



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE BIOTECNOLOGIA**  
**BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

**ANDRWEY AUGUSTO GALVÃO VIANA**

***PSEUDOMONAS AERUGINOSA* INTERFERE NA ADESÃO DE  
ENTEROBACTÉRIAS NUMA SUPERFÍCIE CERÂMICA**

JOÃO PESSOA

2017

Andrwey Augusto Galvão Viana

***PSEUDOMONAS AERUGINOSA* INTERFERE NA ADESÃO DE  
ENTEROBACTÉRIAS NUMA SUPERFÍCIE CERÂMICA**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso, do Curso Superior em Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba – UFPB, como requisito para obtenção do título de Biotecnologista.

**Orientadores:**

**Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes**

**Ian Porto Gurgel do Amaral**

JOÃO PESSOA/PB

2017

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

V614p Viana, Andrwey Augusto Galvão.

Pseudomonas aeruginosa interfere na adesão de enterobactérias numa superfície cerâmica / Andrwey Augusto Galvão Viana. - João Pessoa, 2017.  
47 f. : il.

Orientação: Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes, Ian Porto Gurgel do Amaral.

Monografia (Graduação) - UFPB/CBIOTEC.

1. Pseudomonas aeruginosa. 2. Piocianina. 3. Escherichia coli. 4. Enterobacter aerogenes. 5. Antibiose. I. Gomes, Ulrich Vasconcelos da Rocha. II. Amaral, Ian Porto Gurgel do. III. Título.

UFPB/BC

**ANDRWEY AUGUSTO GALVÃO VIANA**

***Pseudomonas aeruginosa* interfere na adesão de enterobactérias  
numa superfície cerâmica**

Aprovado em 21/11/2017

**BANCA EXAMINADORA**



Prof. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes  
Orientador



Profª. Glícia Maria Torres Calazans  
(DA/CB/UFPE)

---

MSc. José Marreiro Sales Neto  
(PgPNSB/CCS/UFPB)

“Maravilhar-se é o primeiro passo para um  
descobrimento”

Louis Pasteur (1822 – 1895)

Dedico este trabalho aos meus pais, por me inspirarem e me ajudarem nessa caminhada em busca de conhecimento e realizações.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por todas as oportunidades adquiridas até esse momento, e aos meus pais, Roseane Galvão Viana e João Batista Viana dos Santos, dois educadores, que me ensinaram o valor dos estudos e ter coragem para resistir e persistir nas adversidades da vida, os melhores pais que compartilharam todos os meus momentos nesse curso e nunca desistiram de mim, graças ao amor deles consegui chegar onde estou e ser quem eu sou, espero continuar dando orgulho a vocês por toda eternidade.

À minha avó, Maria de Lourdes Viana dos Santos, por ser a grande influenciadora do meu caráter, onde sua presença no meu dia a dia é inspiração para sempre continuar aprendendo.

Aos meus amigos de longas datas Gabriel Brandão de Assis, Thaynara Kelly Valério Santos Viegas e Caroline Targino Alves da Silva por estarem juntos comigo sempre, sem o apoio e amor de vocês todos esses anos não seriam completos e nem especiais.

À Aline Dantas França o maior presente dessa graduação, sua amizade e sua presença durante todos esses anos deixou meu período no curso com mais cor, obrigado por todo seu amor e por todos os momentos que passamos ao longo desses 4 anos.

Aos amigos que ganhei nesse curso Alex Rique, Gabriel Joventino, André Tork, Tarcísio Bonifácio, espero que nossa cumplicidade dure até a eternidade, vocês foram essenciais durante esses tempos, os melhores momentos em que vivi vocês estavam lá.

Aos queridíssimos frequentadores da sala 10 Camilla Farias, Debora Lacerda, Fabrine Hilário, Karolyne Estrela, Lucas Alecrim, Melina Lins, Rafael Goulart, e Ray Arruda obrigado por toda amizade e cumplicidade durante toda a graduação.

Em especial ao meu orientador Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes por abrir a porta do seu laboratório e me colocar nesse mundo mágico da microbiologia, onde pude aproveitar de tudo durante esses 4 anos repletos de cumplicidade, viagens, conhecimento e novas descobertas, graças ao seu companheirismo, amizade, dedicação e orientação você foi o motivador pelo meu crescimento acadêmico e é o grande responsável por me fazer continuar no curso e escolher a área de estudo que quero levar para a pós-graduação.

A professora Sildivane Valcácia Silva, por todo o apoio e carinho dentro e fora da sala de aula, agradeço imensamente pelos ensinamentos, amadurecimento e auxílio na tomada de decisões, assim como a amizade conquistada durante todo esse período.

