfície, destacando interações físico-químicas.
Fonte: adaptado Trentin; Giodani; Macedo (2013).

A transição do estágio inicial da adesão célula-substrato, para etapa subsequente de adesão irreversível das células bacterianas, desempenha um papel crucial na formação do biofilme, sendo um processo dinâmico influenciado por variados fatores ambientais. Durante esta etapa, a interação entre as bactérias e a superfície intensifica-se à medida que o nível de produção EPS aumenta, dando condições para transição à fixação irreversível. Nesse estágio, especialmente em *P. aeruginosa*, as células ajustam sua orientação no substrato, passando da fixação em um único polo, durante a adesão inicial, para fixação ao longo do seu eixo longitudinal, formando agregações entre si e com outros organismos presente a superfície, como mostrado na figura 1 (Sharma *et al.*, 2023; Sauer *et al.*, 2022).

Contudo, é a molécula mensageira monofosfato de guanosina dimérico bis-(3'-5')-cíclico (c-di-GMP), cuja concentração aumenta durante a formação do biofilme, que desempenha um papel fundamental no processo. Essa molécula atua restringindo a motilidade natatória das células, bem como amplificando a produção da matriz do biofilme. O resultado é a conversão de células livres de superfície para sencientes, culminando na fixação irreversível dos microrganismos e na consolidação da estrutura do biofilme (Lichtenberg *et al.*, 2022; Jenal; Reinders; Lori, 2017).

Enquanto a adesão irreversível e a consolidação estruturada marcam as etapas iniciais, nas fases subsequentes do desenvolvimento do biofilme, o EPS autoproduzido continua a desempenhar um papel central. Classificadas como as etapas três e quatro, a formação de microcolônias e a maturação do biofilme revelam o impacto significativo do EPS nesse processo (Rather, Gupta, Mandal, 2021). A formação de microcolônias é crucial para a consolidação do biofilme, estimulando a proliferação e divisão celular, mediadas pela sinalização química do EPS, originando microcomunidades (Ma *et al.*, 2022). Este fenômeno

não apenas cria condições para a cooperação eficiente entre essas comunidades, mas também estabelece a base para associações sintróficas, otimizando a utilização de substratos, fluxo de produtos metabólicos e eliminação de resíduos.

Após à formação das microcolônias, a maturação do biofilme destaca-se pela atuação do EPS, que facilitando a fixação microbiana, estabilizando a estrutura tridimensional (3D) e protegendo contra estresses, incluindo resposta imunológica, antimicrobianos e danos oxidativos (Toyofuku *et al.*, 2016). Essa fase finaliza com a constituição de biofilmes maduros, caracterizados por uma estrutura densa, composta por várias camadas de aglomerados celulares organizados com base na autotolerância e taxa de metabolismo. Essas camadas incluem a camada reguladora interna, camada basal microbiana intermediária e camada externa habitada por microrganismos planctônicos prontos para deixar o biofilme na última etapa, a dispersão (Sharma *et al.*, 2023; Toyofuku *et al.*, 2016). Essa fase marca o início da liberação das bactérias no meio, um processo desencadeado por diversos sinais ambientais e fatores internos da macrocolônia.

Nesta etapa, a liberação das bactérias planctônicas é desencadeada por diversos sinais ambientais e fatores internos da macrocolônia. A escassez de nutrientes, minerais, água, degradação de enzimas e do EPS, disponibilidade de proteínas, regulação gênica e variações nos níveis de c-di-GMP, entre outros, influenciam esse processo. Essa fase, também denominada dispersão de sementeira, representa o final do ciclo de formação de um biofilme. Ela proporciona aos microrganismos dispersos a oportunidade de colonizar novos ambientes ou sítios anatômicos, iniciando um novo biofilme (Rumbaugh; Sauer, 2020; Morgan *et al.*, 2006).

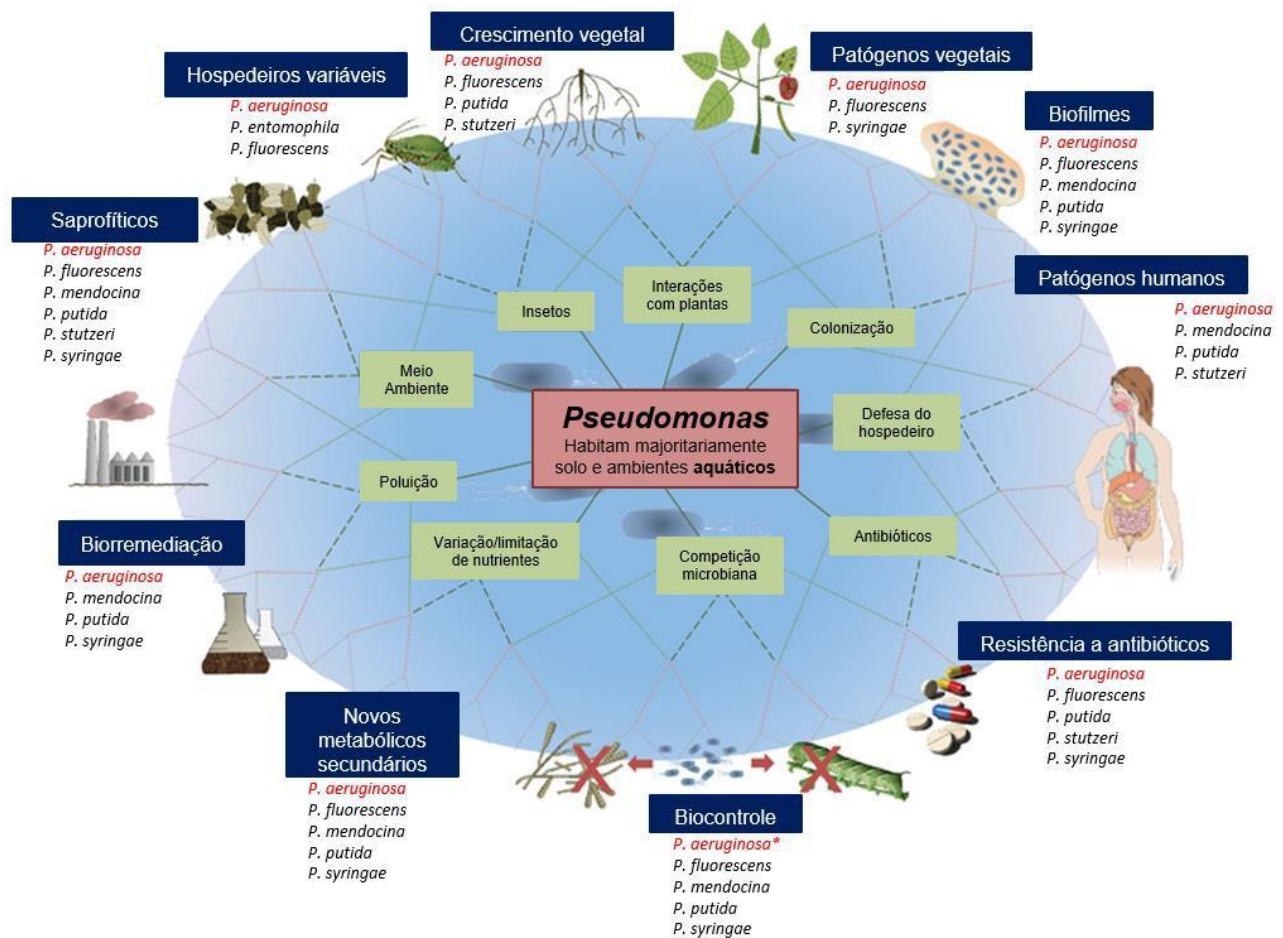
Além da dispersão e colonização de novos ambientes, a vida no biofilme oferece grandes vantagens adaptativas em comparação à vida planctônica. Dentro do biofilme, as bactérias possuem uma absorção de nutrientes mais eficiente, alimentação cruzada e eliminação de metabólicos prejudiciais. A matriz polimérica oferece suporte estrutural e atua como um *bunker* protetor. Isso não apenas confere defesa contra o sistema imunológico, mas também evita o acesso dos agentes antimicrobianos, incluindo biocidas, agentes oxidantes e antibióticos, enquanto aumenta fatores de virulência (Kolpen *et al.*, 2022; Zhao *et al.*, 2017; Chandki; Banthia; Banthia, 2011). Para tal, a capacidade de sinalização entre as bactérias dentro do biofilme é fundamental para a eficácia das estratégias adaptativas. *P. aeruginosa* utiliza o *Quorum sensing* (QS) como um mecanismo para coordenar comportamentos coletivos, que são conduzidos por interações moleculares, tendo papel chave na persistência e virulência bacteriana.

2.2 *Pseudomonas aeruginosa* e mecanismos de adaptabilidade

Nesse contexto, o biofilme configura-se como um dos principais mecanismos estratégicos para a manutenção de microrganismos em diversos locais, proporcionando condições para que as espécies que o constituem possam competir no ambiente e permanecer em meio variados. *P. aeruginosa* destaca-se como organismo modelo nos estudos de formação de biofilme, devido à notável capacidade nesse processo (Thi; Wibowo; Rehm, 2020). Essa bactéria apresenta uma distribuição abrangente em diversos ambientes, incluindo solo, água, plantas e tecidos de mamíferos.

Sua versatilidade e adaptabilidade possibilita a manutenção e desenvolvimento em ambientes tanto naturais, principalmente aquáticos, quanto artificiais, como dispositivos médicos, ambientes hospitalares e ralos de pias (Remold *et al.*, 2011; Frimmersdorf *et al.*, 2010). Além disso, *P. aeruginosa* utiliza uma variedade de fatores de virulência, como flagelo, *pili*, o próprio biofilme e um eficiente sistema de comunicação denominado *quorum sensing* (QS), para efetiva fixação e colonização, de acordo com Sauer *et al.* (2022) e Secchi *et al.* (2022). A Figura 3 ilustra o quão versátil e adaptável é essa bactéria, evidenciando sua capacidade de desenvolvimento em uma variedade de ambientes e estabelecer interações biológicas consistentes de interesse clínico, ambiental e biotecnológicos.

Apresentando características morfológicas e fisiológicas distintas, *P. aeruginosa* é uma bactéria móvel e de natureza aeróbica, não formadora de esporos, classificada como Gram-negativa e em forma de bacilo, com bom crescimento à 37°C, mas tolerante a temperaturas que variam de 4° C e 42°C (Behzadi; Baráth; Gajdács, 2020; Labauve; Wargo, 2015). Pertencente à família Pseudomonadaceae, embora raramente cause infecções em indivíduos saudáveis, torna-se uma ameaça significativa em contextos nos quais a imunidade do hospedeiro está comprometida, sendo considerada oportunista e exibindo alta resistência a antimicrobianos (Frigoli *et al.*, 2023; Tuon *et al.*, 2022). Desde 2017, pela Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica *P. aeruginosa* como uma bactéria multirresistente, diversos isolados da espécie apresentando resistência intrínseca a múltiplos antimicrobianos (Bail *et al.*, 2021; Ito *et al.*, 2021), aumentando a necessidade do desenvolvimento de novos antibióticos ou de novos protocolos de tratamento.

Figura 3 – Distribuição e interações de *Pseudomonas aeruginosa*

Distribuição e diversidade de *P. aeruginosa* em diferentes ambientes, destacando seu papel em diversas atividades biológicas. Fonte: adaptado de Silby *et al.* (2011).

Essa resistência é atribuída a diversos fatores de virulência, à capacidade de adaptabilidade ao ambiente, à estrutura do biofilme e à formação de sideróforos, termo originado do grego, significando “portadoras de ferro”. Essas moléculas desempenham um papel importante na competição e aquisição de ferro heme e férricos. O processo de absorção envolve transportadores específicos presentes na membrana externa das bactérias Gram-negativas, conhecidos como transportadores dependentes de TonB (TBDTs) (Schalk; Perraud, 2022). *P. aeruginosa*, assim como outras bactérias, sintetiza esses sideróforos por meio de enzimas, secretando-os para o ambiente circundante. Essa estratégia eficiente supera a limitação de biodisponibilidade do ferro, essencial para o metabolismo bacteriano e expressão de outros fatores de virulência (Ghssein; Ezzeddine, 2022). Entre esses sideróforos produzidos por *P. aeruginosa*, destacam-se a pioquelina e a pioverdina, sendo este último classificado, em três tipos: pioverdina tipo I, tipo II e tipo III, conforme Meyer *et al.* (1997).

Além disso, a bactéria produz substâncias tóxicas, como a piocianina, composta de fenazina, um metabólico secundário de coloração azul esverdeado, que é um biomarcador para

identificação de *P. aeruginosa* (Mues e Chu, 2020; Gellatly e Hancock, 2013). A piocianina possui a capacidade de oxidar e reduzir outras moléculas, atuando, portanto, como uma atividade redox na transferência de elétrons (Debritto *et al.*, 2020). Adicionalmente, ela contribui significativamente para a promoção da apoptose por meio do estresse oxidativo, resultante da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Alatraktchi; Svendsen; Molin, 2020), inclusive em células tumorais.

A piocianina, um metabólico eletroquimicamente ativo, associado a diversas funções biológicas essenciais, como destacado por Hall *et al.* (2016) e Jayaseelan *et al.* (2014), desempenha papel crucial na manutenção e virulência de *P. aeruginosa*. Isso inclui a participação na aquisição ferro, proteção contra células imunológicas, comunicação celular e ação como agente antibacteriano e antifúngico, conferindo vantagem competitiva à bactéria.

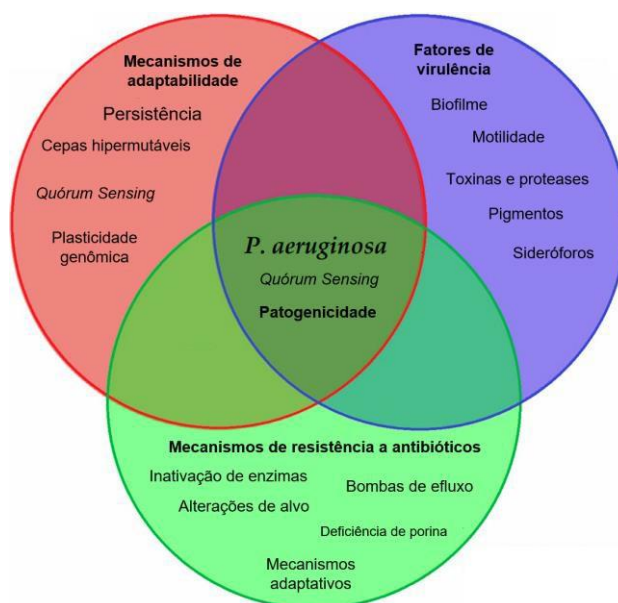
Dentre os fatores de virulência associados à estrutura celular, o flagelo desempenha papel essencial na motilidade de *P. aeruginosa*, além das fímbrias com papel de aderência e uma motilidade significativa, classificada em três tipo: *swarming*, *swimming* e *twitching*. A expressão desses movimentos é influenciada pela composição e viscosidade do meio, concentração de oxigênio, fluxo do fluido e a presença do pili na estrutura (Ghorbal *et al.*, 2019; Mattingly *et al.*, 2018).

Segundo Pastora, Rzasa e O'Toole (2024) e Mesquita, Soares-Castro e Santos (2013), a motilidade do tipo *swarming* envolve um movimento coordenado e coletivo, permitindo que toda a comunidade bacteriana se desloque por um meio sólido, dependendo da ação conjunta do flagelo e do *pili* do tipo IV. Na motilidade *swimming*, a locomoção é individual e ocorre por meio de movimento rotatório dos flagelos em meio aquoso ou semissólido, impulsionando a o deslocamento frontal. Já na motilidade do tipo *twitching*, o deslocamento se dá por meio de movimento de extensão e retração do *pili* tipo IV em meio sólido.

Essa diversidade de movimentos destaca a complexidade e reforça a diversidade das interações bacterianas. Intrigantemente, as complexas interações entre as bactérias, especialmente em contextos como a formação de biofilmes, não são apenas resultado de respostas individuais, mas sim de uma comunicação coletiva intercelular eficiente. O QS, é o sistema que coordena comportamentos síncronos e coletivos em populações bacterianas, como às mudanças ambientais e estresse fisiológico, além de estar diretamente ligado a controle da expressão gênica, a partir da população formadora, sinalização celular e produção de metabólicos (Silva *et al.*, 2020; Gellatly e Hancock, 2013). No caso de *P. aeruginosa*, essa capacidade de sinalização desempenha um papel fundamental na regulação da formação e persistência de biofilmes, nas respostas biológicas em nível comunitário, manutenção

microbiana e na produção dos seus diferentes fatores de virulência (Pena *et al.*, 2019), revelando uma intrincada rede de sinais moleculares que confere a capacidade adaptativa da espécie. A Figura 4 ilustra a extensão de envolvimento do QS na patogenicidade da *P. aeruginosa*.

Figura 4 – Mecanismos de virulência, adaptabilidade e resistência influenciados pelo *Quorum sensing* na patogenicidade de *Pseudomonas aeruginosa*



Fonte: adaptado de Behzadi, Baráth e Gajdács (2020).

Os mecanismos de adaptabilidade da *P. aeruginosa* são tão diversos quanto sua notável plasticidade ambiental, permitindo sua presença nos mais variados ecossistemas e influenciando diversos âmbitos (Vianna, 2020). Essa capacidade única é impulsionada, em parte, pelos sistemas de comunicação celular conhecidos como QS. Baseado em três sistemas centrais: Las, Rhl, e Pqs, o QS é regulado por moléculas autoindutoras, como a Acil-homosserina lactona (AHL) e o sinal de *Pseudomonas* quinolona (PQS) (Abdelaziz *et al.*, 2023; Abdelaziz *et al.*, 2022; Chadha; Harjai; Chhibber, 2021; Emerenini *et al.*, 2015; Hense e Schuster, 2015). Esses autoindutores desempenham um papel crítico na expressão e regulação da piocianina, um dos fatores de virulência distintivos de *P. aeruginosa* (Gonçalves e Vasconcelos, 2021). A produção aumentada de piocianina, em resposta ao aumento do teor de AHL, destaca a importância desses sistemas de interação na fisiologia bacteriana.

A presença de *P. aeruginosa* em efluentes, como águas residuais e sistemas de esgoto, destaca-se como uma preocupação significativa do ponto de vista da Saúde Única. Esses ambientes, pontos de encontro entre resíduos humanos, animais e outros materiais orgânicos, fornecem um substrato propício para o desenvolvimento e disseminação de microrganismos

potencialmente patogênicos, incluindo *P. aeruginosa* (Almeida *et al.*, 2023; Soares, 2020). Sua presença nesses locais não apenas tem implicações diretas na saúde pública, ambiental e animal, mas também gera impactos econômicos significativos, devido à formação persistente de biofilmes. Essa interconexão entre os mecanismos de adaptação bacteriana e suas implicações em diferentes contextos destaca a necessidade premente de abordagens integradas para lidar com os desafios impostos pela presença dessa bactéria em ambientes diversos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a formação de biofilmes em isolados de *Pseudomonas aeruginosa* obtidos das pias de laboratório didático multiusuário de saúde.