Para realização deste trabalho, agradeço imensamente:

Ao meu orientador, professor Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes pela oportunidade e por toda atenção dedicada a me orientar e apoiar durante o TCC.

Ao meu coorientador, professor Ian Porto Gurgel do Amaral, pela oportunidade e atenção dedicada a me orientar e apoiar durante o TCC.

Aos parceiros do Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMA), em especial Thiago Cavalcanti, Amanda Freire e Bianca Oliveira, por todo companheirismo durante os experimentos.

À minha banca avaliadora, Glícia Calazans e José Marreiro, pela disponibilidade em contribuir para o enriquecimento deste trabalho.

À Universidade Federal da Paraíba, pela oportunidade da formação acadêmica.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1	<i>Escherichia coli</i> cultivada em meio Eosina-Azul de Metileno (EMB)	15
Figura 2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> desenvolvida em agar P. A produção de piocianina (azul) e fluoresceína (amarela) produz a coloração esverdeada difundida sobre o agar	17
Figura 3	Passos da biossíntese de piocianina por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (adaptado de MAVRODI et al., 2001)	18
Figura 4	Ciclo de vida de um biofilme	19
Figura 5	Protocolo de identificação bioquímica dos isolados bacterianos	23
Figura 6	Aspectos da extração de piocianina: forma protonada (azul) à esquerda e forma ácida (vermelha) à direita	24
Figura 7	Sistema empregado no ensaio de formação do biofilme. À direita, pode-se perceber a coloração intensa da piocianina difundida no meio	26
Figura 8	Diferentes tons de pigmento difundido no caldo P após 72h de incubação sob agitação	29
Figura 9	Número de células viáveis de enterobactérias na peça de cerâmica	33
Figura 10	Número de células viáveis de enterobactérias no meio MWY	34

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1	Origem das linhagens utilizadas nesse estudo	21
Tabela 2	Produção de biomassa e piocianina pelas linhagens de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29
Tabela 3	Tempo de geração ( $\tau_g$ ) e quantificação das linhagens axênicas no biofilme	30
Tabela 4	NMP/cm <sup>2</sup> das linhagens de enterobactérias	31
Tabela 5	Concentração Inibitória Mínima de piocianina sobre <i>Enterobacteriaceae</i>	31
Tabela 6	NMP/cm <sup>2</sup> das linhagens dos coliformes aderidos na peça de cerâmica	32

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

CIM	Concentração mínima inibitória
EMB	Meio Eosina-Azul de Metileno
EPS	Exopolissacarídios
MWY	Meio Água Mineral-Extrato de levedura
NPM	Número-Mais-Provável
NPM/cm <sup>2</sup>	Número-Mais-Provável por centímetro quadrado
PYO+	Linhagens produtoras de piocianina
UFC	Unidades formadoras de colônia
UFC/mL	Unidades formadoras de colônia por mililitro
UFC/mL/cm <sup>2</sup>	Unidades formadoras por mililitro por centímetro quadrado

Observação: as abreviaturas, siglas e símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritas no texto ou são convenções adotadas universalmente.

**SUMÁRIO**

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	11
<b>2 OBJETIVOS</b>	13
2.1 Objetivo Geral	13
2.2 Objetivos Específicos	13
<b>3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	14
3.1 Qualidade de água	14
3.2 Bactérias do grupo coliforme	15
3.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16
3.4 Piocianina	17
3.5 Biofilmes: formação e vida preferencial bacteriana	18
<b>4 METODOLOGIA</b>	21
4.1 Isolamento e Identificação	21
4.2 Produção, extração e quantificação de piocianina	23
4.3 Quantificação da biomassa de <i>P. aeruginosa</i>	25
4.4 Ensaios de formação do biofilme	25
4.5 Avaliação da atividade antimicrobiana da piocianina	27
4.6 Ensaio de contato em meio aquoso	27
4.7 Tratamento estatístico	28
<b>5 RESULTADOS</b>	29
5.1 Síntese de Piocianina e produção de Biomassa	29
5.2 Formação de biofilme pelas linhagens em cultivo axênico	30
5.3 Ensaio do contato entre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e enterobactérias em tempos iguais	30
5.4 Avaliação da atividade antimicrobiana da piocianina	31
5.5 Ensaio do contato entre enterobactérias e <i>P. aeruginosa</i> em vantagem de 48 horas	32
5.6 Ensaio do contato durante 240h	33
<b>6 DISCUSSÃO</b>	35
<b>7 CONCLUSÕES</b>	40
<b>REFERÊNCIAS</b>	41
<b>APÊNDICE A – PRODUÇÃO GERADA POR ESSA PESQUISA</b>	47

## RESUMO

VIANA, Andrwey Augusto Galvão. *Pseudomonas aeruginosa* interfere na adesão de enterobactérias numa superfície de cerâmica. João Pessoa, 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) – Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, 2017