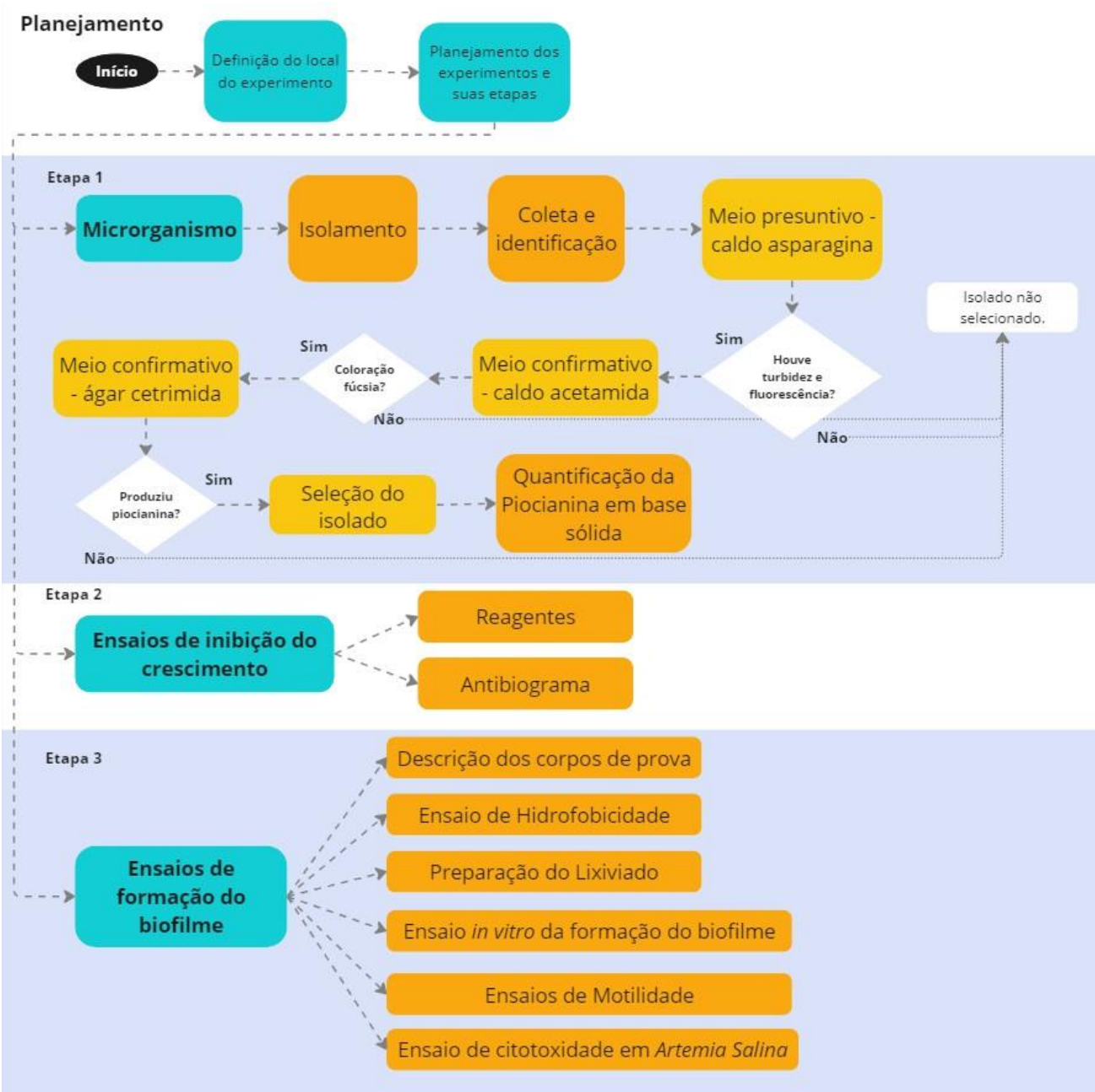
3.2 Objetivos específicos

- ❖ Isolar espécimes de *P. aeruginosa* dos ralos e tubulações;
- ❖ Quantificar a piocianina produzida pelos isolados;
- ❖ Determinar o perfil de susceptibilidade a antibióticos do esquema empírico antipseudomonas;
- ❖ Testar a toxicidade do lixiviado;
- ❖ Quantificar as células organizadas no biofilme exposto ao lixiviado;
- ❖ Identificar alterações da motilidade dos isolados expostos ao lixiviado.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A Figura 5 proporciona uma visão abrangente das etapas e experimentos que fundamentam o presente estudo.

Figura 5 – Representação visual das etapas dos experimentos



Fonte: Autoria própria, 2024.

4.1 Local do Experimento

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMA) do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba.

4.2 MICRORGANISMO

4.2.1 Isolamento e identificação

O estudo foi conduzido com isolados selvagens de *P. aeruginosa* obtidos dos ralos de três pias (denominadas por LM1; LM2 e LM3) de um Laboratório didático multiusuário de saúde, obtidos empregando o método 9213F do APHA; AWWA; WEF (2012). As pias são utilizadas em aulas práticas e os efluentes produzidos são compostos por corantes, soluções degermantes, limpeza de material, entre outros. Inicialmente as torneiras foram abertas para que a água corresse pelos ralos, com o intuito de remover possíveis sujidades e contaminantes transitórios. Em seguida, o isolamento foi realizado por raspagem, com auxílio de um *swab* esterilizado, nas paredes internas de ralos e tubulações de LM1, LM2 e LM3 e posteriormente transferidos para tubos de ensaio contendo 10 mL do meio presuntivo de *Pseudomonas* spp., caldo asparagina e após 24-48h à 37°C, os tubos foram inspecionados para verificação de turbidez e fluorescência a 240 nm. Em seguida, alíquotas de 1 mL dos tubos positivos foram transferidas para novos contendo meio confirmativo de *P. aeruginosa*, caldo acetamida, sendo novamente incubados por 24-48h à 37°C, para observação de formação de coloração fúcsia. Desses tubos positivos, alíquotas de 1 mL foram transferidas para placas de Petri contendo 10 mL de ágar Cetrimida, para confirmação da espécie por meio da produção de piocianina sob incubação à 42°C por 24-48h. As colônias produzidas nessas placas na presença de piocianina foram transferidas para tubos inclinados contendo ágar nutriente para manutenção (APHA; AWWA, WEF, 2012; Gonçalves; Franco; Oliveira, 1998). Os isolados foram codificados e posteriormente depositados na plataforma SisGen, cujo número de acesso está apresentado na sessão de resultados.

4.2.2 Quantificação da piocianina em base sólida

De acordo com a metodologia adaptada proposta por Abou *et al.*, (2018), os isolados foram incubados em ágar cetrimida por espalhamento. Após uma incubação por 96h à 29±1°C, a superfície do ágar foi lavada com água destilada esterilizada, e o ágar foi então cortado em pequenos cubos, que foram transferidos para tubos de centrifugação com capacidade para 50 mL, contendo 20 mL de clorofórmio. Após agitação por 10 minutos em vórtex, foram adicionados 10 mL de solução de HCl 0,2 mol/L. Após nova agitação, a solução foi neutralizada com tris-HCl 1,5 mol/L, aplicado por cuidadoso gotejamento até retomar a cor azul. Após repouso, foi possível observar a piocianina retida no clorofórmio, apresentando coloração em azul.

Em seguida, adicionou-se ágar cubos em 20 mL clorofórmio, seguido de agitação por 10 minutos, transcorrido o tempo, foram adicionados 10 mL de solução de HCl 0,2 mol/L, seguida por nova agitação, que foi novamente agitada para obter a piocianina em sua forma protonada, adquirindo uma coloração avermelhada. O valor da absorbância a 690nm foi então aplicada à equação de uma curva padrão para determinar a concentração de piocianina em sua forma ácida, conforme a seguinte fórmula:

$$PYO_1 (\mu\text{g/mL}) = (8,9968 \times \text{ABS}_{690} + 4 \times 10^{-5}) \quad (\text{Eq. 1})$$

Em seguida, este valor foi convertido para $\mu\text{g/L}$, considerando o volume do cilindro na placa, conforme a equação:

$$PYO_2 (\mu\text{g/L}) = [PYO_1 \times 31,7925] \div 20 \quad (\text{Eq. 2})$$

4.3 ENSAIOS DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO

4.3.1 Reagentes

No contexto do experimento, os reagentes desempenham um papel importante, entrando em contato direto com os ralos das pias e demais estruturas. Essas substâncias foram agrupadas de acordo com seus usos principais (Gatelli; Bortolini, 2014). No grupo de antissépticos e antimicrobianos, o Digliconato de Clorexidina 2%, utilizado para promover a assepsia (Soares *et al.*, 2021), e a Violeta Genciana, corante com atividade antisséptica. Além disso, o Iodo Iodeto Lugol 2%, Peróxido de Hidrogênio 3%, e Sulfato de Zinco 33%, são empregados para inibir o crescimento de microrganismos.

No grupo de Agentes de Coloração e Reagentes Laboratoriais, a Violeta Genciana, Azul de Metileno 1%, e Fucsina Fenicada de Gram atuam no processo de coloração diferencial em análises laboratoriais, e o Reativo de Biureto, importante para a detecção de proteínas.

4.3.2 Antibiograma

A avaliação de suscetibilidade a antibióticos dos isolados foi determinada pelo método Kirby-Bauer. Para tal, a suspensão de células com $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (tudo 0,5 da escala de MacFarland) foi inoculada na superfície do ágar Mueller-Hinton e após secar, foram adicionados os discos contendo antibióticos (ATB) empregados no esquema empírico antipseudomonas: ceftazidima (CAZ, 30 μg), imipenem (IPM, 10 μg), tobramicina (TOB, 10 μg), ciprofloxacina (CIP, 5 μg), levofloxacina (LE, 5 μg), Cefoxitina (CFO, 30 μg) e Cefepime (CPM, 30 μg). A placa foi incubada à 37°C por 18h, com as zonas de inibição medidas em milímetros (CLSI, 2020).

4.4 ENSAIO DE FORMAÇÃO DO BIOFILME

4.4.1 Descrição dos corpos de prova

Substâncias hidrofóbicas podem ser entendida como a repelência à água, dificultando o seu molhamento (Hallet, 2008), enquanto as hidrofílicas demonstram afinidade com a água (Motlagh *et al.*, 2015). Neste experimento, corpos de prova de dois grupos foram selecionados para representar materiais com comportamentos hidrofóbicos e hidrofílicos. O grupo hidrofóbico incluiu policloreto de vinil (PVC) e polipropileno, enquanto o grupo hidrofílico foi composto por alumínio 6061, dolamita, ferro galvanizado e vidro. A escolha desses materiais baseou-se na proximidade com os compostos encontrados nas pias dos laboratórios didáticos e nas tubulações, visando simular condições do ambiente real. Cada corpo de prova tinha área mínima de superfície de 1000 mm².

4.4.2 Ensaio de hidrofobicidade

Para o ensaio de hidrofobicidade, a técnica de adesão microbiana à hidrocarbonetos (MATH) foi realizada conforme descrito por Tyfa *et al.* (2015) e Azevedo e Cerca (2012) com adaptações. De forma resumida, foi preparada uma suspensão do isolado em uma solução tampão fosfato (PBS), com densidade óptica variando entre 0,4-0,6 e 600 nm. Posteriormente, foi acrescida 0,5 ml de xileno a 2,5 ml da suspensão; passando por um processo de agitação em vórtex por 1 minuto e repouso de 10 minutos a 25°C, sendo repetido em seguida, mantendo o tempo de agitação e repouso. Após 10 e 60 minutos de repouso, a porcentagem de hidrofobicidade foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$[(1-A_i) \div A_f] \times 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

4.4.3 Preparação do Lixiviado

Foram utilizadas soluções de digliconato de Clorexidina 2%, Violeta Genciana Fenicada, Azul de metileno 1%, Iodo Iodeto Lugol 2%, Peróxido de Hidrogênio 3%, Sulfato de zinco 33%, Fucsina Fenicada de Gram e Reativo de Biureto. O lixiviado foi obtido pela combinação das substâncias descartadas no ralo com os reagentes mencionados na seção 4.3.1. Esse lixiviado foi diluído em água destilada. Para preparar o lixiviado, 2 mL de cada uma das seguintes substâncias: digliconato de Clorexidina 2%, Violeta Genciana Fenicada, Azul de metileno 1%, Iodo Iodeto Lugol 2%, Peróxido de Hidrogênio 3%, Sulfato de zinco 33% e Fucsina Fenicada de Gram, juntamente com 1ml de Reativo de Biureto. Após a mistura de todas as substâncias, foi utilizada a mistura com água destilada para a formação do lixiviado na

concentração desejada, 1%. O Lixiviado foi armazenado em temperatura ambiente, entre 25°C e 30°C.

4.4.4 Ensaio *in vitro* da formação do biofilme

A água residuária foi preparada com a seguinte composição (em mg/L), equivalentes a uma Demanda Química de Oxigênio, DQO, de 20.000 mg/L: sacarose (17), extrato de levedura (3,92), ureia (1,24), K₂HPO₄ (0,065), KH₂PO₄ (0,055), CaCl₂ (0,055), MgSO₄ (0,045) e FeCl₃ (0,005), pH = 7,0±0,2 (Reyes-Lara; Reyes-Mazzoco, 2009). A água residuária sintética foi ajustada para a concentração de 1.000 mg/L.

Para os ensaios de formação do biofilme foram realizados em triplicata, frascos de vidro foram utilizados como base para o teste. Cada frasco continha 100 mL de lixiviado em diferentes concentrações, um corpo de prova imerso e o sistema foi inoculado com 1 mL da suspensão de células de cultivo recente, preparadas em NaCl 0,9%. Após incubação à 37°C por 48h, o corpo de prova foi removido dos frascos como auxílio de uma pinça metálica, lavado vigorosamente em água corrente e transferido para uma placa de Petri contendo 3 mL da solução Cristal Violeta 1%. O tratamento foi realizado por 20 minutos. Após esse período, o corpo de prova foi lavado com água corrente e imerso em álcool etílico 95% P.A pelo mesmo volume por 30 minutos. Em seguida, a absorbância da mistura cristal violeta-álcool foi medida a 690 nm (Anderson, 2008; Balasubramanian *et al.*, 2012), utilizando um espectrofotômetro de modelo UV Drwell Lab, DU-8200, 190-1100nm.

Os ensaios foram triplicados em três diferentes testes, cada teste representando uma condição simulada. No Teste 1 (T1), foram utilizados água residuária, lixiviado e *P. aeruginosa*; no Teste 2 (T2), água residuária e lixiviado; e o controle no Teste 3 (T3), composto por água residuária e *P. aeruginosa*.

Para cada condição simulada, foram realizados ensaios utilizando seis corpos de prova diferentes, conforme listados no tópico 4.4.1. A área de contato foi de 1000 mm².

Inicialmente, calculou-se a média simples dos resultados dos ensaios triplicados para cada condição simulada usando a fórmula:

$$\text{Média} = \frac{\text{Soma dos Resultados}}{\text{Número de Observações}} \quad (\text{Eq. 4})$$

Em seguida, calculou-se o desvio padrão para cada condição a partir dessa média simples usando a fórmula:

$$\text{Desvio Padrão} = \sqrt{\frac{\sum (\text{Resultado} - \text{Média})^2}{\text{Número de Observações}}} \quad (\text{Eq. 5})$$

Posteriormente, aplicou-se a raiz cúbica de 3 ao resultado do desvio padrão para cada situação simulada:

$$\text{Raiz Cúbica} = \sqrt[3]{\text{Resultado do Desvio Padrão}} \quad (\text{Eq. 6})$$

Para avaliar a adesão da *P. aeruginosa*, a média foi corrigida subtraindo T2 de T1 e, em seguida, aplicando a raiz cúbica a esse resultado de subtração:

$$\text{Resultado Corrigido} = \text{Raiz Cúbica} (\text{Média}(T1) - \text{Média}(T2)) \quad (\text{Eq. 7})$$

O resultado foi submetido a testes estatísticos, e o percentual de inibição da adesão foi calculado pela diferença entre as médias das densidades óticas (OD) da água residuária, lixiviado e *P. aeruginosa* e do controle. Esse valor foi então dividido pela OD do controle e multiplicado por 100 usando a fórmula:

$$\% \text{ Inibição} = \left(\frac{\text{Média}(\text{OD da água residuária, lixiviado e } P. \text{ aeruginosa}) - \text{Média}(\text{OD do controle})}{\text{OD do controle}} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 8})$$

Com base nesses cálculos, a adesão e o tipo de inibição foram classificados como fraca se < 40%, moderada se entre 40% e 80%, ou forte se > 80% (RODRIGUES *et al.*, 2010). Além disso, os resultados foram submetidos a dois testes estatísticos, o teste de Shapiro-Wilk e de Levence, e a diferença entre eles foram avaliadas por ANOVA two-way seguida pelo teste post-hoc de Tukey com significância de 0,05.

4.4.5 Ensaios de motilidade

Uma suspensão de *P. aeruginosa* do isolado 3A de cultivo recente foi preparada, ajustando a turbidez ao tubo nº 0,5 da escala de McFarland. Em seguida, a suspensão foi inoculada em diferentes condições do meio de cultura utilizando ágar Müeller Hinton (MH): na superfície do ágar MH sólido para verificar da motilidade *swarming* (movimento coletivo por flagelos e *pili* tipo IV), em ágar MH semissólido para motilidade *swimming* (deslocamento individual e por movimento rotatório do flagelo), e no fundo da placa de Petri com ágar nutriente sólido para motilidade *twitching* (movimento de extensão e retração como *pili* do tipo IV) (Rossi *et al.*, 2018). As placas foram incubadas por 48 h à 30±1 °C e após, mediu-se o diâmetro da zona de deslocamento (mm) a partir do ponto de inoculação. O controle do teste foi realizado com meios sem lixiviado. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.4.6 Ensaio de citotoxicidade em *Artemia Salina*

Foi realizado um ensaio de citotoxicidade utilizando náuplios de *Artemia salina*, seguindo a metodologia adaptada proposta por Meyer (1982). Para estimular a eclosão dos ovos

de *A. salina*, uma solução foi preparada, contendo uma concentração de 30 g L⁻¹ de sal marinho. Além disso, o pH da solução foi ajustado para ficar entre 8,0 e 9,0, utilizando uma solução de NaOH 0,1 mol/L. Os ovos foram incubados na solução salina por 48 horas, com aeração constante a 25°C. Após a eclosão, 10 larvas recém-eclodidas foram transferidas para tubos Falcon de 50 mL contendo uma solução de água residual (1000 ppm) + lixiviado (1%). Para fins de controle negativo, 10 larvas do crustáceo foram mantidas em uma solução salina onde os náuplios já haviam eclodido. Os ensaios foram tratados em quintuplicada, e após 24 horas, realizaram-se a contagem das larvas vivas e mortas.

5 RESULTADOS

5.1 Isolamento, identificação e quantificação de piocianina

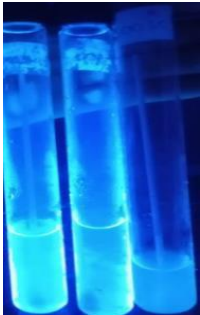
Foram obtidas 12 amostras das pias LM1, LM2 e LM3. Desse total, 11 foram positivas no ensaio presuntivo (Figura 6 e Tabela 1), indicando a presença de *Pseudomonas* spp.

Tabela 1 – Isolados bacteriano em caldo asparagina.

Caldo asparagina			
Local	LM1	LM2	LM3
Coleta 1	S	S	S
Coleta 2	S	S	N
Coleta 3	S	S	S
Coleta 4	S	S	S

(Resultado: S – positivo; N – negativo)
Fonte: Autoria própria, 2024.

Figura 6 – Amostra bacteriana exposta à luz UV.



Fonte: Autoria própria, 2024.

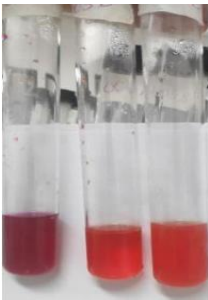
Das 11 amostras positivas no caldo Asparagina, 9 formaram a cor fúcsia no caldo acetamida, confirmativo da presença de *P. aeruginosa* (Figura 7 e Tabela 2).

Tabela 2 – Isolados de *Pseudomonas aeruginosa* em caldo acetamida.

Caldo acetamida			
Local	LM1	LM2	LM3
Coleta 1	S	N	S
Coleta 2	S	S	N
Coleta 3	S	S	S
Coleta 4	S	S	N

(Resultado: S – positivo; N – negativo)
Fonte: Autoria própria, 2024.

Figura 7 – Resultado do crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* em caldo acetamida.



Fonte: Autoria própria, 2024.

Seis dos nove isolados de *P. aeruginosa* exibiram a produção de pigmentos azulados/esverdeados no ágar cetrimida após 48 horas de incubação à 42°C (Tabela 3). Na Figura 8, é possível observar que além de piocianina, um dos isolados produziu pioverdina.

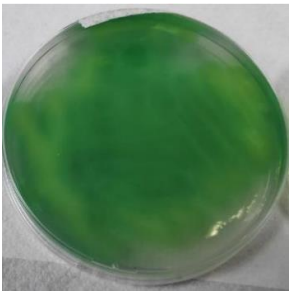
Tabela 3 – Produção de pigmentos em ágar cetrimida.

Ágar cetrimida			
Local	LM1	LM2	LM3
Coleta 1	N	N	S
Coleta 2	S	S	N
Coleta 3	S	S	S
Coleta 4	N	N	N

(Resultado: S – positivo; N – negativo)

Fonte: Autoria própria, 2024.

Figura 8 – Produção de pioverdina e piocianina em ágar cetrimida.



Fonte: Autoria própria, 2024.

Visualmente, 4 isolados demonstraram pigmento muito difundido no ágar, sendo selecionadas para o ensaio da quantificação. Dos 4 isolados, dois, 3B e 2B, destacaram-se ao produzirem exclusivamente pioverdina. Quanto à produção de piocianina, os isolados 3A e 2A apresentaram resultados semelhantes, com o isolado 2A demonstrando uma produção ligeiramente superior. Os resultados da quantificação estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Concentração de piocianina produzida por *Pseudomonas aeruginosa*

Linhagem	Resultado da absorbância a 690nm	Resultado em microgramas por mL
3A	0,013	1,405
2A	0,015	1,632

Fonte: Autoria própria, 2024.

Os quatro isolados 3A, 3B, 2A e 2B foram codificados e registrados na plataforma de Patrimônio Nacional Genético e do Conhecimento Associado (SisGen), com os números de acesso disponíveis na Tabela 5.

Tabela 5 – Linhagens selecionadas de *Pseudomonas aeruginosa* e respectivos acessos no SisGen.

Linhagem	Código	Registro no SisGen
3A	DCSA003A	ADBF7CF
3B	DCSA003B	A630377
2A	DCSA002A	AEC4165
2B	DCSA002B	A473A1B

Fonte: Autoria própria, 2024

Embora somente dois isolados tenham produzido piocianina, 3A e 2A, os quatros foram submetidos ao teste de antibiograma e aquela com o maior grau de resistência antimicrobiana foi escolhida para as etapas subsequentes (vide item 5.3).

5.2 Ensaios de Inibição do Crescimento

5.2.1 Antibiograma

Dentre as 4 amostras que apresentaram uma considerável quantidade de pigmento difundido no ágar, duas delas, 2A e 3A, confirmaram ser piocianina. Já as amostras 2B e 3B, produziram exclusivamente pioverdina. Todas as quatro amostras foram submetidas ao teste de antibiograma, seguindo a metodologia proposta. Dos sete antibióticos (ATB) selecionados, três pertencem à classe das cefalosporinas, com mecanismo de ação na inibição da síntese da parede celular bacteriana; duas são quinolonas, com o mecanismo de ação a inibição da síntese de DNA; e o último pertence à classe dos aminoglicosídeos, com ação na inibição da síntese proteica.

A linhagem 2A apresentou sensibilidade a seis dos sete ATBs testados, sendo resistente apenas à cefoxitina (CFO), uma cefalosporina de segunda geração que age na inibição da síntese da parede celular. Em contrapartida, a linhagem 2B apresentou sensibilidade a cinco dos sete ATBs, também sendo resistente à CFO e demonstrando resistência intermediária à cefepime (CPM), uma cefalosporina de quarta geração.

O padrão de resistência da linhagem 3B foi semelhante ao do isolado 2A, com sensibilidade a cinco dos sete ATBs testados. Ambas as linhagens apresentaram resistência ao CFO e resistência intermediária à ciprofloxacina (CIP), uma quinolona que age na inibição da síntese de DNA. Por outro lado, o isolado 3A foi o mais resistente, podendo ser considerada multirresistente e apresentando sensibilidade apenas a três dos sete ATBs testados. Esta linhagem manteve o padrão de resistência às cefalosporinas apresentado pelas outras linhagens, incluindo o CFO, ceftazidima (CAZ) e o CPM, que são cefalosporinas de segunda, terceira e quarta gerações, respectivamente, com mecanismo de ação na inibição da síntese da parede celular. Além disso, a linhagem 3A demonstrou resistência intermediária à CIP, assim como a linhagem 3B.

Todas as linhagens testadas demonstraram sensibilidade aos ATBs imipenem (IPM), tobramicina (TOB) e a levofloxacina (LE), que possuem um amplo espectro de ação, apesar de terem mecanismos diferentes. Entretanto, todas as linhagens apresentam resistência à cefoxitina CFO, indicando que os fármacos que interferem nas ligações entre peptidoglicanos são mais eficientes no controle do seu crescimento. Essa inibição enfraquece a parede celular bacteriana,

tornando a bactéria mais suscetível à pressão osmótica, resultando na morte bacteriana posteriormente. As informações podem ser visualizadas na Tabela 6.

Tabela 6 – Antibiograma realizado com isolados de *Pseudomonas aeruginosa*

Antimicrobianos	Concentração por disco (µg)	Classificação	Mecanismo de ação	halo 2A	interpretação 2A	halo 2B	interpretação 2B	halo 3A	interpretação 3A	halo 3B	interpretação 3B
Ceftazidima (CAZ)	30	Cefalosporina 3* - bactericida	Inibição da síntese da parede celular bacteriana	22	S	20	S	0	R	22	S
Imipenem (IPM)	10	Carbapenem - bactericida	Inibição da síntese da parede celular bacteriana	23	S	18	S	31	S	20	S
Tobramicina (TOB)	10	Aminoglicosídeo - bactericida	Inibição da síntese proteica	17	S	18	S	17	S	18	S
Ciprofloxacina (CIP)	5	Quinolona - bactericida	Inibição da síntese de DNA	26	S	23	S	16	I	20	I
Levofloxacina (LE)	5	Quinolona - bactericida	Inibição da síntese de DNA	25	S	23	S	22	S	22	S
Cefoxitina (CFO)	30	Cefalosporina 2* - bactericida	Inibição da síntese da parede celular bacteriana	5	R	0	R	7	R	7	R
Cefepime (CPM)	30	Cefalosporina 4* - bactericida	Inibição da síntese da parede celular bacteriana	23	S	17	I	0	R	18	S

"S" foi utilizado para sensível, "R" para resistente aos ATBs e "I" para intermediário, indicando a resposta da bactéria ao antibiótico testado. Além disso, o número seguido do asterisco (2*, 3*, 4*) representa a geração do antibiótico, que corresponde a um espectro de ação mais amplo e maior eficácia contra bactérias resistentes às gerações anteriores. Fonte: Autoria própria, 2024.

5.3 Ensaios de Formação do Biofilme

5.3.1 Ensaio *in vitro* da formação do biofilme

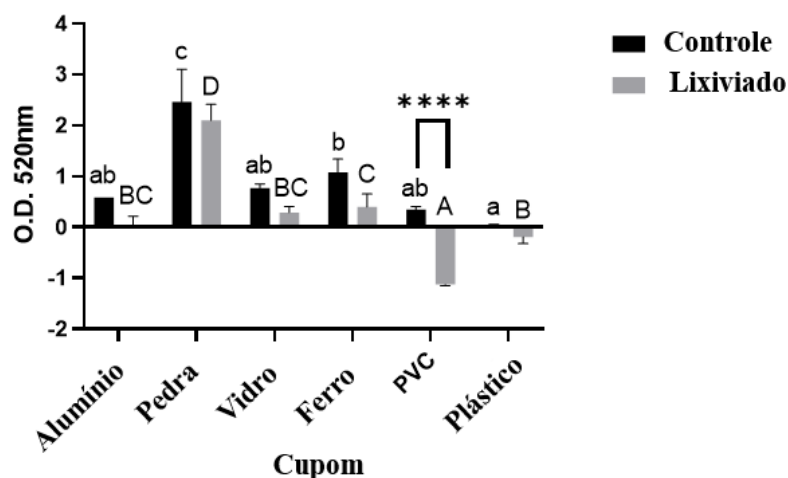
Os testes foram realizados com o isolado 3A. Houve redução em todos os corpos de prova testados, indicando a toxicidade do lixiviado. A inibição se deu mais nos corpos de prova de PVC, polipropileno e alumínio 6061 e menos ao ferro galvanizado, vidro e dolamita. De acordo com o teste de hidrofobicidade da parede celular, o isolado 3A foi identificado como hidrofílico (percentual na fase oleosa de 34,66% em 10 minutos e 11,11% em 60 minutos). A Tabela 7 resume os resultados e respectivas interpretações quanto ao percentual de inibição e o grau de adesão das células às superfícies testadas.

Tabela 7 – Resultado do ensaio *in vitro* para formação de biofilme em superfícies hidrofílicas e hidrofóbicas.

Corpo de prova	Adesão (%)	Tipo de inibição	Classificação da adesão
Alumínio 6061	– 95,0	Alta	Pouca
Dolamita	– 14,6	Baixa	Alta
Vidro	– 62,6	Moderada	Moderada
Ferro galvanizado	– 63,1	Moderada	Moderada
PVC	– 429,8	Alta	Pouca
Propileno	– 290,0	Alta	Pouca

De acordo com o percentual de redução da adesão do biofilme, a inibição é classificada como alta ($\geq 80\%$), moderada (40-80%) ou baixa ($\leq 40\%$), significando que respectivamente, as células estão pouca, moderada ou altamente aderidas.
Fonte: Autoria própria, 2024.

Já a Figura 9, representa graficamente as diferenças estatísticas entre a formação dos biofilmes nos corpos de prova. As letras minúsculas representam diferenças estatísticas significativas entre os corpos de prova sem a presença do lixiviado (grupo controle), enquanto as letras maiúsculas indicam as diferenças na presença do lixiviado. Claramente a redução mais significativa aconteceu no teste com o PVC (indicado com o asterisco). E embora houve alta redução da adesão para o polipropileno e alumínio 6061, estatisticamente, os resultados foram similares a todos os outros corpos de prova testados.

Figura 9 – Formação do biofilme nos corpos de prova hidrofílicos e hidrofóbicos.

A normalidade e homocedasticidade dos dados foram avaliadas pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. As diferenças entre os grupos foram avaliadas por ANOVA two-way seguida pelo teste post-hoc de Tukey com significância de 0,05.

Fonte: Autoria própria (2024)

Destaca-se que o corpo de prova de dolamita apresentou a adesão mais alta das células, provavelmente por conta da porosidade do material. O crescimento foi observado tanto na ausência como na presença do lixiviado, caracterizando-se como a superfície preferencial do isolado 3A. Dois corpos de prova com propriedades hidrofílicas, ferro galvanizado e vidro, também foi possível observar formação de biofilme, embora ambos também estivessem inibidos pelo lixiviado.

5.3.2 Ensaio de Motilidade

As Tabelas 8 a 10 apresentam os resultados do teste de motilidade dos tipos *Swimming*, *Swarming* e *Twitching*, respectivamente. Observou-se que em todas as modalidades houve alterações, na presença do lixiviado. Na modalidade *Swimming*, registrou-se um aumento significativo de 31,25% na corrida, no meio com lixiviado, em comparação ao meio sem lixiviado.

Tabela 8 – Resultados quantitativos da motilidade *Swimming*, evidenciando o deslocamento individual em um meio semissólido na presença e ausência de lixiviado.

Linhagem 3A	Crescimento com lixiviado em mm após 48h	Crescimento sem lixiviado em mm após 48h
Amostra 1	25	12
Amostra 2	19	14
Amostra 3	18	21
Média simples	21	16

Fonte: Autoria própria, 2024.

Por outro lado, na motilidade do tipo *Swarming* (Tabela 9), observou-se uma redução de 22,22% na corrida quando o lixiviado foi adicionado ao meio de cultura.

Tabela 9 – Análise quantitativa da motilidade *Swarming*, revelando alterações no deslocamento coletivo em um meio sólido com a adição de lixiviado.

Linhagem 3A	Crescimento com lixiviado em mm após 48h	Crescimento sem lixiviado em mm após 48h
Amostra 1	7	8
Amostra 2	8	9
Amostra 3	7	9
Média simples	7	9

Fonte: Autoria própria, 2024.

No ensaio de motilidade *Twitching* (Tabela 10), o lixiviado também atuou como inibidor, resultando em uma expressiva redução de 55,56%, sendo está a maior alteração entre os três tipos motilidade.

Tabela 10 – Resultados quantitativos da motilidade *Twitching*, destacando as modificações no deslocamento na presença do lixiviado.

Linhagem 3A	Crescimento com lixiviado em mm após 48h	Crescimento sem lixiviado em mm após 48h
Amostra 1	4	8
Amostra 2	5	9
Amostra 3	4	9
Média simples	4	9

Fonte: Autoria própria, 2024.

5.3.3 Ensaio de citotoxicidade em *Artemia Salina*

Transcorridas às 24 horas de experimento, foi possível observar que todas as *A. salinas* submetidas ao teste com lixiviado não sobreviveram, enquanto todas as do grupo controle permaneceram vivas. Esses dados propõem que uma solução contendo uma concentração de 1% de lixiviado foi altamente tóxica para esses crustáceos.

6 DISCUSSÃO

Este estudo buscou isolar *Pseudomonas aeruginosa* de ralos de pias de um laboratório de ensino e pesquisa de uma escola de saúde. Levando em consideração a afinidade da bactéria por ambientes úmidos e que sua presença nas tubulações implica sinalização de risco de contaminação de corpos hídricos por patógenos oportunistas possivelmente resistentes e causar danos à saúde ambiental no contexto *one health*. Resultados semelhantes, isto é, isolamento em ralos de pias, foram obtidos por Geyter *et al.* (2021), que isolaram *P. aeruginosa* de uma Unidade de Terapia Intensiva (UTI) na Bélgica; assim como Pirzadian *et al.* (2023), igualmente de um ambiente hospitalar. Importante ressaltar que na literatura, muito mais atenção é dada a estudos em pias de hospitais e até o momento, esse foi o primeiro relato de isolamento de *P. aeruginosa* resistentes, de pias de laboratório didático multiusuário de saúde.

Os mecanismos de adaptabilidade a ambientes estressantes à *P. aeruginosa* são diversos, uma vez que essa bactéria exibe grande plasticidade ambiental que resulta no fato da bactéria ser identificada habitando diversos ecossistemas. Sua presença em tubulações de efluentes, como águas residuais e sistemas de esgoto, representa uma preocupação significativa do ponto de vista da Saúde Única, pois esses ambientes servem como pontos de encontro entre resíduos humanos, animais e outros materiais orgânicos, fornecendo nutrientes para o desenvolvimento e disseminação de microrganismos potencialmente patogênicos (Almeida *et al.*, 2023). Estudos de Hoban *et al.* (2022) e Zhao *et al.* (2019) destacam o aumento de bactérias resistentes em ambientes não clínicos, como sistemas aquáticos, solos, estruturas abióticas e plantações, partidos de sistemas de transporte de água.

No contexto deste estudo, os isolados de *P. aeruginosa* revelaram padrões distintos de sensibilidade a diversos antibióticos, indicando uma relação intrínseca entre a resposta aos agentes antimicrobianos e as condições ambientais. A linhagem 3A foi resistente aos antibióticos Ceftazidima (CAZ), Cefoxitina (CFO) e Cefepime (CPM), que são cefalosporinas de segunda, terceira e quarta geração. Edward *et al.*, (2023) investigaram 104 isolados de *P. aeruginosa* provenientes de amostras clínicas, como secreções purulentas e urina, e observaram resistência ao CAZ e ao CPM, além de resistência ao Ciprofloxacina (CIP). Entre esses isolados, 2,9% demonstraram resistência a todos os antibióticos testados, enquanto 54,8% exibiram resistência a 10 de 11 antibióticos. Além disso, 79,8% dos isolados (83 no total) foram considerados multidrogarresistentes (MDR) por apresentarem resistência a pelo menos um ATB de cada classe selecionada (Persyn *et al.* 2019). Os estudos conduzidos por Akinduti *et al.* (2022) mostraram que, das 147 linhagens isoladas de *P. aeruginosa*, 27 foram consideradas MDR, com

a maior taxa de resistência observada para antibióticos com ação síntese na parede celular, como o Ceftazidima.

O estresse ambiental exerce influência significativa nos microrganismos, afetando seus processos fisiológicos, de virulência, metabolismo, bem como a taxa de crescimento individual e populacional, incluindo aqueles que formam o biofilme. Os agentes estressores são diversos, como pH, temperatura, pressão osmótica, produtos químicos e fármacos, como os antibióticos, que atuam como agentes bactericidas ou bacteriostáticos. É importante ressaltar que a resistência medicamentosa pode surgir como uma consequência da pressão seletiva, por razões adaptativas, e não necessariamente devido ao contato direto com o fármaco (Andrade *et al.*, 2023; Bisht; Lueche; Wakeman, 2023; Roulová *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2023). Diante desse ambiente hostil, a presença de corantes, degermantes e agentes antissépticos, como a clorexidina, pode potencializar a capacidade de resistência a essas mudanças e agentes (Soares *et al.*, 2021).

A clorexidina é um biocida lipofílico, carregado positivamente e de amplo espectro, seu mecanismo de ação é mediado pela atração da molécula catiônica pela carga negativa da superfície bacteriana, resultando em adsorção à membrana celular por interações eletrostáticas, hidrofóbicas ou por pontes de hidrogênio, dependendo da concentração, que pode variar de 0,2% a 4% (Abbood; Hijazi; Gould, 2023; Athanassiadis; Abbott; Walsh, 2008). Em concentrações elevadas, 2% ou mais, a clorexidina promove a precipitação e coagulação das proteínas citoplasmáticas, levando à morte da célula. Já em concentrações mais baixas (0,2%), a clorexidina altera a integridade da membrana celular, resultando no extravasamento de componentes bacterianos de baixa massa molecular, como potássio e fosfato, acarretando um desequilíbrio osmótico na bactéria (Abbood; Hijazi; Gould, 2023; Kluk *et al.*, 2016; McDonnell e Russel, 1999; Zanatta e Rosing 2007).

No que concerne à resistência medicamentosa de forma ampla, as bactérias Gram-negativas, grupo ao qual *P. aeruginosa* pertence, atuam por meio de quatro mecanismos distintos, classificados como limitação de absorção do fármaco, modificação do alvo da droga, inativação dos medicamentos e o efluxo da droga ativa (Reygaert, 2018). A diversidade de formas de resistência se manifesta devido a característica morfológica da bactéria, com duas membranas plasmáticas (uma interna e outra externa), capacidade de formação de biofilme, sinalização intracelular, presença dos *pili* tipo IV e flagelos (Thi; Wibowo; Rehm, 2020; TAM *et al.*, 2010). Além disso, Neves *et al.* (2021), reforçam que as pressões seletivas podem provocar alterações na expressão de alguma dessas características, influenciando genótipos e, consequentemente, a troca de genes de resistência entre a comunidade que forma o biofilme ou

a partir de incorporação de material genético por transferência gênica horizontal (Almeida *et al.*, 2023; Sánchez-Jiménez; Lhamas; Marcos-Torres, 2023), implicando em impactos na ecologia bacteriana, resistência a antibióticos e formação de biofilme.

Roulová *et al.* (2022), em seus ensaios, no estudo de 59 isolados de *P. aeruginosa* obtidos a partir de efluentes hospitalares não tratados, constatou que a maior taxa de resistência a antibióticos foi ao CIP, 18 isolados dos 59, corroborando com os ensaios anteriores. Resultados semelhantes foram obtidos por Mapipa *et al.* (2021), ao observarem que isolados de *P. aeruginosa* apresentaram o maior grau de resistência, entre os antibióticos do estudo, à cefepime e à ceftazidima. A principal forma de resistência às cefalosporinas em *P. aeruginosa* é a produção de enzimas inativadoras, como as betalactamases (Arruda *et al.*, 2019; Glen e Lamont, 2021). É relevante destacar que todas as linhagens apresentaram resistência à Cefoxitina e a expressão de betalactamases é o mecanismo mais aceito para este caso (Laborda *et al.*, 2021).

Butiuc-Keul *et al.* (2020), ao isolarem *P. aeruginosa* em amostras de água urbana, como efluentes hospitalares, estações de tratamento de águas residuais e de efluentes tratados, observaram resistência a CAZ e CPM, resultados que reforçam os deste estudo. Dados semelhantes foram corroborados por Makharita *et al.* (2020) com isolados clínicos. Essa resistência é mediada pelas betalactamases, enzimas produzidas e secretadas pela bactéria que atuam na quebra do anel betalactâmico, componente da estrutura base desses antibióticos. *P. aeruginosa* utiliza duas classes principais de betalactamases: as de espectro estendido (ESBL), mediadas por plasmídeos e com maior potencial de disseminação, e as do tipo AmpC, normalmente codificadas pelo próprio genoma de *P. aeruginosa* (Riojas *et al.*, 2021; Jenny, 2018).

Em contrastante, os estudos conduzidos por Andrade *et al.* (2023), que investigaram o perfil de resistência antimicrobiana de *Escherichia coli* e *P. aeruginosa* isoladas de água subterrânea na República da Irlanda, revelaram que os isolados de *P. aeruginosa* apresentaram sensibilidade aos antibióticos Ceftazidima e o Cefepime. Tal sensibilidade pode ser influenciada pelo ambiente rural de onde as amostras foram coletadas. Em ambientes rurais, como pastagens, pode haver uma menor pressão seletiva para o desenvolvimento de resistência antimicrobiana em comparação com ambientes urbanos, mais densamente povoados, devido à menor exposição a fontes de origem humana de contaminação, como esgotos, efluentes e resíduos industriais, que podem conter resíduos de antibióticos. No estudo conduzido por Alhadrawi e Alhadrawi (2023), isolados clínicos e ambientais, também apresentaram sensibilidade aos 10 antibióticos do estudo, entre eles o Cefepime e o Ciprofloxacina.

A presença do lixiviado causou alterações no comportamento dos isolados do presente estudo, destacando sua influência na manutenção da viabilidade celular, formação do biofilme e no deslocamento dos isolados de *P. aeruginosa*. O aumento na motilidade de 31,25% na modalidade *swimming* com lixiviado sugere uma resposta adaptativa específica, atuando no deslocamento individual em meio semissólido ou aquoso. Contudo, a presença do lixiviado demonstrou inibir tanto a motilidade do tipo *Swarming* como a *Twitching*, sugerindo que a mesma substância pode atuar de diferentes maneiras em diferentes estruturas bacterianas. No estudo conduzido por Khayat *et al.* (2022), observou-se que o citrato de sódio, nas concentrações de 4% e 5%, apresentou efeito inibidor de 80% e 87,6%, respectivamente, na motilidade *Swarming* de *P. aeruginosa*. É importante ressaltar que se trata de uma substância inorgânica, assim como aquelas utilizadas para formação do lixiviado no presente estudo.

A motilidade *Twitching* é dependente dos *pili* tipo IV, que promovem o deslocamento individual de *P. aeruginosa* em meio sólido por extensão, adesão e retração em ciclos. Essa ação é importante nos processos de adesão celular à superfície, sendo importante para a motilidade celular e fixação ao substrato (Kuhn *et al.*, 2021; Sampedro *et al.*, 2014; Talà *et al.*, 2019) e é mediada pelo sinalizador químico c-di-GMP (Khan *et al.*, 2020). Já a motilidade *Swarming*, que também utiliza os *pili* tipo IV e flagelos, ocorre em meio sólido (Otton *et al.*, 2017).