Aproximadamente 90-95% das linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* sintetizam piocianina, pigmento fluorescente de coloração azul-esverdeada e com atividade antimicrobiana conhecida a diferentes organismos competidores, incluindo membros da família *Enterobacteriaceae*. Este trabalho teve por objetivo, observar a influência da *P. aeruginosa* e da piocianina na formação do biofilme de duas linhagens de enterobactérias em uma superfície cerâmica. Três linhagens de *P. aeruginosa* e duas enterobactérias (*Escherichia coli* e *Enterobacter aerogenes*), isoladas de ambientes com elevado grau de pressão seletiva foram empregadas no estudo. Das linhagens de *P. aeruginosa*, duas sintetizaram  $8,99 \pm 4,38$  e  $8,02 \pm 0,01$   $\mu\text{g}/\text{m}$  de piocianina em caldo P, incubadas sob agitação de 150 rpm à  $29 \pm 1^\circ\text{C}$  por 72 h. A biomassa foi quantificada por peso seco. Os ensaios da formação do biofilme de *P. aeruginosa* e as enterobactérias foram conduzidos em microssistemas contendo uma peça de cerâmica com face superior medindo  $1\text{ cm}^2$  de área, imersa em água mineral esterilizada, adicionada com 0,5 g/L de extrato de levedura. As suspensões microbianas foram padronizadas em  $\approx 10^8$  UFC/mL. A incubação estática ocorreu à  $37^\circ\text{C}$ . Foram avaliadas três condições de contato: em tempos iguais, após 48h de vantagem para *P. aeruginosa* e na presença da concentração subinibitória de piocianina, determinada num ensaio prévio de concentração inibitória mínima. Os dois primeiros ensaios duraram 48h e o último, 240h. Os resultados foram obtidos pela quantificação das enterobactérias no biofilme. Culturas axênicas e um ensaio com linhagem não produtora de piocianina foram testadas para fins de comparação. Observou-se que a piocianina exerceu uma perturbação sobre a adesão, limitando o desenvolvimento do biofilme das enterobactérias, porém não reduzindo sua população no meio aquoso, sugestivo de que outros fatores espécie-específicos da *P. aeruginosa* participam do fenômeno de antagonismo.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*. Piocianina. *Escherichia coli*. *Enterobacter aerogenes*. Antibiose.

## ABSTRACT

VIANA, Andrwey Augusto Galvão. *Pseudomonas aeruginosa* interferes with the adhesion of enterobacteria on a ceramic surface. João Pessoa, 2017. Course Completion Work (Biotechnology) – Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, 2017

Approximately 90-95% of *Pseudomonas aeruginosa* strains synthesize pyocyanin, a fluorescent pigment of blue-greenish color and with antimicrobial activity known to different competing organisms, including members of the *Enterobacteriaceae* family. The aim of this work was to observe the influence of *P. aeruginosa* and pyocyanin on the formation of biofilms of two strains of enterobacteria on a ceramic surface. Three strains of *P. aeruginosa* and two *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli* and *Enterobacter aerogenes*), isolated from environments with a high degree of selective pressures were used in the study. From the *P. aeruginosa* strains, two synthesized  $8.99\pm 4.38$  and  $8.02\pm 0.01$   $\mu\text{g}/\text{m}$  of pyocyanin in *Pseudomonas* broth incubated under agitation of 150 rpm at  $29\pm 1^\circ\text{C}$  within 72 h. The biomass was quantified by dry weight. The assays for the formation of *P. aeruginosa* and enterobacteria biofilms were conducted in microsystems containing a ceramic piece with a top face measuring  $1\text{ cm}^2$  of area, immersed in sterilized mineral water, added with 0.5 g/L of yeast extract. Microbial suspensions were standardized at  $\approx 10^8$  CFU/mL. Static incubation occurred at  $37^\circ\text{C}$ . Three conditions of contact were evaluated: at equal times, after 48 hours of advantage for *P. aeruginosa* and in presence of pyocyanin at subinhibitory concentration, determined in a previous test of minimum inhibitory concentration. The first two experiments lasted 48 hours and the third experiment lasted 240 hours. The results were obtained by quantification of the enterobacteria cells in the biofilm. Axenic cultures and an assay with a non-pyocyanin producing strain were carried out for comparison. It was observed that the pyocyanin exerted a disturbance on adhesion of enterobacteria and limited the biofilm development, however not reduced number of enterobacteria in the aqueous medium, suggesting that other species-specific factors of *P. aeruginosa* may participate in the phenomenon of antagonism.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*. Pyocyanin. *Escherichia coli*. *Enterobacter aerogenes*. Antibiosis.