Souza *et al.* (2019) compararam fenotipicamente os três tipos de motilidade de *P. aeruginosa* - *Swarming*, *Swimming* e *Twitching* - entre isolados clínicos e ambientais. Constataram que na motilidade *Swarming* e *Twitching* não houve diferenças significativas em relação à origem do isolado. No entanto, a motilidade do tipo *Swimming* apresentou diferenças entre os dois grupos, com os isolados clínicos classificados como não móveis ou fracamente móveis, enquanto a maioria dos isolados ambientais exibiu mobilidade. Essa diferença sugere uma possível influência de fatores ambientais, uma vez que em ambientes naturais e dinâmicos, a capacidade de deslocamento pode ser um importante fator adaptativo.

Yusra (2020) analisou o efeito de óleos vegetais em fatores de virulência de *P. aeruginosa*, verificando uma atividade inibitória da motilidade *Swarming* ao óleo de canela e de eucalipto. A ação anti-*Swarming* também foi observada nos estudos de Kim *et al.* (2018), que verificaram a ação inibitória da terreína em *P. aeruginosa*. A terreína é um metabólito secundário produzido por *Aspergillus terreus*.

Ye *et al.* (2022) verificaram os efeitos da dafnetina (DAP), extrato vegetal utilizado na medicina tradicional chinesa, na motilidade de *P. aeruginosa* PAO1, obtendo resultados que indicam que a presença da DAP inibiu a motilidade do tipo *Swarming*, *Swimming* e *Twitching*,

sugerindo que o extrato vegetal influencia as atividades dos *pili* tipo IV e flagelos. Da mesma forma, Pejčić et al. (2020), relatam que a presença do extrato vegetal de manjerição (*Ocimum basilicum*) e sálvia (*Salvia officinalis*), alteraram os padrões de motilidade de isolados clínicos de *P. aeruginosa*.

Gouveia, Oliveira e Vasconcelos (2023), verificaram a influência da cafeína na motilidade de isolados de *P. aeruginosa*. Os ensaios demonstraram que a motilidade do tipo *Twitching* reduziu entre 37% e 44% com a presença da cafeína, ao contrário da motilidade *Swimming* e *Swarming*, que não apresentaram alterações significativas. Importante destacar que, segundo Abdouchakour et al. (2018), Otton et al. (2017) e Souza et al. 2019, os tipos de motilidade atuam de maneira independente, permitindo que a bactéria adapte sua atividade conforme a necessidade do ambiente. Isso inclui funções como proteção das células do sistema imune, formar biofilmes e fixação eficiente no substrato.

Além das respostas adaptativas de *P. aeruginosa* observadas em relação ao lixiviado, é crucial considerar os impactos mais amplos desse ambiente contaminado. A influência do lixiviado não se restringe apenas às respostas microbianas, mas se estende aos organismos que compartilham o mesmo ecossistema. Neste contexto, torna-se essencial investigar a toxicidade potencial desse lixiviado em organismos aquáticos, como crustáceos, que desempenham um papel fundamental na biodiversidade e na cadeia trófica. Ao realizar ensaios de toxicidade no presente estudo, *A. salina* foi empregada por ser considerado um bioindicador aquático importante (Barosa et al., 2003). Expostas ao lixiviado, observaram-se resultados preocupantes que indicam uma influência direta e prejudicial desse composto no ecossistema aquático.

As larvas de *Artemia*, escolhidas como organismos-teste devido à sua sensibilidade aos poluentes, mostraram uma taxa de mortalidade de 100% quando expostas ao lixiviado 1%, em contraste com o grupo controle, no qual todas as larvas sobreviveram. Desde 1956, ensaios utilizando *A. salina* como organismo modelo são realizados para verificar toxicidade de extratos vegetais e outras substâncias (Michael et al., 1956), devido à rapidez, alta confiabilidade e baixo custo.

Martins et al. (2021) conduziram um estudo para verificar a toxicidade de tinturas de aroeira e romã nesse crustáceo, confirmando a toxicidade dos extratos vegetais. Além disso, no mesmo estudo, os autores compararam a toxicidade da clorexidina a 0,12%, utilizado como grupo controle, com os extratos de aroeira e romã, em concordância com os resultados desse estudo, uma vez que uma das substâncias que compõem o lixiviado é a clorexidina. Senigali et al. (2020) chegaram a resultados semelhantes, em que o extrato de aroeira, entre outros testados, foi considerado tóxico para a *A. salina*.

Esse cenário reforça não apenas a toxicidade do lixiviado, mas também como uma ameaça ao equilíbrio ambiental e à dispersão de microrganismos resistentes a efluentes. Os efluentes produzidos nos laboratórios didáticos são direcionados para rede de esgotos, impactando a saúde ambiental e humana (Rocha *et al.*, 2019). Estudos adicionais seriam necessários para avaliar a toxicidade do lixiviado em organismos mais complexos, bem como o impacto dos efluentes de laboratórios multiusuários em ecossistemas aquáticos, numa perspectiva de saúde única.

Soares (2020) destacou que a abordagem Saúde Única emerge como um paradigma integrador, com o propósito sustentável de aprimorar a saúde em sua tríade. Caracterizada por uma abordagem multidisciplinar e multissetorial. Ela incentiva a colaboração entre diversos segmentos relacionados à saúde, abrangendo seres humanos, animais e ecossistemas. Essa cooperação visa enfrentar de maneira conjunta e eficaz ameaças à saúde pública, tanto em âmbito local como global, conforme definido pela Organização Mundial da Saúde (2022), reconhecendo as complexas interrelações entre esses distintos domínios da saúde.

Devido à notável capacidade adaptativa de *P. aeruginosa*, aliada à sua resistência a antimicrobianos, a bactéria demonstra habilidade para se manter em ambientes complexos, como ralos de pias, chuveiros, torneiras, sistemas de tratamento de águas residuais, sistemas de abastecimento de água e até mesmo em saída de torneiras em ambiente hospitalar (Trautmann *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2016). Essa versatilidade de adaptação permite que *P. aeruginosa* se estabeleça em diferentes sistemas, destacando a importância de compreender seus mecanismos de persistência.

O biofilme formado em diferentes superfícies abióticas, conforme observado neste estudo, atua como um reservatório persistente de *P. aeruginosa*, contribuindo para a contaminação contínua desses sistemas. Diversos fatores precisam ser levados em consideração para que o processo de adesão seja concluído, incluindo fatores externos, com interações físico-químicas, na etapa de adesão inicial ou reversível de adesão, como a composição da superfície, a tensão superficial, forças eletrostáticas e composição da membrana. Além disso, há influência de fatores ambientais, como pH, quantidade e tipos de nutrientes, temperatura e xenobióticos tóxicos, com uma difusão inferior nos biofilmes se comparada à difusão de células livres no meio (Behzadi *et al.*, 2022; Trentin; Giordani; Macedo, 2013; Stewart, 2003). Os biofilmes apresentam menor difusão de antibióticos quando comparado às células planctônicas. Essa característica é atribuída à dificuldade do fármaco, um xenobiótico, em penetrar a matriz polissacarídica da bactéria. Tal aspecto resulta em diferenças fenotípicas marcantes entre as formas livres das sésseis (Tuon *et al.*, 2022).

A formação de biofilmes em diferentes estruturas é um fenômeno complexo. Destaca-se a afinidade específica da linhagem 3A de *P. aeruginosa* por superfícies mais hidrofílicas, como dolamita, ferro e vidro, seja na presença, seja na ausência do lixiviado. Por outro lado, Quatrin *et al.* (2015) apresentaram resultados distintos, observando maior adesão no Teflon (superfície hidrofóbica), seguido por metal e politereftalato de etileno (PET), enquanto o vidro teve a menor adesão e formação de biofilme. Resultados semelhantes foram obtidos por Iseppi *et al.* (2020) em suas pesquisas sobre a capacidade de *P. aeruginosa* formar biofilme em ambiente diverso.

A divergência nos resultados pode ser atribuída a uma variedade de fatores que afetam a formação do biofilme em diferentes superfícies. Condições experimentais, metodologia aplicada, local de isolamento, temperatura e tempo de incubação são aspectos que podem influenciar na adesão e formação de biofilme em diversos substratos. Além disso, considerações genéticas, interações inter- e intraespecífica, bem como a rugosidade e aspectos físico-químicos das superfícies dos corpos de prova testados, podem contribuir para as divergências observadas (Figueiredo; Wagner; Kummerli, 2021; Gloag *et al.*, 2018). Essas divergências ressaltam a natureza dinâmica e multifacetada do processo de formação de biofilmes, sujeito a uma gama de variáveis que influenciam os resultados experimentais. Propriedades mecânicas dos biofilmes, como viscosidade e elasticidade, também podem oferecer hipóteses sobre as diferenças observadas nos resultados experimentais (Nooranidoost *et al.*, 2023).

Metcalf *et al.* (2023) destacaram que as comunidades presentes nos biofilmes têm a capacidade de se adaptar a diversos ambientes, transitando entre diferentes matrizes. Um exemplo disso é o comportamento observado em *P. aeruginosa*, que, mesmo em condições adversas, como poluição, mudanças no pH e salinidade, permaneceu presente em partículas de microplástico, bem como de vidro após os experimentos, demonstrando uma maior adesão ao plástico. Essa preferência por substratos hidrofóbicos sugere uma diferenciação da composição da parede celular entre linhagens da espécie, visto que a deste estudo foi demonstrada como hidrofílica.

A afinidade por estruturas como ralos de pias e tubulações sugere que *P. aeruginosa* desenvolveu características adaptativas para crescer no ambiente estressante dos efluentes gerados no laboratório. Essa plasticidade adaptativa confirma que cada isolado tende a se adaptar ao ambiente para garantir sua manutenção e disseminação, influenciado pelas características físico-químicas do ambiente, biomateriais presentes e toxinas liberadas por outros microrganismos (Beiriz *et al.*, 2022; Koseki *et al.*, 2014; Speranza *et al.*, 2004).

Em ambientes aquáticos, os biofilmes são frequentemente identificados em diversas superfícies, desencadeando o fenômeno das bioincrustação em águas salgadas. Esse processo está diretamente relacionado à biodeterioração de materiais, manifestando-se em biocorrosão, redução da eficiência de transferência de calor e obstrução mecânica em sistemas de transporte de fluidos (Carvalho *et al.*, 2021). No âmbito marítimo, a bioincrustação está associada a um aumento no consumo de combustível por grandes embarcações, devido ao arrasto viscoso causado por organismos incrustantes nos cascos dos navios. Estimativas apontam que governos e indústria gastam anualmente milhões de dólares em reparos e manutenção preventiva devido à bioincrustação (Schultz *et al.*, 2011), destacando os consideráveis desafios econômicos impostos pelos biofilmes. No entanto, apesar de o sistema utilizado neste estudo ser de água doce, não foram encontrados estudos na literatura consultada, realizados nesse cenário, sobre formação de bioincrustações, assim como de riscos à saúde e custos à navegação.

Ademais, os biofilmes protegem toda comunidade microbiana, facilitando a propagação de *P. aeruginosa* no meio e potencializando a resistência, como discutido por Kahraman e Karaderi (2020). A piocianina, um pigmento azul esverdeado distintivo e biomarcador para *P. aeruginosa*, que é secretado pelo sistema de secreção tipo II (T2SS), desempenhando um papel importante na persistência bacteriana (Naskar *et al.*, 2021; Hall *et al.*, 2016). Além de ser um marcador identificador, a piocianina contribui para a produção de compostos reativos de oxigênio (ROS) e do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em nível intracelular (Jurado-Martín; Sainz-Mejías; McClean, 2021), isto promove vantagem quando *P. aeruginosa* compete por espaço, bem como é crucial para os processos essenciais de manutenção da bactéria em diversos ambientes.

7 CONCLUSÃO

Nas condições aplicadas neste estudo, os resultados fornecem uma visão abrangente da presença e comportamento de *Pseudomonas aeruginosa* em ambientes laboratoriais de ensino de saúde. Espécimes de *P. aeruginosa* foram isoladas dos ralos e tubulações, confirmando a presença dessa bactéria em diversos ambientes e evidenciando sua notável capacidade adaptativa, dado o alto nível de pressão seletiva do ambiente devido à descarga de compostos químicos e agentes antissépticos. Além disso, quatro isolados foram capazes de produzir pigmentos, dois produzindo piocianina e dois pioverdina.

No que diz respeito à resistência a antibióticos, dos quatro espécimes testados, observou-se resistência a pelo menos um dos antibióticos normalmente empregados em esquemas empíricos antipseudomonas, embora todos tenham sido sensíveis à cefoxitina. O isolado 3A demonstrou ser o mais resistente, apresentando resistência intermediária à ciprofloxacina e resistência total à ceftazidima, cefoxitina e cefepime, sendo este último uma cefalosporina de quarta geração.

A análise da resposta de *P. aeruginosa* ao lixiviado revelou não apenas sua adaptação ao ambiente estressante dos efluentes laboratoriais de ensino de saúde, mas também implicou na ecologia bacteriana e na toxicidade para organismos aquáticos. Neste estudo, 100% das larvas de *Artemia Salina* morreram em contato com o lixiviado, indicando o alto grau de toxicidade. Além disso, a presença do lixiviado alterou os três tipos de motilidade bacteriana (*swarming*, *swimming* e *twitching*), estimulando o aumento da motilidade do tipo *swimming* e atuando como inibidor nas motilidades do tipo *swarming* e *twitching*. *P. aeruginosa* isoladas no laboratório de ensino apresentaram maior grau de adesão a superfícies hidrofílicas, como a dolamita, ferro e vidro.

Os resultados deste estudo contribuem para um entendimento mais profundo da interação da *P. aeruginosa* com seu ambiente, ressaltando a importância da abordagem de Saúde Única para lidar com desafios de saúde pública e ambiental de forma integrada e sustentável. É importante que as normas para uso de equipamentos de proteção individual sejam sempre seguidas e que o manejo em todo o laboratório obedeça às diretrizes de biossegurança, dado o potencial de disseminação da *P. aeruginosa* e contaminação de outros ambientes acadêmicos.

REFERÊNCIAS

- ABBOOD, H.M.; HIJAZI, K.; GOULD, I.M. Chlorhexidine resistance or cross-resistance, that is the question. *Antibiotics*, v. 12, n. 798, 2023.
- ABDELAZIZ, A. A.; KAMER, A. M. A.; AL-MONOFY, K. B.; AL-MADBOLY, L. A. *Pseudomonas aeruginosa*'s greenish-blue pigment pyocyanin: its production and biological activities. *Microbial Cell Factories*, v. 22, n. 110, 2023.
- ABDELAZIZ, A. A.; KAMER, A. M. A.; AL-MONOFY, K. B.; MADBOLY, L. L. A purified and lyophilized *Pseudomonas aeruginosa* derived pyocyanin induces promising apoptotic and necrotic activities against MCF-7 human breast adenocarcinoma. *Microbial Cell Factories*, v. 21, n. 262, 2022.
- ABDOUCHAKOUR, F.; AUJOULAT, F.; LICZNAR-FAJARDO, P.; MARCHANDIN, H.; TOUBIANA, M.; PARER, S.; LOTTHÉ, A.; JUMAS-BILAK, E. Intracolon variations of resistance and phenotype in *Pseudomonas aeruginosa* e pidemic high-risk clone ST308: A key to success within a hospital? *International Journal of Medical Microbiology*, v. 308, n. 2, p. 279-289, 2018.
- ABOU. P.; EL FEGHALI, R.; NAWAS, T. Extraction and purification of pyocyanin: a simpler and more reliable method. *MOJ Toxicol.* v. 4, n. 6, p. 412-422, 2018.
- AKINDUTI, P. A., GEORGE, O. W., OHORE, H. U., ARIYO, O. E., POPOOLA, S. T., ADELEYE, A. I., AKINWANDE, K. S., POPOOLA, J. O., ROTIMI, S. O., OLUFEMI, F. O., OMONHINMIN, C. A., & OLASEHINDE, G. I. Evaluation of Efflux-Mediated Resistance and Biofilm formation in Virulent *Pseudomonas aeruginosa* Associated with Healthcare Infections. *Antibiotics*, v. 12, n. 3, p. 626, 2023.
- ALATRAKTCHI, F.A.; SVENDSEN, W.E.; MOLIN, S. Electrochemical detection of pyocyanin as a biomarker for *Pseudomonas aeruginosa*: A Focused Review. *Sensors*, v. 20, n. 18, p. 5218, 2020.
- ALHADRAWI, A. A.; ALHADRAWI, H. A. N. Antibiotic susceptibility comparison of environmental and clinical *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* isolates. 1st International Conference on Achieving The Sustainable Development Goals, v. 2776, n. 1, 2023.
- ALKHUDHAIRY, M.K.; AL-SHAMMARI, M.M.M. Prevalence of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from diabetic foot infections in Iraq. *New Microbes and New Infections*, v. 35, 2020.
- ALMEIDA, W. N. M.; CAVALCANTI, R. V. D.; WATTS, M. L.; JÚNIOR, C. BA. N.; DA ROCHA, R. E. T. Impactos da utilização de antimicrobianos na resistência antimicrobiana: uma revisão de literatura com abordagem da saúde única. *Revista Universitária Brasileira*, v. 1, n. 2, p. 123-133, 2023.
- ANDERSON, S.; RAJARAO, G. K.; LAND, C. J.; DALHAMMAR, G. Biofilm formation and interactions of bacterial strains found in wastewater treatment systems, *FEMS Microbiology Letters*, v. 283, n. 1, p. 83–90, 2008.

ANDRADE, L.; CHIQUE, C.; HYND, P.; WEATHERILL, J.; O'DWYER, J. The antimicrobial resistance profiles of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from private groundwater wells in the Republic of Ireland, *Environmental Pollution*, v. 317, 2023.

ANTIBIOTIC RESISTANCE THREATS IN THE UNITED STATES, 2019. Corporate Authors(s): Centers for Disease Control and Prevention (U.S.); National Center for Emerging Zoonotic and Infectious Diseases (U.S.). Division of Healthcare Quality Promotion. Antibiotic Resistance Coordination and Strategy United States.; 2019.

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, C. J. M.; SIQUEIRA, V. F. de A.; SOUZA, F. J. M. de.; SILVA, J. L. das N.; SANTOS, K. F. dos.; CIPRIANO, D. Z.; DIAS, L. A. de S.; FARO, F. R. A. Revisão bibliográfica de antibióticos beta-lactâmicos. *Revista Saúde em Foco*, ed. 11, p. 982-995, 2019.

AZEVEDO, N.F.; CERCA, N.M. Biofilmes - Na saúde, no ambiente, na indústria. 1ª ed. Porto: Poblindústria, 2012.

ATHANASSIADIS, B.; ABBOTT, P. V.; WALSH, L. J. The use of calcium hydroxide, antibiotics and biocides as antimicrobial medicaments in endodontics. *Australian Dental Journal*, v. 52, p. S64-S82, 2008.

BAIL, L.; ITO, C. A. S.; AREND, L. N. V. S.; NOGUEIRA, K. D. S.; TUON, F. F. Activity of imipenem-relebactam and ceftolozane-tazobactam against carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and KPC-producing Enterobacterales. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, v. 102, 2021.

BALASUBRAMANIAN, D.; SCHNEPER, L.; MERIGHI, M.; SMITH, R.; NARASIMHAN, G.; LORY, S.; MATHEE, K. The regulatory repertoire of *Pseudomonas aeruginosa* AmpC β -lactamase regulator AmpR includes virulence genes. *PLoS ONE*. v. 7, n. 3, 2012.

BAROSA, J.; FERREIRA, A.; FONSECA, B.; SOUZA, I. Teste de toxicidade de cobre para *Artemia salina* - *Poluição e ecotoxicologia marinha*, 2003.

BEHZADI, P.; BARÁTH, Z.; GAJDÁCS, M. It's not easy being green: A narrative review on the microbiology, virulence and therapeutic prospects of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics*, v. 10, n. 42, 2021.

BEHZADI, P.; GAJDÁCS, M.; PALLÓS, P.; ÓNODI, B.; STÁJER, A.; MATUSOVITS, D.; KÁRPÁTI, K.; BURIÁN, K.; BATTÁH, B.; FERRARI, M.; DORIA, C.; CAGGIARI, G.; KHUSRO, A.; ZANETTI, S.; DANADU, M. G. Relationship between biofilm-formation, phenotypic virulence factors and antibiotic resistance in environmental *Pseudomonas aeruginosa*. *Pathogens*, v.11, n. 9, 2022.

BEIRIZ, Y. de R.; PIFFER, A. G.; MORAES, R.; SANTOS R. P.; BASSETTI, B. R.; ZANON, I. DE B.; CARDOSO, I. M.; CHARBEL JACOB JUNIOR, C, J.; IGOR PECINALLI, I. Evaluation of the formation of bacterial biofilm in different orthopedic metallic alloys, *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 2022.

BISHT, K.; LUECHE, A. R.; WAKEMAN, C. A. Temperature-specific adaptations and genetic requirements in a biofilm formed by *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers Microbiology*, v. 13, 2023.

BONILLA-ALDONA, K.; DHAMA, k.; RODRIGUEZ MORALES, A. J. Revisiting the one health approach in the context of COVID-19: a look into the ecology of this emerging disease. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, v.8, n. 3, p. 234-237, 2020.

BUTIUC-KEUL, A.; CARPA, R.; PODAR, D.; SZEKERES, E.; MUNTEAN, V.; IORDACHE, D.; FARKAS, A. Antibiotic resistance in *Pseudomonas* spp. through the urban water cycle. *Current Microbiology*, v. 78, p. 1227–1237, 2021.

CARVALHO, J. J. V. de; BOAVENTURA, F. G.; SILVA, A. de C. R. da; XIMENES, R. L.; RODRIGUES, L. K. C.; NUNES, D. A. de A.; SOUZA, V. K. G. Multiresistant bacteria and their impacts on public health: A social responsibility. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 6, 2021.

Centers for Disease Control and Prevention (U.S.) (2019). Antibiotic resistance threats in the United States, 2019.

CHADHA, J.; HARJAI, K.; CHHIBBER, S. Revisiting the virulence hallmarks of *Pseudomonas aeruginosa*: a chronicle through the perspective of quorum sensing. *Environmental Microbiology*, v. 24, n. 6, p. 2630-2656, 2021.

CHANDKI, R.; BANTHIA, P.; BANTHIA, R. Biofilms: A microbial home. *Journal of Indian Society of Periodontology*, v. 15, n. 2, p. 111–114, 2011.

CHEN, H.; JI, P-C.; QI, Y-H.; CHEN, S-J.; WANG, C-Y.; YANG, Y-J.; ZHAO, X-Y.; ZHOU, J-W. Inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by thymoquinone in combination with nisin. *Frontiers in Microbiology*, v. 13, 2023.

CLAVIJO-BURITICÁ, D.C.; ARÉVALO-FERRO, C.; GONZÁLEZ BARRIOS, A.F. A Holistic approach from systems biology reveals the direct influence of the *quorum sensing* phenomenon on *Pseudomonas aeruginosa* metabolism to pyoverdine biosynthesis. *Metabolites*, v. 13, n. 5, 2023.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI), Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. *CLSI supplement M100*, 30th ed. 2020.

CARVALHO, C. C. R. Biofilms: A successful microbial strategy with economic implications. *Frontiers in Marine Science*. v. 5, 2018.

DA SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C.; TANIW, N. F. A. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água. São Paulo: Editora Blucher, 2017. 9788521212263.

Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788521212263/>. Acesso em: 23 jan. 2022.

DEBRITTO, S.; GAJBAR, T. D.; SATAPUTE, P.; SUNDARAM, L.; LAKSHMIKANTHA, R. Y.; JOGAIAH, S.; ITO, S-I. Isolation and characterization of nutrient dependent pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa* and its dye and agrochemical properties. *Scientific reports*, v. 10, n. 1542, p. 1-12, 2020.

DESTOUMIEUX-GARZÓN, D.; MAVINGUI, P.; BOESTSCH, G.; BOISSIER, J.; DARRIET, F.; DUBOZ, P.; FRITSCH, C.; GIRAUDOUX, P.; LE ROUZ, F.; MORAND, S.; PAILLARD, C.; POTIER, D.; SUEUR, C.; VOITURON. The One Health Concept: 10 years old and a long road ahead. *Frontiers in Veterinary Science*, v.5, 2018.

DONLAN R. M. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infect Diseases*, v.8, p. 881-890, 2002.

EDWARD, E.A.; EL SHEHAWY M. R.; ABOUELFETOUEH A.; ABOULMAGD E. Prevalence of different virulence factors and their association with antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Egypt. *BMC Microbiology*. v. 23, n. 1, 2023.

ELBARGISY, R. M. Optimization of nutritional and environmental conditions for pyocyanin production by urine isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Saudi journal of biological sciences*, v. 28, n. 1, p. 993–1000, 2021.

EMERENINI, B. O.; HENSE, B. A.; KUTTLER, C.; EBERL, H. J. A mathematical model of *quorum sensing* induced biofilm detachment. *PLoS ONE*, v. 10, n. 7, 2015.

FIGUEIREDO, A. R. T; WAGNER, A.; KUMMERLI, R. Ecology drives the evolution of diverse social strategies in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Ecology*, v. 30, n. 20, p. 5215-5228, 2021.

FRIGOLI, M.; LOWDON, J. W.; CALDARA, M.; ARREGUIN-CAMPO, R.; SEWALL, J. CLEIJ, T. J.; DILLIEN, H.; EERSELS, K.; GRINSVEN, B. V. Thermal pyocyanin sensor based on molecularly imprinted polymers for the indirect detection of *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Sensors*, v. 8, p. 353-362, 2023.

FRIMMERSDORF, E.; HORATZEK, S.; PELNIKEVICH, A.; WIEHLMANN, L.; SCHOMBURG, D. How *Pseudomonas aeruginosa* adapts to various environments: a metabolomic approach. *Environmental Microbiology*, v. 12, n. 6, p. 1734-1747, 2010.

FUENTEFRIA, D. B.; FERREIRA, A. E.; GRAF, T.; CORÇÃO, G. *Pseudomonas aeruginosa*: disseminação de resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e água superficial. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 41, n. 5, p. 470-473, 2008.

FUSCH, C.; POGORZELSKI, D.; MAIN, C.; MEYER, C-L.; EL HELOU, S.; MERTZ, D. Self-disinfecting sink drains reduce the *Pseudomonas aeruginosa* bioburden in a neonatal intensive care unit. *Acta Paediatrica*, v. 104, n. 8, p. e344-e349, 2015.

GALUTTI, P. G. F.; TAMOTO, H. T.; SILIANO, P. R. Adesão bacteriana em polímeros plásticos. *UNISANTA Bioscience*, v. 12, n. 2, p. 92 – 96, 2023.

GATELLI, G.; BORTOLINI, M. C. T.; O Uso da clorexidina como solução irrigadora em endodontia. *Revista UNINGÁ*, v. 20, n. 1, p. 119-122, 2014.

GELLATLY, S. L.; HANCOCK, R. E. W., *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens and Disease*, v. 67, n. 3, p. 159–173, 2013.

GEYTER, D. de.; VANSTOKSTRAETEN, R.; CROMBÉ, F.; TOMMASSEN, J.; WYBO, I.; PIÉRARD, D. Sink drains as reservoirs of VIM-2 metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in a Belgian intensive care unit: relation to patients investigated by whole-genome sequencing. *Journal of Hospital Infection*, v. 115, p. 75-82, 2021.

GHANBARI, A.; DEGHANY, J.; SCHWEBS, T.; MÜSKEN, M.; HÄUSSLER, S.; HERMANN, M. M. Inoculation density and nutrient level determine the formation of mushroom-shaped structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Scientific reports*. v. 6, 2016.

GHEORGHITA, A. A.; WOZNIAC, D. J.; PARSEK, M. R.; HOWELL, L. P. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm exopolysaccharides: assembly, function, and degradation. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 47, n. 6, 2023.

GHOLAMI, S.; TABATABAEI, M.; SOHRABI, N. Comparison of biofilm formation and antibiotic resistance pattern of *Pseudomonas aeruginosa* in humans and environment isolates. *Microbial Pathogenesis*. v. 109, p. 94-98, 2017.

GHORBAL, S. K. B.; CHOURABI, K.; MAALEJ, L.; AMMAR, A. B.; OUZARI, H-I.; HASSEN, A.; JAAFOURA, H.; CHATTI, A. *Pseudomonas aeruginosa* Swarmer Cells Adaptation Toward UVc Radiations. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, n. 556, 2019.

GHSSEIN, G.; EZZEDDINE, Z. A review of *Pseudomonas aeruginosa* metallophores: Pyoverdine, Pyochelin and Pseudopaline. *Biology*, v. 11, n. 12: 1711, 2022.

GLEN, K. A.; LAMONT, I.L. β -lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Current status, future prospects. *Pathogens*, v. 10, n. 1638, 2021.

GLOAG, E. S.; GERMAN, G. K.; STOODLEY, P.; WOZNIAC, D. J. Viscoelastic properties of *Pseudomonas aeruginosa* variant biofilms. *Scientific Reports*, v. 8, n. 9691, 2018.

GONÇALVES, T., VASCONCELOS, U. Colour me blue: the history and the biotechnological potential of pyocyanin. *Molecules*, v. 26, n. 4: 927, 2021.

GONÇALVES, P. M. R.; FRANCO, M. F.; OLIVEIRA, V. M. Pesquisa de *Pseudomonas aeruginosa* e enumeração de coliformes fecais em carne de rã (*Rana catesbeiana*) no 1º, 7º e 15º dias de estocagem a 0°C $\pm$ 1°C. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v. 5, n. 3, p. 127-130, 1998.

GOUVEIA, C. Q.; OLIVEIRA, B. T. de M.; VASCONCELOS, U. Redução relativa da motilidade twitching de *Pseudomonas aeruginosa* TGC-04 exposta à cafeína. *Peer Review*, v. 5, n. 14, p. 239–251, 2023.

HALL, S.; MCDERMOTT, C.; ANOOPKUMAR-DUKIE, S.; MCFARLAND, A. J.; FORBES, A.; PERKINS, A. V.; DAVEY, A. K.; CHESS-WILLIAMS, R.; KIEFEL, M. J.; ARORA, D.; GRANT, G. D. Cellular effects of pyocyanin, a secreted virulence factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxins*, v. 8, n. 8, p. 236, 2016.

HALLETT, P.D. A brief overview of the causes, impacts and amelioration of soil water repellency - a review. *Soil & Water Research*, v. 3, n. 1, p. 21-29, 2008.

HAMAD, M. N. F.; MARREZ, D. A.; EL-SHERBIENY, S. M. R. Toxicity evaluation and antimicrobial activity of purified pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, v. 10 n. 6 p. 6974-6990, 2020.

HANEY, E. F; TRIMBLE, M. J; CHENG, J. T; VALLE, Q.; HANCOCK, R. E. W. Critical assessment of methods to quantify biofilm growth and evaluate antibiofilm activity of host defence peptides. *Biomolecules*, v. 8, n. 2, 2018.

HENSE, B. A.; SCHUSTER, M. Core principles of bacterial autoinducer systems. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, v. 79, n. 1, p. 153–169. 2015.

HOBAN, S.; ARCHER, F. I.; BERTOLA, L. D.; BRAGG, J. G.; BREED, M. F.; BRUFORD, M. W.; COLEMAN, M. A.; EKBLOM, R.; FUNK, W. C.; GRUEBER, C. E.; HAND, B. K.; JAFFÉ, R.; JENSEN, E.; JOHNSON, J. S.; KERSHAW, F.; LIGGNS, L.; MACDONALDO, A. J.; MERGEAY, J.; MILLHER, J. M.; MULHER-KARGER, F.; O'BRIEN, D.; PAZ-VINAS, I.; POTTER, K. M.; RAZGOUR, O.; VERNESI, C.; HUNTER, M. E. Global genetic diversity status and trends: towards a suite of Essential Biodiversity Variables (EBVs) for genetic composition. *Biological Reviews*, v. 97, n. 4, p. 1511-1538, 2022.

ISEPPI, R.; SABIA, C.; BONDI, M.; MARIANI, M.; MESSI, P. Virulence factors, drug resistance and biofilm formation in *Pseudomonas* species isolated from healthcare water systems. *Current Microbiology*, v. 77, p. 1737–1745, 2020.

ITO, C. A. S.; BAIL, L.; AREND, L. N. V. S.; SILVA, K. O.; MICHELOTTO, S. S.; NOGUEIRA, K. DS.; TUON, F. F. Evaluation of MicroScan WalkAway for determination of ceftazidime-avibactam and ceftolozane-tazobactam susceptibility in carbapenem-resistant gram-negative bacilli. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 59, n. 12, 2021.

JABŁOŃSKA, J.; AUGUSTYNIAK, A.; DUBROWSKA, K.; RAKOCZY, R. The two faces of pyocyanin - why and how to steer its production? *World journal of microbiology & biotechnology*, v. 39, n. 103, 2023.

JAYASEELAN, S.; RAMASWAMY, D.; DHARMARAJ, S. Pyocyanin: production, applications, challenges and new insights. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 30, p. 1159–1168, 2014.

JENAL, U.; REINDERS, A.; LORI, C. Cyclic di-GMP: second messenger extraordinaire. *Nature Reviews Microbiology*, v. 15, p. 271–284, 2017.

JENNY, M. Properties and prevention: a review of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biology and Medical Research*, v. 2, n. 18, 2018.

JOHNSON, M. C.; LADERMAN, E.; HUITING, E.; ZHANG, C.; DAVIDSON, A.; BONDY-DENOMY, J. Core defense hotspots within *Pseudomonas aeruginosa* are a consistent and rich source of anti-phage defense systems. *Nucleic acids research*, v. 51, n. 10, p. 4995–5005, 2023.

JURADO-MARTÍN, I.; SAINZ-MEJÍAS, M.; MCCLEAN, S. *Pseudomonas aeruginosa*: An audacious pathogen with an adaptable arsenal of virulence factors. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 3128, 2021.

KAHRAMAN, H.; KARADERI, C. C. Pyocyanine production, twitching motility and hydrophobicity of different wastes on *Pseudomonas aeruginosa*. *Polish Journal of Environmental Studies*, v. 30, n. 2, p. 1641-1645, 2020.

KARUNGAMYE, P.; RUGAIKA, A.; MTEI, K.; MACHUNDA, R. Antibiotic resistance patterns of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospital wastewater. *Applied Microbiology*, v. 3, n. 3, p. 867-882, 2023.

KHAN, F.; PHAM, D. T. N.; OLOKETUYI, S. F.; KIM, Y. M. Regulation and controlling the motility properties of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 104, n. 1, p. 33–49, 2020.

KHAYAT, M. T.; IBRAHIM, T. S.; KHAYYAT, A. N.; ALHARBI, M.; SHALDAM, M. A.; MOHAMMED, K.A.; KHAFAGY, E-S.; EL-DAMASY, D.A.; HEGAZY, W. A. H.; ABBAS, H. Á. Sodium citrate alleviates virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microorganisms*, v. 10, 2022.

KIM, B.; PARK J-S.; CHOI, H-Y.; YOON, S. S.; KIM, W-G. Terrein is an inhibitor of quorum sensing and c-di-GMP in *Pseudomonas aeruginosa*: a connection between quorum sensing and c-di-GMP. *Scientific Reports*, v. 8, n. 8617, 2018.

KIM, S.; LI, X-H.; HWANG, H-J.; LEE, J-H. Thermoregulation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Applied Environmental Microbiology*, v. 86, n. 22, 2020.

KOLPEN, M.; KRAGH, K. N.; ENCISO, J. B.; FAURHOLT-JEPSEN, D.; LINDEGAARD, B.; EGELUND, G. B.; JENSEN, A. V.; RAVN, P.; MATHIESEN, I. H. M.; GHEORGE, A. G.; HERTZ, F. B.; QVIST, T.; WHITELEY, M.; JENSEN, P. O.; BJARNSHOLT, T. Bacterial biofilms predominate in both acute and chronic human lung infections. *Journal Thorax*, v. 77, p.1015-1022, 2022.

KOSEKI, H.; YONEKURA, A.; SHIDA, T.; YODA, I.; HORIUCHI, H.; MORINAGA, Y.; YANAGIHARA, K.; SAKODA, H.; OSAKI, M.; TOMITA, M. Early Staphylococcal Biofilm formation on solid orthopaedic implant materials: *In vitro* study. *PLoS ONE*, v. 9, n. 10, 2014.

KLUK, E.; REINHOLD, F. C. B. C.; PEREIRA, N.; MELLO, A. M. D. de; MELLO, F. A. S. de.; Uma abordagem sobre a clorexidina: ação antimicrobiana e modos de aplicação. *Revista Gestão & Saúde*, v. 14, n. 1, p. 07-13, 2016.

KUHN, M. J.; TALÀ, L.; INCLAN, Y. F.; PATINO, R.; PIERRAT, X.; VOS, I.; AL-MAYYAH, Z.; MACMILLAN, H.; JR, J. N.; ENGEL, J. N.; PERSAT, A. Mechanotaxis directs *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility. *Biological Sciences*, v. 118, n. 30, 2021.

LABAUVE, A. E.; WARGO, M. J. Growth and laboratory maintenance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Current protocols in microbiology*, cap. 6, 2015.

LABORDA, P.; SANZ-GARCÍA, F.; HERMANDO-AMADO, S.; MARTÍNEZ, J. L. *Pseudomonas aeruginosa*: an antibiotic resilient pathogen with environmental origin. *Current Opinion in Microbiology*, v. 64, p. 125-132, 2021.

LICHTENBERG, M.; JAKOBSEN, T. H.; KÜHL, M.; KOLPEN, M.; JENSEN, P. Ø.; BJARNSHOLT, T. The structure-function relationship of *Pseudomonas aeruginosa* in infections and its influence on the microenvironment. *FEMS Microbiology reviews*, v. 46, n. 5, 2022.

LIM, Z. S.; WONG, C-Y.; AHMAD, S. A.; PUASA, N. A.; PHANG, L. Y.; SHAHARUDDIN, N. A.; MERICAN, F.; CONVEY, P.; ZULKHARNAIN, A.; SHAARI, H.; AZMI, A. A.; KOK, Y-Y.; GOMES-FUENTES, C. Harnessing diesel-degrading potential of an Antarctic microalga from Greenwich island and its physiological adaptation. *Biology*, v. 12, n. 8, 2023.

MA, L. Z.; WANG, DI.; LIU, Y.; ZHANG, Z.; WOZNIAK, D. J. Regulation of biofilm exopolysaccharide biosynthesis and degradation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Annual Review of Microbiology*, v. 76, p. 413-433, 2022.

MAIER, B. How physical interactions shape bacterial biofilms. *Annual Review of Biophysics*, v. 50, p. 401-417, 2021.

MAKHARITA, R. R.; EL-KHOLY, I.; HETTA, H. F.; ABDELAZIZ, M. H.; HAGAGY, F. I.; AHMED, A. A.; ALGAMMAL, A. M. Antibigram and genetic characterization of carbapenem-resistant gram-negative pathogens incriminated in healthcare-associated infections, *Infection and Drug Resistance*, v. 13, p. 3991-4002, 2020.

MAPIPA, Q.; DIGBAN, T. O.; NNOLIM, N. E.; NWODO, U. U. Antibigram profile and virulence signatures of *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from selected agrestic hospital effluents. *Scientific Reports*, v. 11, n. 11800, 2021.

MARTINS, A. C.; DA COSTA, J.; HERBERT, A.; FARIAS, F. R.; REZENDE, M. D.; GEUS, J. L. Avaliação da toxicidade das tinturas de aroeira e de romã através do bioensaio com *Artemia salina*. *Research, Society and Development*. v. 10, n. 3, 2021.

MATTINGLY, A. E.; WEAVER, A. A.; DIMKOVIKJ, A.; SHROUT, J. D. Assessing travel conditions: environmental and host influences on bacterial surface motility. *Journal of bacteriology*, v. 200, n. 11, 2018.

MATZ, C.; BERGFELD, T.; A. RICE, S. A.; KJELLEBERG, S. Microcolonies, *Quorum sensing* and cytotoxicity determine the survival of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to protozoan grazing. *Environmental Microbiology*, v. 6, n. 3, p. 218-226, 2004.

MCDONNELL, G.; DENVER, A.R. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 12, p.147–179, 1999.

MESQUITA, C. S.; SOARES-CASTRO, P.; M. SANTOS, P. M. *Pseudomonas aeruginosa*: phenotypic flexibility and antimicrobial resistance. *Science, Technology and Education*, p. 650,665, 2013.

METCALF, R.; WHITE, H. L.; ORMSBY, M. J.; OLIVER, D. M.; QUILLIAM, R. S. From wastewater discharge to the beach: Survival of human pathogens bound to microplastics during transfer through the freshwater-marine continuum. *Environmental Pollution*, v. 319, 2023.

MEYER, J. M.; STINTZI, A.; DE VOS, D.; CORNELIS, P.; TAPPE, R.; TARAZ, K.; BUDZIKIEWICZ, H. Use of siderophores to type pseudomonads: the three *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine systems. *Microbiology*, v. 143, p. 35–43, 1997.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta medica*, v. 45, n. 5, p. 31–34, 1982.

MICHAEL, A. S.; THOMPSON, C. G.; ABRAMOVITZ, M. *Artemia salina* as a test organism for bioassay. *Science*, v. 123, n. 3194, p. 464, 1956.

MIRANI, Z. A.; FATIMA, A.; UROOJ, S.; AZIZ, M.; KHAN, M. N.; ABBAS, T. Relationship of cell surface hydrophobicity with biofilm formation and growth rate: A study on *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli*. *Iranian Journal Basic Medical Sciences*. v. 21, n. 7, p. 760, 2018.

MIRZAEI, B.; BAZGIR, Z. N.; GOLI, H. R.; IRANPOUR, F.; MOHAMMADI, F.; BABEL, R. Prevalence of multi-drug resistant (MDR) and extensively drug-resistant (XDR) phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated in clinical samples from Northeast of Iran. *BMC research notes*, v. 13, n. 380, 2020.

MORADALI, M. F.; GHODS, S.; REHM, B. H. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 7, n. 39, 2017.

MORADALI, M. F.; REHM, B. Bacterial biopolymers: from pathogenesis to advanced materials. *Nature Reviews Microbiology*, v.18, 195-210, 2020.

MORGAN, R.; KOHN, S.; HWANG, S. H.; HASSETT, D. J.; SAUER, K. BdlA, a chemotaxis regulator essential for biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, v.188, n. 21, p. 7335–7343, 2006.

- MOTLAGH, N. V.; KHANI, R.; RAHNAMA, S. Super dewetting surfaces: Focusing on their design and fabrication methods. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 484, p. 528-546, 2015.
- MUES, N.; CHU, H. W. Out-smarting the host: bacteria maneuvering the immune response to favor their survival. *Frontiers in Immunology*, v. 11, n. 819, 2020.
- MULCAHY, L. R.; ISABELLA, V. M.; LEWIS, K. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease. *Microbial Ecology*, v. 68, p. 1-12, 2014.
- MUTUKU, C.; GAZDAG, Z.; MELEGH, S. Occurrence of antibiotics and bacterial resistance genes in wastewater: Resistance mechanisms and antimicrobial resistance control approaches. *World Journal Microbiology & Biotechnology*, v. 38, n.152, 2022.
- NASKAR, S.; HOHL, M.; TASSINARI, M.; LOW, H. H. The structure and mechanism of the bacterial type II secretion system. *Molecular microbiology*, v. 115, n. 3, p. 412–424, 2021.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS; Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, approved standard M7-A6, 6th ed., NCCLS: Wayne, 2003.
- NEVES, M. L. da R.; NUNES, L. E.; ROCHA, W. R. V. da.; XIMENES, E. C. P de A.; ALBUQUERQUE, M. C. P de A. A influência do *Quorum sensing* na formação de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa*. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 2, 2021.
- NEVES, M. T.; LORENZO, M. E. P.; ALMEIDA, R. A. M. B.; FORTALEZA, C. M. C. B. Antimicrobial use and incidence of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a teaching hospital: an ecological approach. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 43, n. 6, p. 629-632, 2010.
- NOORANIDOOST, M.; COGAN, N. G.; STOODLEY, P.; GLOAG, E. S.; HUSSAINI, M. Y. Bayesian estimation of *Pseudomonas aeruginosa* viscoelastic properties based on creep responses of wild type, rugose, and mucoid variant biofilms. *Biofilm*, v. 5, 2023.
- OMS – Organização Mundial de Saúde. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. Disponível em < <https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>>. Acesso em 21 dez 2023.
- OTTON, L. M.; CAMPOS M. S.; MENEGHETTI, K. L.; CORÇÃO, G. Influence of twitching and swarming motilities on biofilm formation in *Pseudomonas strains*. *Archives of Microbiology*, v. 199, p. 677-682, 2017.
- PASTORA, A. B.; RZASA, K. M.; O'TOOLE, G. A. Multiple pathways impact swarming motility of *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *BioRxiv*, 2024.
- PEJČIĆ, M.; STOJANOVIĆ-RADIĆ, Z.; GENČIĆ, M.; DIMITRIJEVIĆ, M.; RADULOVIĆ, N. Anti-virulence potential of basil and sage essential oils: Inhibition of biofilm formation, motility and pyocyanin production of *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Food and Chemical Toxicology*, v. 141, 2020.

- PENA, R. T.; BLASCO, L.; AMBROA, A.; GONZÁLEZ-PEDRAJO, B.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, L.; LÓPEZ, M.; BLERIOT, I.; BOU, G.; GARCÍA-CONTRERAS, R.; WOOD, T. K.; TOMÁS, M. Relationship between quorum sensing and secretion systems. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, n. 1100, 2019.
- PERSYN, E.; SASSI, M.; AUBRY, M.; BROLY, M.; DELANOU, S.; ASEHNOUNE, K.; CAROFF, N.; CRÉMET, L. Rapid genetic and phenotypic changes in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains during ventilator-associated pneumonia. *Scientific Reports*, v. 9, n. 4720, 2019.
- PIRZADIAN, J.; VOOR IN 'T HOLT, A. F.; HOSSAIN, M.; KLAASSEN, C. H. W.; DE GOEIJ, I.; KOENE, H. H. H. T.; BODE, L. G. M.; VOS, M. C.; SEVERIN, J. A. Limiting spread of VIM-positive *Pseudomonas aeruginosa* from colonized sink drains in a tertiary care hospital: A before-and-after study. *PLoS ONE*, v. 18, n. 3, 2023.
- QUATRIN, P. M. Q.; COMIM, V. M.; LOPES, L. Q. S.; GÜNDEL, A.; RODRIGO DE ALMEIDA VAUCHER, R. A.; SANTOS, R. C. V. Avaliação de diferentes substratos para a formação de biofilmes *in vitro* de *Pseudomonas aeruginosa*. *Ciências da Saúde*, v. 16, n. 2, p. 191-203, 2015.
- RASAMIRAVAKA, T.; LABTANI, Q.; DUEZ, P.; EL JAZIRI, M. The Formation of Biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: A Review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. *BioMed Research International*, vol. 2015, 2015.
- RATHER, M. A.; GUPTA, K.; MANDAL, M. Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. *Brazilian journal of microbiology: publication of the Brazilian Society for Microbiology*, v. 52, n. 4, p. 1701–1718, 2021.
- REMOLD, S. K.; BROWN, C. K.; FARRIS, J. E.; HUNDLEY, T. C.; PERPICH, J.A.; PURDY, M. E. Differential habitat use and niche partitioning by *Pseudomonas species* in human homes. *Microbial Ecology*, n. 62, p. 505–517, 2011.
- REYES-LARA, S.; REYES-MAZZOCO, R. Efecto de las cargas hidráulica y orgánica sobre la remoción masica de un empaque estructurado en un filtro percolador. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, v. 8, n. 1, p. 101-109, 2009.
- REYGAERT, W. C. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*, v. 4, n. 3, p. 482–501, 2018.
- RIBEIRO, S. M.; FELÍCIO, M. R.; BOAS, E. V.; GONÇALVES, S.; COSTA, F. F.; SAMY, R. P.; SANTOS, N. C.; FRANCO, O. L. New frontiers for anti-biofilm drug development. *Pharmacology & therapeutics*, v. 160, p. 133–144, 2016.
- RIOJAS, H. M. P.; PÉREZ, C. S.; DE LA PENA, G. A.; VAQUERA, D. N. A.; CASTILO, J. I. B.; MASCARENÃS, A. H. de L. S.; DE LA O CAVAZOZ, M. E. Bacteriemia por *Pseudomonas aeruginosa* en niños: perfil de resistencia antimicrobiana. *Revista Latinoamericana de Infectología Pediátrica*, v. 34, p. 34-40, 2021.

- ROCHA, A. C. L.; KLIGERMAN, D. C.; OLIVEIRA, J. L. M. Overview of research on the treatment and reuse of effluents from the antibiotics industry. *Saúde em Debate*. v. 43, p. 165-180, 2019.
- ROCHA, A. J.; BARSOTTINI, M. R. de O.; ROCHA, R. R.; LAURINDO, M. V.; MORAES, F. L. L.; ROCHA, S. L. *Pseudomonas aeruginosa*: virulence factors and antibiotic resistance genes. *Review - Human & Animal Health*, v. 62, 2019.
- ROLLET, C.; GAL, L.; GUZZO, J. Biofilm-detached cells, a transition from a sessile to a planktonic phenotype: a comparative study of adhesion and physiological characteristics in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters*. v. 290, p. 135–142, 2009.
- ROSSI, C.; SERIO, A.; LÓPEZ, C.C.; ANNIBALLI, F.; AURICCHIO, B.; GOFFREDO, E.; GOGA, B.T.C.; LISTA, F.; FILLO, S.; PAPARELLA, A. Biofilm formation, pigment production and motility in *Pseudomonas* spp. isolated from the dairy industry. *Food Control*. v. 86, p. 241-248, 2018.
- ROULOVÁ, N.; MOT'KOVÁ, P.; BROŽKOVÁ, I.; PEJCHALOVÁ, M. Antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospital wastewater in the Czech Republic. *Journal of Water Health*. v. 20; n. 4, p. 692–701, 2022.
- RUMBAUGH, K. P.; SAUER, K. Biofilm dispersion. *Nature reviews Microbiology*, v. 18, n. 10, p. 571–586, 2020.
- SAMPEDRO, I.; PARALES, R. E.; KRELL, T.; HILL, J. E. *Pseudomonas* chemotaxis, *Fems Microbiology Reviews*, v. 39, n. 1, p. 17–46, 2014.
- SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, A.; LHAMAS, M. A; MARCOS-TORRES, F. J. Reguladores transcricionais que controlam a virulência em *Pseudomonas aeruginosa*. *Internacional Journal Molecular Ciência*, v. 24, ed. 15, 2023.
- SAUER, K.; STOODLEY, P.; GOERES, D. M.; HALL-STOODLEY, L.; BURMØLLE, M.; STEWART, P. S.; BJARNSHOLT, T. The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nature Reviews Microbiology*, v. 20, n. 10, p. 608-620, 2022.
- SCHALK, I. J.; PERRAUD, Q. *Pseudomonas aeruginosa* and its multiple strategies to access iron. *Environmental Microbiology*, v. 25, n. 4, p. 811-831, 2022.
- SCHULTZ, M. P.; BENDICK, J. A.; HOLM, E. R.; HERTEL, W. M. Economic impact of biofouling on a naval surface ship. *Biofouling*, v. 27, p. 87–98, 2011.
- SECCHI, E.; SAVORANA, G.; VITALE, A.; EBERL, L.; STOCKER, R.; RUSCONI, R. The structural role of bacterial eDNA in the formation of biofilm streamers. *Biophysics and Computational Biology*, v. 119, n. 12, 2022.
- SENIGALIA, R. L. C.; FERREIRA, A. L. DS.; KRATZ, D.; COELHO, M. F. B.; DOS SANTOS, A. S. R. M. Toxicity of vegetable extracts from plants in the cerrado for medicine use. *Brazilian Journal of Development*. v. 6, n. 8, p. 55308-55317, 2020.

- SHARMA, S.; MOHLER, J.; MAHAJAN, S. D.; SCHWARTZ, S. A.; BRUGGEMANN, L.; AALINKEEL, R. Microbial biofilm: a review on formation, infection, antibiotic resistance, control measures, and innovative treatment. *Microorganisms*, v. 11, n. 6, 2023.
- SILBY M. W.; WINSTANLEY, C.; GODFREY, S. A. C.; LEVY, S. B.; JACKSON, R. W. *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable, *FEMS Microbiology Reviews*, v. 35, n. 4, p. 652–680, 2011.
- SILVA, A. S. DA.; SILVA, A. L.; RIBEIRO, A. C.; ROCHA, C. M. DE S.; SILVA, N. B. S.; SILVA, G. L. V. DA.; MARQUES, L. DE A.; RODER, D. V. D. DE B. *Quorum Sensing e suas implicações na formação de biofilme bacteriano em hospitais. Saúde em Foco: Doenças emergentes e reemergentes*, v. 1, cap. 40, p. 473-484, 2020.
- SILVA, K. de C. F de A.; CALOMINO, M.A.; DEUTSCH, G.; PIRES, B. M. F. B.; ESPER, L. M. R.; PAULA, G. R. de; TEIXEIRA, L. A. Avaliação da eficácia de biocidas na remoção de biofilmes produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente. *Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento*, v. 9, n. 9, 2020.
- SOARES, E. L.; ALDRIGUE, R. H. S.; GASPAR, M. D. DR.; FRANCO, G. C. N.; POCHAPSKI, M. T.; CAMPAGNOLI, E. B.; DOS SANTOS, F. A. Efeito da clorexidina em microrganismos na saliva de doentes internados em unidade de terapia intensiva. *Revista de Enfermagem Referência*, v. 1, n. 6, e20162, 2021.
- SOARES, T. S. Meio Ambiente e Saúde Única: o que podemos esperar? *Revista Brasileira de Meio Ambiente*, v. 8, n. 4, p. 74-80, 2020.
- SOUZA, I. A.; GARCIA, D. O.; ANVERSA, L.; KOBAYASHI, R. K. T.; NAKAZATO, G.; SAEKI, E. K. análise comparativa dos fatores de virulência dos isolados clínicos e ambientais de *Pseudomonas aeruginosa*. *Colloquium Vitae*, v. 11, n. 3, p. 41-50, 2019.
- SPERANZA, G.; GOTTARDI, G.; PEDERZOLLI, C.; LUNELLI, L.; CANTERI, R.; PASQUARDINI, I.; CARLA, E.; LUI, A.; MANIGLIO, D.; BRUGNARA, M.; ANDERLE, M. Role of chemical interactions in bacterial adhesion to polymer surfaces. *Biomaterials*, v. 25, n. 11, p. 2029-2037, 2004.
- STEWART, P. S.; Diffusion in biofilms. *Journal of Bacteriology*, v. 185, n. 5, p. 1485-1491, 2003.
- TALÀ, L.; FINEBERG, A.; KUKURA, P.; PERSAT, A. *Pseudomonas aeruginosa* orchestrates twitching motility by sequential control of type IV pili movements. *Nature Microbiology*, v. 4, p. 774-780, 2019.
- THI, M. T. T.; WIBOWO, D.; REHM, B. H. A. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 8671, 2020.
- TOYOFUKU, M.; INABA, T.; KIYOKAWA, T.; OBANA, N.; YAWATA, Y.; NOMURA, N. Environmental factors that shape biofilm formation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 80, p. 7–12, 2016.

TRAUTMANN, M.; HALDER, S.; LEPPER, P. M.; EXNER, M. Reservoir von *Pseudomonas aeruginosa* auf der Intensivstation. *Bundesgesundheitsbl*, v. 52, p. 339–344, 2009.

TRENTIN, D. da S.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. *Revista Liberato*, v. 14, n. 22, p. 213–236, 2013.

TUON, F. F.; DANTAS, L. R.; SUSS, P. H.; TASCA RIBEIRO, V. S. Pathogenesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm: A Review. *Pathogens*, v. 11, n. 300, 2022.

TUON, F. F.; CIESLINSKI, J.; RODRIGUES, S. D. S.; SERRA, F. B.; PAULA, M.D. Evaluation of *in vitro* activity of ceftolozane-tazobactam against recent clinical bacterial isolates from Brazil - the EM200 study. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 24, p. 96–103, 2020.

TYFA, A.; KUNICKA-STYCYŃSKA, A.; ZABIELSKA, J. Evaluation of hydrophobicity and quantitative analysis of biofilm formation by *Alicyclobacillus* sp. *Acta biochimica Polonica*, v. 62, n. 4, p. 785–790, 2015.

VECCHIA, A. D.; THEWES, M. R.; HARB NAIME, R.; SPILKI, F. R. Diagnóstico sobre a situação do tratamento do esgoto hospitalar no Brasil. *Health and Environment Journal*, v. 10, n. 2, p. 65-70. 2009.

VERDIAL, C.; SERRANO, I.; TAVARES, L.; GIL, S.; OLIVEIRA, M. Mechanisms of antibiotic and biocide resistance that contribute to *Pseudomonas aeruginosa* persistence in the hospital environment. *Biomedicines*, v. 11, n. 4: 1221, 2023.

VETRIVEL, A.; RAMASAMY, M.; VETRIVEL, P.; NATCHIMUTHU, S.; ARUNACHALAM, S.; KIM, GS.; MUREGESAN, R. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and its control. *Biologics*. v. 1, p. 312-336, 2021.

VIANNA, L. F. N. Antropoceno e o COVID-19: Uma era de integração ou de controle da Natureza? *Revista Brasileira de Meio Ambiente*, v. 8, n. 1, p. 114-117, 2020.

WANG, X.; WANG, J.; LIU, S-Y.; GUO, J. S.; FANG, F., CHEN, Y. P.; YAN, P. Mechanisms of survival mediated by the stringent response in *Pseudomonas aeruginosa* under environmental stress in drinking water systems: Nitrogen deficiency and bacterial competition. *Journal of hazardous materials*, v. 448, n. 130941, 2023.

WEI, J.; HUANG, X.; WANG, H.; WANG, F.; LIU, X.; YAN, Y.; QU, Y. Insight into biofilm formation of wastewater treatment processes: Nitrogen removal performance and biological mechanisms. *Science of The Total Environment*, v. 903, 2023.

WOOD, S. J.; KUZEL, T. M.; SHAFIKHANI, S. H. *Pseudomonas aeruginosa*: infections, animal modeling, and therapeutics. *Cells*, v. 12, n. 199, 2023.

YE, Z.; YE, L.; LI, D.; LIN, S.; DENG, W.; ZHANG, L.; LIANG, J.; LI, J.; WEI, Q.; WANG, K. Effects of daphnetin on biofilm formation and motility of *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Cellular Infection Microbiology*, v. 12, 2022.

YUSRA, Y. A. Effect of some plant oils on swarming motility and Biofilm formation in *Proteus*, *Aeromonas*, and *Pseudomonas*. *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research*, v. 10, n. 4, p. 64-71, 2020.

ZANATTA, F. B.; ROSING, C. K. Clorexidina: mecanismo de ação e evidências atuais de sua eficácia no contexto do biofilme supragengival, v. 1, n. 2, p. 35-43, 2007.

ZHAO, X.; ZHAO, F.; WANG, J.; ZHONG, N.; Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens: food safety perspectives. *Royal Society of Chemistry*, v. 7, p. 36670-36683, 2017.

ZHAO, Y.; COCERVA, T.; COX, S.; TARDIF, S.; SU, J. Q.; ZHU, Y-G.; BRANDT, K. K., Evidence for co-selection of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in metal polluted urban soils. *Science of the Total Environment*, v. 656, p. 512-520, 2019.

ZHOU, ZY.; HU, B.; GAO, X.; BAO, R.; MIN CHEN, M.; HUAYIN LI, HY. Sources of sporadic *Pseudomonas aeruginosa* colonizations/infections in surgical ICUs: Association with contaminated sink trap. *Journal of Infection and Chemotherapy*, v. 22, n. 7, p. 450-455, 2016.

Effluents from a university clinical analysis teaching laboratory: an inductive study on adhesion and cellular response of *Pseudomonas aeruginosa*

Efluentes de um laboratório didático de análises clínicas: um estudo indutivo sobre a adesão e resposta celular de *Pseudomonas aeruginosa*

Efluentes de un laboratorio docente universitario de análisis clínicos: un estudio inductivo sobre adhesión y respuesta celular de *Pseudomonas aeruginosa*

DOI: 10.54033/cadpedv21n6-044

Originals received: 05/03/2024

Acceptance for publication: 05/24/2024

Débora Conceição da Silva Amaral

Postgraduate in Cellular and Molecular Biology

Institution: Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Address: João Pessoa, Paraíba, Brasil

E-mail: debora.amaral.bio@gmail.com

Hueliton Borchardt

Graduate Student in Biotechnology

Institution: Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Address: João Pessoa, Paraíba, Brasil

E-mail: hb@academico.ufpb.br

Victor Targino Gomes

Postgraduate in Cellular and Molecular Biology

Institution: Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Address: João Pessoa, Paraíba, Brasil

E-mail: victor.gomes@fpb.edu.br

Renan Leite

Graduate Student in Biotechnology

Institution: Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Address: João Pessoa, Paraíba, Brasil

E-mail: renanvfc@hotmail.com

Elisângela Afonso de Moura Kretzschmar

Doctor in Biological Sciences from Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)
Institution: Universidade Federal da Paraíba (UFPB)
Address: João Pessoa, Paraíba, Brasil
E-mail: elisdoc@cbiotec.ufpb.br

Rafael de Almeida Travassos

Doctor in Natural, Synthetic and Bioactive Products
Institution: Universidade Federal da Paraíba (UFPB)
Address: João Pessoa, Paraíba, Brasil
E-mail: rafaeltravassos@cbiotec.ufpb.br

Ian Porto Gurgel do Amaral

PhD in Biology from University of St Andrews
Institution: Universidade Federal da Paraíba (UFPB)
Address: João Pessoa, Paraíba, Brasil
E-mail: ianamaral@cbiotec.ufpb.br

Ulrich Vasconcelos

Doctor in Engineering Technology of Chemical and Biochemical Processes
from the Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)
Institution: Universidade Federal da Paraíba (UFPB)
Address: João Pessoa, Paraíba, Brasil
E-mail: u.vasconcelos@cbiotec.ufpb.br

ABSTRACT

Microbial resistance to antibiotics is a global threat and the World Health Organization (WHO) predicts that future pandemics will involve resistant microorganisms. Recently, the WHO published a list of pathogenic microbes whose priority level varies among medium, high and critical. All bacteria in the list can form biofilms. Biofilms are structures made of polymeric adhesive matrix composed by multispecies in close association. Additionally, biofilm provides an important physical barrier. Different phenotypes are found in biofilms, ensuring resistance to oxidative stress, as well as environmental stress factors. It results cell persistence because there is generation of a gradient of chemical inhibitors at subinhibitory levels, which promote the development of resistant subpopulations able to grow and disseminate. Clinical analysis laboratories are sources of selective pressures for potentially pathogenic bacteria because different substances are handled and discarded daily by the effluents generated. This study assessed the activity of a highly toxic leachate on isolates of *Pseudomonas aeruginosa* recovered from the sinks of a university clinical analysis teaching laboratory. *In vitro* biofilm formation tests, pyocyanin quantification, cell wall hydrophobicity test, motility test and susceptibility to seven antibiotics were carried out. The isolate with the most antibiotic resistance was assessed. There was a reduction in adhesion of 14 to 430%. Biofilm was formed, however, on all tested materials; the cells preferentially adhered to hydrophilic surfaces, dolomite, followed by galvanized iron and glass. Maximum pyocyanin

production was 12 mM. Swimming motility was stimulated, recording a 12-fold increase in speed, while swarming and twitching motility were inhibited by around 20 and 60%, respectively. All isolates were resistant to cephalosporins and one isolate was detected resistant also to ciprofloxacin. The results indicated that *P. aeruginosa* survived the leachate, triggering different adaptive physiological responses to persist in the stressful environment.

Keywords: Biofilms. Emerging Contaminants. Environmental Stress. Generation of Liquid Effluents. Urban Pollution.

RESUMO

A resistência microbiana a antibióticos é uma ameaça global e a Organização Mundial de Saúde (OMS) prevê que as futuras pandemias envolverão microrganismos resistentes. Recentemente a OMS divulgou uma lista de microrganismos patogênicos cujo grau de prioridade varia entre médio, alto e crítico. Todas as bactérias da lista são capazes de formar biofilmes. Os biofilmes são estruturas envolvidas por matriz adesiva polimérica, composta geralmente por multiespécies em estreita associação. Por si só, o biofilme confere uma barreira física importante. No seu interior ocorrem diferentes fenótipos, garantindo resistência ao estresse oxidativo, bem como de fatores estressantes do ambiente, resultando na persistência porque há geração de gradiente de inibidores químicos em níveis subinibitórios, os quais promovem o desenvolvimento de subpopulações resistentes que podem crescer e disseminar. Os laboratórios de análises clínicas são fontes de pressões seletivas para bactérias potencialmente patogênicas porque diferentes substâncias são manuseadas e descartadas diariamente pelos efluentes gerados. Este estudo avaliou a atividade de um lixiviado altamente tóxico em isolados de *Pseudomonas aeruginosa*, obtidos de pias de um laboratório universitário de ensino de análises clínicas. Foram realizados testes *in vitro* de formação de biofilme, quantificação de piocianina, teste de hidrofobicidade da parede celular, teste de motilidade e suscetibilidade a sete antibióticos. O isolado com maior resistência aos antibióticos foi avaliado. Houve redução na adesão de 14 a 430%. Entretanto, formou-se biofilme em todos os materiais testados; as células aderiram preferencialmente a superfícies hidrofílicas: dolomita, seguida de ferro galvanizado e vidro. A produção máxima de piocianina foi de 12 mM. A motilidade *swimming* foi estimulada, registrando um aumento de 12 vezes na velocidade, enquanto as motilidades *swarming* e *twitching* foram inibidas em cerca de 20 e 60%, respectivamente. Todos os isolados foram resistentes às cefalosporinas e um isolado foi resistente também à ciprofloxacina. Os resultados indicaram que *P. aeruginosa* cresceu no lixiviado, desencadeando diferentes respostas fisiológicas adaptativas para persistir no ambiente estressante.

Palavras-chave: Biofilmes. Contaminantes Emergentes. Estresse Ambiental. Geração de Efluentes Líquidos. Poluição Urbana.

RESUMEN

La resistencia microbiana a los antibióticos es una amenaza mundial y la Organización Mundial de la Salud (OMS) predice que futuras pandemias involucrarán microorganismos resistentes. Recientemente, la OMS publicó una

lista de microorganismos patógenos cuyo nivel de prioridad varía entre medio, alto y crítico. Además, todas bacterias listados son capaces de formar biofilms. Los biofilms son estructuras rodeadas por una matriz adhesiva polimérica, generalmente compuestas por múltiples especies en estrecha asociación. Por sí sola, lo biofilm proporciona una barrera física importante. En su interior se presentan diferentes fenotipos, asegurando resistencia al estrés oxidativo, así como a factores de estrés ambiental, lo que resulta en persistencia porque se genera un gradiente de inhibidores químicos a niveles subinhibitorios, que promueven el desarrollo de subpoblaciones resistentes que pueden crecer y diseminarse. Los laboratorios de análisis clínicos son fuentes de presiones selectivas para bacterias potencialmente patógenas debido a que diariamente se manipulan y desechan diferentes sustancias a través de los efluentes generados. Este estudio evaluó la actividad de un lixiviado altamente tóxico en aislados de *Pseudomonas aeruginosa* recuperados de los fregaderos de un laboratorio docente de análisis clínicos de una universidad. Se realizaron pruebas de formación de biofilm *in vitro*, cuantificación de piocianina, prueba de hidrofobicidad de la pared celular, prueba de motilidad y susceptibilidad a siete antibióticos. Se evaluó el aislado con mayor resistencia a los antibióticos. Hubo una reducción en la adherencia del 14 al 430%. Sin embargo, se formó biofilm en todos los materiales probados; las células se adhirieron preferentemente a superficies hidrofílicas, dolomita, seguida de hierro galvanizado y vidrio. La producción máxima de piocianina fue de 12 mM. Se estimuló la natación, registrando un aumento de 12 veces en la velocidad, mientras que la motilidad swarming y twitching se inhibió en alrededor de un 20 y un 60%, respectivamente. Todos los aislados fueron resistentes a las cefalosporinas y se detectó un aislado resistente también a la ciprofloxacina. Los resultados indicaron que *P. aeruginosa* sobrevivió al lixiviado, desencadenando diferentes respuestas fisiológicas adaptativas para persistir en el ambiente estresante.

Palabras clave: Biofilms. Contaminantes Emergentes. Estrés Ambiental. Generación de Efluentes Líquidos. Contaminación Urbana.

1 INTRODUCTION

Pseudomonas aeruginosa is the World Health Organization's leading non-fermenting Gram-negative global critical priority pathogen (Sadyrbaeva-Dolgova *et al.*, 2023). It is endowed with numerous virulence factors, such as pyocyanin synthesis (Mues; Chu, 2020), siderophores (Ghssein; Ezzeddine, 2022), proteases (Öldak; Trafny, 2005), motility (Pena *et al.*, 2019) and antibiotic resistance mechanisms (Behzadi *et al.*, 2022). Additionally, the great plasticity exhibited by *P. aeruginosa* enables growth in unfavorable environments

(Moradali *et al.*, 2017). Biofilm is one of main strategies for the persistence of *P. aeruginosa* despite variations in nutrient availability, as well as temperature and concentration of growth-inhibiting substances (Balmuri *et al.*, 2022).

Biofilms also ensure conditions for the exchange of genes among the cells that form macrocolonies, resulting in a great diversity of phenotypes (Destoumieux-Garzón *et al.*, 2018). This also provides advantage for microbes in competitive scenarios (Thi *et al.*, 2020), as well as privilege in growth under variations in nutrient availability, as may occur in hydraulic systems, a site subject to constant fluctuations in flow regimes (Nguyen *et al.*, 2021).

The presence of *P. aeruginosa* in wastewater represents a concern in terms of the One Health approach, because resistance genes may be spread among microorganisms associated with animals and the environment (Sousa *et al.*, 2021), and significant economic impacts generated due to the formation of biofilms (Highmore *et al.*, 2022). Studies have detected *P. aeruginosa* in hospital effluents (Magalhães *et al.* 2016, Oliveira *et al.*, 2021), sewage treatment plants (Luczkiewicz *et al.*, 2015; Marutescu *et al.*, 2023) and domestic effluents (Dallanora *et al.*, 2023; Idowu *et al.*, 2017).

Other cosmopolitan settings, such as university clinical analysis teaching laboratories, however, have been neglected. There is no single definition of what a teaching laboratory should be as each one may have a demand for specific services. In this paper, university clinical analysis teaching laboratories are places where numerous practical activities are carried out to train students. However, as in any ordinary laboratory, the activities carried out are prone to analytical and organizational errors, resulting from training, mistakes, limitations and improvisations (Bonini *et al.*, 2002). Additionally, the effluents produced in these facilities are likely to carry an abundant load of substances that can contaminate the environment (Fall *et al.*, 2002).

Students working in university clinical analysis teaching laboratories may handle such substances as dyes, antiseptics, disinfectants, drugs, and solvents, which, when discarded into the laboratory sinks, may contribute to the establishment of a microenvironment with high selective pressure, requiring adaptation of the resident microbiota. This poses an imminent risk of the

emergence and spread of resistant pathogens through the sink drains, through the plumbing system and into receiving bodies of water. In view of this, the present work aimed to evaluate the formation of biofilm of *P. aeruginosa* isolated from the sinks of a university clinical analysis teaching laboratory. The susceptibility profile of antibiotics used in the empirical anti-pseudomonas regimen was also examined.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 ISOLATION AND IDENTIFICATION OF *P. aeruginosa*

Four *P. aeruginosa* were recovered from samples collected by swabbing the inner wall of the drains in three sinks of a university clinical analysis teaching laboratory. The sinks are used in practical classes in undergraduate paramedical courses during which effluents are produced from the manipulation of dyes, degerming solutions, and material cleaning, among others.

The isolates were obtained using APHA method 9213F (APHA; AWWA; WEF, 2012). Confirmation of *P. aeruginosa* was carried out by inoculation on cetrimide agar, incubated at 42 °C for 24-48h. All isolates were registered in SisGen under respective accession numbers: 2A (accession #AEC4165); 2B (accession #A473A1B); 3A (accession #ADBF7CF) and 3B (accession #A630377). Due to its antimicrobial susceptibility profile, the 3A isolate was selected for testing.

2.2 IN VITRO BIOFILM FORMATION ASSAY

Initially, two solutions, a 10% (v/v) leachate and synthetic wastewater with Chemical Oxygen Demand (COD) equivalent to 1,000 mg/L, were prepared. The leachate was composed of a mixture of 2 mL of each of the following solutions: 2% chlorhexidine digluconate, 1% phenicated crystal violet, 1% methylene blue, 2% lugol, 3% hydrogen peroxide, 33% zinc sulfate, Gram's phenicated fuchsin, added to 1 mL of biuret reagent and water *quantum sufficit* 150 mL. The leachate

was tested in an ecotoxicity assay with *Artemia salina* nauplii, following the methodology proposed by Meyer (1982). The synthetic wastewater had the following composition (in mg/L): sucrose (0.85), yeast extract (0.196), urea (0.062), K₂HPO₄ (0.004), KH₂PO₄ (0.003), CaCl₂ (0.003), MgSO₄ (0.002) and FeCl₃ (0.001), pH = 7.0±0.2 (Reyes-Lara; Reyes-Mazzoco, 2009).

Six *in vitro* biofilm formation tests were conducted, using glass microcosms with a capacity of 250 mL, containing 1mL of leachate diluted in 100 mL of synthetic wastewater. Test coupons with a minimum surface area of 1000 mm² of the following materials were immersed in the solution: polyvinyl chloride (PVC), polypropylene, aluminum 6061, dolomite, galvanized iron and glass. These were selected based on the material found in the laboratory.

The systems were inoculated with 1 mL of the suspension of isolate 3A from recent cultivation, prepared in 0.85% NaCl. Incubation occurred at 37 °C for 48 h. Afterwards, each coupon was carefully removed, washed vigorously in tap water and transferred to a Petri dish for biofilm quantification using the crystal violet method (Balasubramanian *et al.*, 2012). The coupons were immersed in 3 mL of 1% crystal violet solution for 20 min. Then, they were washed with tap water and each immersed in the same volume of 95% ethyl alcohol for 30 min. Afterwards, the optical density of the crystal violet-ethanol solution was measured at 580 nm (UV Drwell Lab, DU-8200, 190-1100nm).

The percentage of biofilm inhibition at 1% leachate was calculated using the formula:

$$\% = [(OD \text{ treatment} - OD \text{ control}) \div OD \text{ control}] \times 100 \quad (1)$$

Based on the results, inhibition was classified as weak if $\leq 40\%$, moderate if between 40% and 80%, or strong if $\geq 80\%$ (Rodrigues *et al.*, 2010). Related to the color of the leachate, two controls were prepared: the first one from the test solution whose optical density had been subtracted from that obtained in the treatment. The second control corresponded to the growth of *P. aeruginosa* in synthetic wastewater only.

2.3 QUANTIFICATION OF PYOCYANIN ON A SOLID BASIS

The solid base method adapted from Abou *et al.* (2018) was used. The isolates were incubated in cetrimide agar for 96 h at 29 ± 1 °C. Afterwards, the agar surface was washed with sterilized distilled water, and the agar was then cut into small cubes and transferred to a 50 mL centrifuge tubes containing 20 mL chloroform. After vortexing for 10 minutes, 10 mL of 0.2 mol/L HCl solution was added to each tube, followed by further vortexing and neutralization with 1.5 mol/L Tris-HCl, carefully applied by drip. Finally, the optical density at 580 nm was measured and the pyocyanin (PYO) concentration was determined by applying the following formula, obtained from a standard curve:

$$\text{PYO } (\mu\text{g/mL}) = (\text{ABS}_{580} - 5.9 \times 10^{-4}) \div 14.026 \quad (2)$$

This value was converted to mM, considering the volume of the cylinder formed by the agar on the plate (molecular weight of PYO = 210.23 g/mol).

2.4 ANTIBIOGRAM

The Kirby-Bauer method (CLSI, 2020) was used. Suspensions of the isolates in 0.85% NaCl with turbidity standardized to 0.5 on the MacFarland scale were inoculated onto the surface of Mueller-Hinton agar and then discs, each with one of the seven antibiotics chosen from the empiric antipseudomonas regimen were added to the agar surface, as follows: cefepime 30 µg, cefoxitin 30 µg, ceftazidime 30 µg, ciprofloxacin 5 µg, imipenem 10 µg, levofloxacin 5 µg, and tobramycin 10 µg. The plates were incubated at 37 °C for 18 h and the inhibition zones formed were measured and interpreted as sensitive, resistant, or intermediate.

2.5 HYDROPHOBICITY TEST

The microbial adhesion to hydrocarbons technique (MATH) was used as described by Tyfa *et al.* (2015). Firstly, a suspension of the isolate was prepared in a phosphate buffer solution (pH 7), with optical density varying between 0.4-0.6 and 600 nm (OD_i) to form the aqueous phase of the test. Subsequently, 0.5 ml of xylene was added to 2.5 ml of the bacterial suspension. It represented the oily phase of the test. Afterwards, the mixture of aqueous and oily phases was vortexed for 1 minute and left to rest for 60 minutes at 25 °C (OD_f). The percentage of cell wall hydrophobicity was calculated according to the following formula:

$$[(1-OD_i) \div OD_f] \times 100 \quad (3)$$

2.6 MOTILITY ASSAYS

A fresh suspension of isolate 3A was prepared as previously described and then 0.1 mL of the suspension was transferred to Petri dishes containing Müeller Hinton agar prepared with 1% leachate: on the surface for the swarming motility test (collective movement by flagella and type IV *pili*); and at the bottom, for the twitching motility test (type IV *pili* extension and retraction movement); and on the surface of semi-solid Müeller Hinton agar for the swimming motility test (individual displacement and rotational movement of the flagellum). The plates were incubated for 48 h at 30±1 °C and then the diameter of the motility zone (mm) was measured from the point of inoculation. The test control was carried out with media without leachate (Rossi *et al.*, 2018).

2.7 STATISTICAL ANALYSIS

All tests were made in triplicate, except for the ecotoxicity test, which was carried out in quadruplicate. All results were expressed as the mean ± error. In the *in vitro* biofilm formation assay, the results were analyzed using the Shapiro-

Wilk and Levene tests. The difference between them was evaluated by two-way analysis of variance followed by Tukey's post-hoc test with a significance of 0.05.

3 RESULTS

During the isolation phase, 12 specimens were isolated, of which 11 were positive for *Pseudomonas* spp. and 4 confirmed as *P. aeruginosa* in acetamide broth (2A, 2B, 3A and 3B), with only two producing pyocyanin in solid medium: 2A (12.3 ± 0.1 mM) and 3A (10.6 ± 0.2 mM). The isolate 3A was selected for the *in vitro* test of biofilm formation.

There was a reduction in biofilm formation by cells exposed to leachate in all coupons tested. Isolate 3A was identified as having a hydrophilic cell wall, obtaining a hydrophobicity percentage of 11.11%. The highest percentages of reduction in biofilm adhesion occurred on the PVC, polypropylene and aluminum 6061 coupons. On the other hand, there was more adhesion on the galvanized iron, glass and dolomite coupons. Table 1 summarizes the results and respective interpretations of the *in vitro* biofilm formation test.

Table 1. Reduction of biofilm adhesion on different surfaces

Coupon	Adhesion (%)	Surface	Interpretation
Aluminium 6061	– 95.0±0,1	Hydrophilic	Weakly adhered
Glass	– 62.6±0,1	Hydrophilic	Moderately adhered
Galvanized iron	– 63.1±0,1	Hydrophilic	Moderately adhered
Dolomite	– 14.6±0,1	Hydrophilic	Highly adhered
PVC	– 429.8±0,1	Hydrophobic	Weakly adhered
Propylene	– 290.0±0,1	Hydrophobic	Weakly adhered

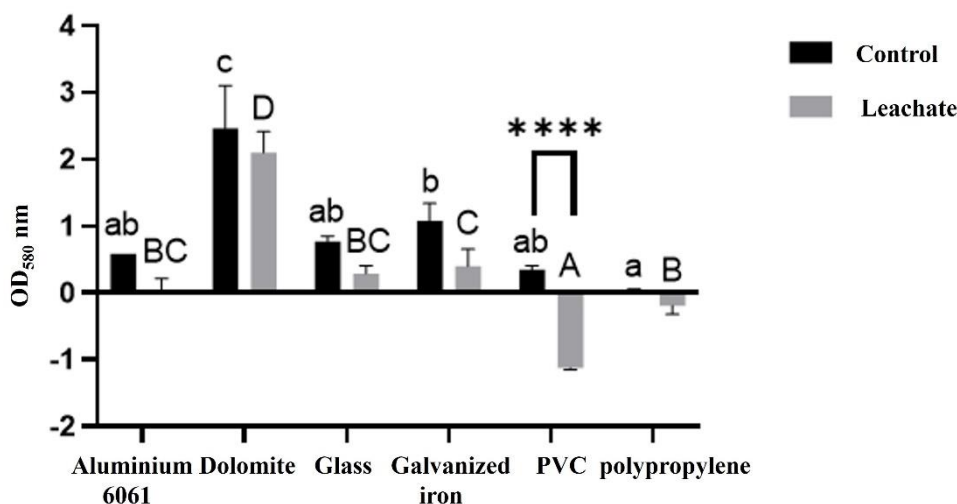
According to the percentage of reduction in biofilm adhesion, inhibition is defined as high (> 80%), moderate (40-80%) or weak (< 40%), meaning that, respectively, the cells are weakly, moderately or highly adhered.

Source: the authors.

Figure 1 illustrates the surface preference of the *P. aeruginosa* 3A. Lowercase letters represent significant statistical differences between the different materials, compared to the synthetic wastewater control (without leachate), while uppercase letters indicate differences in the presence of leachate. Clearly the most significant reduction occurred in the PVC test

(indicated with an asterisk). In addition, although a large reduction in adhesion was observed on polypropylene and aluminum 6061, statistically, the results were similar for all other surfaces tested. It is noteworthy that the highest adhesion of cells was observed on the dolomite coupon, considering this surface as the preferred surface for the isolate, followed by galvanized iron and glass.

Figure 1. Preferential adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* 3A on different surfaces



Source: the authors

In the ecotoxicity test, the 1% leachate was considered highly toxic, killing 100% of *A. salina* nauplii. Regarding the action of leachate on motility, changes were observed. Swimming motility was increased by approximately 31%, while swarming and twitching motility were reduced by approximately 22 and 56%, respectively. Table 2 summarizes the results.

Table 2. 48h motility zone of *Pseudomonas aeruginosa* 3A exposed to leachate

Motility	Length (mm)	Control (mm)
Swimming	20.7±2.2	15.7±2.7
Swarming	7.3±0.3	8.7±0.3
Twitching	4.3±0.3	8.7±0.3

Source: the authors

The antibiogram was carried out with pyocyanin-producing *P. aeruginosa* isolates. Isolate 3A demonstrated resistance to the largest number of antibiotics (all cephalosporins and ciprofloxacin), but all isolates were sensitive to imipenem, tobramycin and levofloxacin, while they demonstrated resistance to ceftiofloxacin, a

second-generation cephalosporin. There were also observations of values considered intermediate. The results are summarized in Table 3.

Table 3. Number and frequency of antimicrobial resistant and intermediate pyocyanin-producing *Pseudomonas aeruginosa* recovered from sinks (n = 4)

Antibiotic	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
	<i>n</i>	Resistant (%)	Intermediate (%)
Cefepime	2	25	25
Cefoxitin	4	100	0
Ceftazidime	1	25	0
Ciprofloxacin	2	0	50
Imipenem	0	0	0
Levofloxacin	0	0	0
Tobramycin	0	0	0

Source: the authors

4 DISCUSSION

This study aimed to isolate *P. aeruginosa* from sink drains in a university clinical analysis teaching laboratory and to assess possible risks of contamination to water bodies by potentially pathogenic microorganisms carried through the drainage system. Isolation of antimicrobial-resistant *P. aeruginosa* from sink drains is common in investigations of hospital environments (Geyter *et al.*, 2021; Pirzadian *et al.*, 2023). Our group, however, has already detected *P. aeruginosa* in discharges from unexpected cosmopolitan settings, such as beauty salons (Viana *et al.*, 2017). As far as we have found in the literature, this was the first report on antibiotic-resistant *P. aeruginosa*, isolated from sinks of a university clinical analysis laboratory. This is consonant with a rise in interest in the increase in bacteria resistance in non-clinical settings from contamination carried by effluents as an emerging issue (Hoban *et al.*, 2022; Zhao *et al.*, 2019).

Environmental stress exerts a significant influence on microbes, affecting their physiological and metabolic processes, as well as the individual and population growth rate. It is important to highlight, however, that drug resistance can arise for adaptive reasons, as a consequence of selective pressure and not necessarily due to direct contact with the drug (Andrade *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2023). Given the context of our study, we can state that leachate caused changes in the behavior of the isolates. It was not within the scope of the work, however, to

verify the relationship between the antimicrobial resistance profile and the selective pressures exerted in the microenvironment of the laboratory sinks chosen.

P. aeruginosa has demonstrated the ability to maintain itself in complex environments, such as sink drains, showers, taps, wastewater treatment plants and water supply tanks. Biofilm is the mechanism used to ensure its persistence (Zhou *et al.*, 2016). The formation of biofilms is multifactorial, and the affinity of a cell wall to the surface is an important factor. *P. aeruginosa*, for example, with a more hydrophilic cell wall, preferably adheres to hydrophilic surfaces such as glass, metal and stone (Rollet *et al.*, 2009). However, the versatility displayed by *P. aeruginosa* demonstrates variety in the mechanical properties of its biofilms, as well as in the composition of its cell wall (Gloag *et al.*, 2018), providing adhesion to hydrophobic surfaces, giving it an ecological advantage (Figueiredo *et al.*, 2021). In addition, moderate to weak adhesion favors cell detachment (Gouveia *et al.*, 2023).

An environment such as sink drains and pipes suggests the adaptive plasticity of *P. aeruginosa*. In these sites, there are three fluid flow regimes: turbulent, transitional and laminar (Qiang *et al.*, 2022). The flow regimes create a very stressful scenario, in terms of physicochemical and nutritional changes, favoring the rapid development of adaptive survival characteristics (Speranza *et al.*, 2004). As an example, the speed of *P. aeruginosa* 3A swimming cells was 0.12 $\mu\text{m/s}$ when exposed to leachate and twelve times lower in the synthetic wastewater control.

The increase in flagella motility as well as the dependent reduction of type IV *pili* after exposure to leachate exemplify a specific adaptive response of *P. aeruginosa*. A moderate to weak adhesion is an evolutionary response for *P. aeruginosa*. This favors detachment under minimal chemical stress (Kühn *et al.*, 2021; Sampedro *et al.*, 2014). A study comparing the three types of motilities of *P. aeruginosa* observed that although swarming and twitching cells did not differentiate between clinical and wild isolates, wild swimming cells showed greater speed than clinical isolates which were non-motile or weakly motile because clinical isolates must form biofilm to ensure persistence in the host (Souza *et al.*, 2019).

The reported antimicrobial susceptibility profile of *P. aeruginosa* in the literature, indicates that the prevalence of resistant cells varied greatly. Edward *et al.*, (2023) described 2.9% resistance to all antibiotics tested among 104 *P. aeruginosa* isolates. On the other hand, Akinduti *et al.* (2023) reported almost 40% of multidrug resistant *P. aeruginosa* in a total of 147 isolates. Additionally, the literature reports studies where the highest rate of resistance in wild isolates of *P. aeruginosa* has been observed for antibiotics that act on cell wall synthesis, particularly cephalosporins. This was also verified in our study, agreeing with previous works (Butiuc-Keul *et al.*, 2020; Makharita *et al.*, 2020; Mapipa *et al.*, 2021). Furthermore, this resistance profile has been found not only in cosmopolitan isolates but has also in wild isolates obtained from rural areas, whose scenario hypothetically exerts less selective pressure, compared to urban environments. In addition, urban areas are more densely populated and bacteria are highly exposed to sources of contamination of anthropogenic origin (Hafiane *et al.*, 2019, Nassri *et al.*, 2021). This illustrates the inherent intrinsic resistance of *P. aeruginosa* to antibiotics, which in terms of public health, poses a threat when some strains exhibit wild-type virulence factor phenotypes.

5 CONCLUSION

Under the conditions applied in this study, the results provided insight into the behavior of *P. aeruginosa* in educational clinical analysis laboratory environments. In addition to being isolated from sinks that received toxic effluents, *P. aeruginosa* cells also formed biofilms adhered to hydrophilic surfaces, preferably dolomite. Exposure to leachate altered the motility activities of swarming, swimming and twitching cells, stimulating an increase in swimming motility and reducing the swarming and twitching motilities. Furthermore, the isolates demonstrated resistance to at least one of the antibiotics tested. Isolate 3A was the most resistant. Although *P. aeruginosa* 3A preferred materials not part of the sink, siphon or pipes, adhesion was observed on PVC and aluminum used in the sink, confirming the sink as an environment conducive to the formation of *P. aeruginosa* biofilms.

The results of the present work contribute to the deep discussion on the challenges of implementing good practices in school clinical analysis laboratories, as well as environmental education policies together with means for proper disposal of substances in educational laboratories and good management practices.

The main limitation of this study lies in the fact that other teaching laboratories should be considered in terms of environmental contamination, such as chemical analysis, morphoanatomy, botany, pharmacology, and many others. It is therefore recommended that further studies may consider these scenarios as well as novel potential pathogens other than *P. aeruginosa*.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to express gratitude to the Master's Program in Cellular and Molecular Biology and the Federal University of Paraíba for the Scientific Initiation Program. English text of this paper has been revised by Sidney Pratt, Canadian, MAT (The Johns Hopkins University), RSAdip – TESL (Cambridge University).

REFERENCES

- ABOU, P.; EL FEGHALI, R.; NAWAS, T. Extraction and purification of pyocyanin: a simpler and more reliable method. **MOJ Toxicol.**, v. 4, n. 6, p. 412-422, 2018, doi: 10.15406/mojt.2018.04.00139
- AKINDUTI, P. A.; GEORGE, O. W.; OHORE, H. U. *et al.* Evaluation of efflux-mediated resistance and biofilm formation in virulent *Pseudomonas aeruginosa* associated with healthcare infections. **Antibiotics**, v. 12, n. 3, p. 626, 2023 doi: 10.3390/antibiotics12030626
- ANDRADE, L.; CHIQUE, C.; HYNDS, P. *et al.* The antimicrobial resistance profiles of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from private groundwater wells in the Republic of Ireland. **Environ Pollut**, v. 317, p. 120817, 2023, doi: 10.1016/j.envpol.2022.120817
- APHA, AWWA, WEF. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 22nd ed. Baltimore: APHA, AWWA, WEF, 2012.
- BALASUBRAMANIAN, D.; SCHNEPER, L.; MERIGHI, M. *et al.* The regulatory repertoire of *Pseudomonas aeruginosa* AmpC β -lactamase regulator AmpR includes virulence genes. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0034067
- BALMURI, S. R.; PHANDANOUVONG-LOZANO, V.; HOUSE, S. D. *et al.* Mucoid coating provides a growth advantage to *Pseudomonas aeruginosa* at oil–water interfaces. **Appl Bio Mater**, v. 5, n. 5, p. 1868-1878, 2022, doi: 10.1021/acsabm.1c01198
- BEHZADI, P.; GAJDÁCS, M.; PALLÓS, P. *et al.* Relationship between biofilm-formation, phenotypic virulence factors and antibiotic resistance in environmental *Pseudomonas aeruginosa*. **Pathogens**, v. 11, n. 9, p. 1015, 2022, doi: 10.3390/pathogens11091015
- BONINI, P.; PLEBANI, M.; CERIOTTI, F. *et al.* Errors in laboratory medicine. **Clin Chem**. v. 48, n. 5, p. 691-698, 2002, doi: 10.1093/clinchem/48.5.691
- BUTIUC-KEUL, A.; CARPA, R.; PODAR, D. *et al.* Antibiotic resistance in *Pseudomonas* spp. through the urban water cycle. **Curr Microbiol.**, v. 78, n. 4, p. 1227-1237, 2021, doi: 10.1007/s00284-021-02389-w
- CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. **CLSI supplement M100**, 30th ed. 2020.
- DALLANORA, F.; DALLANORA, L. M. F.; DALLANORA, A. F. *et al.* Multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* from hospital and household effluent of public collecting network. **RIES**, v. 1, n. 1, p. 46-55, 2023, doi: 10.33362/ries.v1i1.3117

DESTOUMIEUX-GARZÓN, D.; MAVINGUI, P.; BOESTSCH, G. *et al.* The One Health Concept: 10 years old and a long road ahead. **Front Vet Sci.**, v. 5, p. 14, 2018, doi: 10.3389/fvets.2018.00014

EDWARD, E. A.; EL SHEHAWY M. R.; ABOUELFETOUH, A. *et al.* Prevalence of different virulence factors and their association with antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Egypt. **BMC Microbiol.**, v. 23, n. 1, p. 161, 2023, doi: 10.1186/s12866-023-02897-8

FALL, C.; CUENCA-MENDOZA, F.; JIMÉNEZ-MOLEÓN, M. C. Patrón de contaminación de las aguas residuales procedentes de laboratorios universitarios. **Inf Tecnol.**, v. 13, n. 1, p. 55-60, 2002.

FIGUEIREDO, A. R. T.; WAGNER, A.; KUMMERLI, R. Ecology drives the evolution of diverse social strategies in *Pseudomonas aeruginosa*. **Molec Ecol.**, v. 30, n. 20, p. 5214-5228, 2021, doi: 10.1111/mec.16119

GEYTER, D.; VANSTOKSTRAETEN, R.; CROMBÉ, F. *et al.* Sink drains as reservoirs of VIM-2 metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in a Belgian intensive care unit: relation to patients investigated by whole-genome sequencing. **J Hosp Infect.**, v. 115, p. 75-82, 2021, doi: 10.1016/j.jhin.2021.05.010

GHSSEIN, G.; EZZEDDINE, Z. A review of *Pseudomonas aeruginosa* metallophores: pyoverdine, pyochelin and pseudopaline. **Biology**, v. 11, n. 12, p. 1711, 2022, doi: 10.3390/biology/11121711

GLOAG, E. S.; GERMAN, G. K.; STOODLEY, P. *et al.* Viscoelastic properties of *Pseudomonas aeruginosa* variant biofilms. **Sci Rep.** v. 8, p. 9691, 2018, doi: 10.1038/s41598-018-28009-5

GOUVEIA, C. Q.; GOMES, V. T.; TRAVASSOS, R. A. *et al.* Coffee breaks the Journey of pseudomonads: a pause for a reflection. **Multidiscip Sci Rep.** v. 3, n. 2, p. 40, 2023, doi: 10.54038/ms.v3i2.40

HAFIANE, F. Z.; TAHRI, L.; AMEUR, N. *et al.* Antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in well Waters in irrigated zone (Middle Atlas-Morocco). **Nat Environ Pollut Technol.**, v. 18, n. 4, p. 1193-1200, 2019.

HIGHMORE, C. J.; MELAUGH, G.; MORRIS, J. R. *et al.* Translational challenges and opportunities in biofilm science: a BRIEF for the future. **NJJ Biofilms Microbiomes**, v. 8, p. 68, 2022, doi: 10.1038/s41522-022-00327-7

HOBAN, S.; ARCHER, F. I.; BERTOLA, L. D. *et al.* Global genetic diversity status and trends: towards a suite of Essential Biodiversity Variables (EBVs) for genetic composition. **Biol Rev.**, v. 97, n. 4, p. 1511-1538, 2022, doi: 10.1111/brv.12852

IDOWU, A. B.; ADEOYE, O. O.; BELLO, S. A. M. *et al.* Growth pattern of *Pseudomonas aeruginosa* in different wastewater media. **Int J Environ Agric Biotechnol.**, v. 2, n. 5, p. 2622-2628, 2017, doi: 10.22161/ijeab/2.5.44

KÜHN, M. J.; TALA, L.; INCLAN, Y. F. *et al.* Mechanotaxis directs *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility. **Biol Sci.**, v. 118, n. 30, p. e2101759118, 2021, doi: 10.1073/pnas.2101759118

LUCZKIEWICZ, A.; KOTLARSKA, E.; ARTICHOWICZ, W. *et al.* Antimicrobial resistance of *Pseudomonas* spp. isolated from wastewater and wastewater-impacted marine coastal zone. **Environ Sci Pollut Res.**, v. 22, p. 19823-19834, 2015, doi: 10.1007/s11356-015-5098-y

MAGALHÃES, M. J.; PONTES, G.; SERRA, P. T. *et al.* Multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* survey in a stream receiving effluents from ineffective wastewater hospital plants. **Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 193, 2016, doi: 10.1186/s12866-016-0798-0

MAKHARITA, R. R.; EL-KHOLY, I.; HETTA, H. F. *et al.* Antibigram and genetic characterization of carbapenem-resistant gram-negative pathogens incriminated in healthcare-associated infections. **Infect Drug Resist.**, v. 13, p. 3991-4002, 2020, doi: 10.2147/IDR.S276975

MAPIPA, Q.; DIGBAN, T. O.; NNOLIM, N. E. *et al.* Antibigram profile and virulence signatures of *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from selected agrestic hospital effluents. **Sci Rep.**, v. 11, p. 11800, 2021, doi: 10.1038/s41598-021-91280-6

MARUTESCU, L. G.; POPA, M.; GHEORGHE-BARBU, I. *et al.* Wastewater treatment plants, an “escape gate” for ESCAPE pathogens. **Front Microbiol.**, v. 14, p. 1193907, 2023, doi: 10.3389/fmicb.2023.1193907

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E. *et al.* Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Med.**, v. 45, n. 5, p. 31-34, 1982, doi: 10.1055/s-2007-971236

MORADALI, M. F.; GHODS, S.; REHM, B. H. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. **Front Cell Infect Microbiol.**, v. 7, n. 39, 2017. 10.3389/fcimb.2017.00039

MUES, N.; CHU, H. W. Out-smarting the host: bacteria maneuvering the immune response to favor their survival. **Front Immunol.**, v. 11, p. 819, 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.0081

NASSRI, I.; TAHRI, L.; SAIDI, A. *et al.* Prevalence, diversity and antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates from spring water in a rural area of northwestern Morocco. **Biodiversitas.**, v. 22, n. 3, p. 1363-1370, 2021, doi: 10.13057/biodiv/d220337

NGUYEN, J.; FERNANDEZ, V.; PONTRELLI, S. *et al.* A distinct growth physiology enhances bacterial growth under rapid nutrient fluctuations. **Nat Comm.**, v. 12, p. 3362, 2021, doi: 10.1038/s41467-021-23439-8

OLIVEIRA, A. D. L.; VASCONCELOS, U.; CALAZANS, G. M. T. Detection of potential pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* in a hospital water system. **Res J Pharm Biol Chem.**, v. 12, n. 4, p. 132-139, 2021.

OŁDAK, E.; TRAFNY, E.A. Secretion of proteases by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to ciprofloxacin. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 49, n. 5, p. 3281-3288, 2005, doi: 10.1128/AAC.49.8.3281-3288.2005

PENA, R. T.; BLASCO, L.; AMBROA, A. *et al.* Relationship between quorum sensing and secretion systems. **Front Microbiol.**, v. 10, p. 1100, 2019, doi: 10.3389/fmicb.2019.01100

PIRZADIAN, J.; VOOR IN 'T HOLT, A. F.; HOSSAIN, M. *et al.* Limiting spread of VIM-positive *Pseudomonas aeruginosa* from colonized sink drains in a tertiary care hospital: A before-and-after study. **PLoS One**, v. 18, n. 3, p. e0282090, 2023, doi: 10.1371/journal.pone.0282090

QIANG, W.; CHAONENG, Z.; JINZHOU, Z. *et al.* Numerical simulation of planar hydraulic fracture propagation with consideration to transition from turbulence to laminar flow regime. **Eng Fract Mech.**, v. 262, p. 108258, 2022, doi: 10.1016/j.engfracmech.2022.108258

REYES-LARA, S.; REYES-MAZZOCO, R. Efecto de las cargas hidráulica y orgánica sobre la remoción masica de un empaque estructurado en un filtro percolador. **Rev Mex Ing Quím.**, v. 8, n. 1, p. 101-109, 2009.

RODRIGUES, L. B.; SANTOS, L. R.; TAGLIARI, V. Z. *et al.* Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse. **Braz J Microbiol.**, v. 41, n. 4, p. 1082-1085, 2010, doi: 10.1590/S1517-8382201000004000029

ROLLET, C.; GAL, L.; GUZZO, J. Biofilm-detached cells, a transition from a sessile to a planktonic phenotype: a comparative study of adhesion and physiological characteristics in *Pseudomonas aeruginosa*. **FEMS Microbiol Lett.**, v. 290, n. 2, p. 135-142, 2009, doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01415.x

ROSSI, C.; SERIO, A.; LÓPEZ, C. C. *et al.* Biofilm formation, pigment production and motility in *Pseudomonas* spp. isolated from the dairy industry. **Food Control.**, v. 86, p. 241-248, 2018, doi: 10.1016/j.foodcont.2017.11.018

SADYRBAEVA-DOLGOVA, S.; SÁNCHEZ-SUÁREZ, M. D. M.; REGUERA-MÁRQUEZ, J. A. *et al.* The challenge of bacteremia treatment due to non-

fermenting gram-negative bacteria. **Microorganisms**, v. 11, n. 4, p. 899, 2023, doi: 10.3390/microorganisms11040899.

SAMPEDRO, I.; PARALES, R. E.; KRELL, T. *et al.* *Pseudomonas* chemotaxis. **FEMS Microbiol Rev.** v. 39, n. 1, p. 17-46, 2014, doi: 10.1111/1574-6976.12081

SOUSA, T.; HEBRAUD, M.; DAPKEVICIUS, M. L. N. E. *et al.* Genomic and metabolic characteristics of the pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*. **Int J Mol Sci.**, v. 22, p. 12892, 2021, doi: 10.3390/ijms222312892

SOUZA, I. A.; GARCIA, D. O.; ANVERSA, L. *et al.* Comparative analysis of the virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical and environmental. **Colloquium Vitae**, v. 11, n. 3, p. 41-50, 2019, doi: 10.5447/cv.v11i3.3267

SPERANZA, G.; GOTTARDI, G.; PEDERZOLLI, C. *et al.* Role of chemical interactions in bacterial adhesion to polymer surfaces. **Biomaterials**, v. 25, n. 11, p. 2029-2037, 2004, doi: 10.1016/j.biomaterials.2003.08.061

THI, M. T. T.; WIBOWO, D.; REHM, B. H. A. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Int J Molec Sci.**, v. 21, n. 22, p. 8671, 2020, doi: 10.3390/ijms21228671

TYFA, A.; KUNICKA-STYCZYŃSKA, A.; ZABIELSKA, J. Evaluation of hydrophobicity and quantitative analysis of biofilm formation by *Alicyclobacillus* sp. **Acta Biochim Pol.**, v. 62, n. 4, p. 785-790, 2015, doi: 10.18338/abp.2015_1133

VIANA, A. A. G.; MARTINS, R. X.; FERREIRA, G. F. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* and pyocyanin negatively act on the establishment of Enterobacteriaceae biofilm on a ceramic surface. **Int J Eng Res Appl.**, v. 7, n. 8, p. 23-30, 2017, doi: 10.9790/9622-0708022330

WANG, X.; WANG, J.; LIU, S.-Y. *et al.* Mechanisms of survival mediated by the stringent response in *Pseudomonas aeruginosa* under environmental stress in drinking water systems: Nitrogen deficiency and bacterial competition. **J Hazard Mater**, v. 448, p. 130941, 2023, doi: 10.1016/j.jhazmat.2023.130941

ZHAO, Y.; COCERVA, T.; COX, S. *et al.* Evidence for co-selection of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in metal polluted urban soils. **Sci Total Environ.** v. 656, p. 512-520, 2019, doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.11.372

ZHOU, Z. Y.; HU, B.; GAO, X. *et al.* Sources of sporadic *Pseudomonas aeruginosa* colonizations/infections in surgical ICUs: Association with contaminated sink trap. **J Infect Chemother**, v. 22, n. 7, p. 450-455, 2016, doi: 10.1016/j.jiac.2016.03.016