## 1 INTRODUÇÃO

A disponibilidade de água potável capaz de suprir as necessidades do homem tornou-se uma questão mundialmente preocupante. A água além de ser um elemento de fundamental importância para manutenção e sobrevivência dos seres vivos, consiste em um dos principais componentes necessários para o desenvolvimento das atividades de ordem econômica e social. O controle da qualidade sanitária da água destinada ao consumo humano é importante e necessário, pois a sua contaminação resulta num meio na transmissão de doenças (MANCHESTER et al., 2013). A falta de saneamento básico é responsável pelo óbito de milhões de crianças e se estima que 80% das doenças do mundo são atribuídas ao uso inadequado da água ou da falta de saneamento básico. Do ponto de vista sanitário, a ocorrência de contaminação fecal em corpos hídricos implica diretamente na qualidade da água utilizada para consumo e neste contexto, a investigação da presença de indicadores de poluição fecal se faz necessária (MARTINS, 2012).

As bactérias do grupo coliforme, conhecidas como indicadores de poluição fecal, compreendem uma classe heterogênea de micro-organismos da família *Enterobacteriaceae*, composta por mais de 30 gêneros. Do ponto de vista microbiológico, analisar uma amostra de água significa investigar a presença desses organismos. Em complemento, as amostras de água contendo estas bactérias podem indicar a presença de outros patógenos. Desde o século XIX, *Escherichia coli* foi escolhida como padrão microbiológico mais importante, cuja presença indica contaminação recente, uma vez que a multiplicação em ambiente aquático não é uma característica desta bactéria (FOPPEN e SCHIJVEN, 2006).

*Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria ubíqua e metabolicamente versátil. A bactéria apresenta um metabolismo bioquímico e fisiológico tão particular, o qual confere ao micro-organismo, qualidades de resistência e virulência sob outros organismos (VASCONCELOS, LIMA e CALAZANS, 2010). Seu pigmento característico, piocianina é um composto fenazínico (5-metilfenazina-1-ona), sintetizado por 90-95% das linhagens. Alguns autores sugerem que o composto é particularmente responsável pelo fenômeno de antagonismo contra outros micro-organismos por meio da geração de espécies reativas de oxigênio, pelos quais se acredita constituir o principal mecanismo de inibição do pigmento, garantindo sucesso da espécie, frente outras

bactérias e fungos, quando coexistem num mesmo ambiente, competindo por nutrientes e espaço vital (EL-FOULY et al., 2015).

A competição é um processo natural e ocorre quando um organismo produz alguma substância inibitória ao crescimento de outro. Essas substâncias podem ser de várias naturezas: pigmentos, enzimas, ácidos orgânicos ou antibióticos, entre outros. No ambiente aquático, vários fatores promovem a ocorrência do fenômeno de competição, dentre elas: temperatura, pH, nível de nutrientes, presença de oxigênio e concentração da população. Em certas condições, a sobrevivência de enterobactérias patogênicas sob comunidades de biofilmes é mais limitado e *P. aeruginosa* leva vantagem, por exemplo, sobre *E. coli*. (BENNING et al., 2003). Neste contexto, o fenômeno de antibiose possivelmente não está atrelado a um único feito e sim associado a diferentes mecanismos, envolvendo fatores biológicos e abióticos, cuja resposta será de estase à morte dos microrganismos susceptíveis, competidores da *P. aeruginosa* (VASCONCELOS; LIMA e CALAZANS, 2010; TAIT e SUTHERLAND, 2002).

Assim, este trabalho apresenta resultados de um estudo sobre a formação de biofilmes bacterianos de bactérias coliformes, em superfícies cerâmicas, trazendo informações a respeito de como a presença da piocianina pode influenciar o ciclo de vida de um biofilme enterobacteriano.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar o papel da *Pseudomonas aeruginosa* e da piocianina sobre a formação do biofilme de enterobactérias numa superfície cerâmica.

### 2.2 Objetivos Específicos

- ❖ Isolar linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* e enterobactérias de ambientes com elevado grau de pressão seletiva;
- ❖ Estimular a síntese de piocianina das linhagens de *P. aeruginosa* isoladas;
- ❖ Quantificar a concentração de piocianina produzida pelas linhagens de *P. aeruginosa*;
- ❖ Correlacionar a produção do pigmento à produção da biomassa.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 Qualidade de água

A água é fundamental para a formação e manutenção de todos os seres vivos e a qualidade da água consumida pelo homem é uma preocupação constante ao longo da história. O banco mundial estima que 584 milhões de pessoas não têm acesso à água potável no planeta e previu para 2015, que entre 5 e 10% da população da América latina e Caribe, Oriente médio e norte da África não tiveram acesso ao produto (PALUDO, 2010).

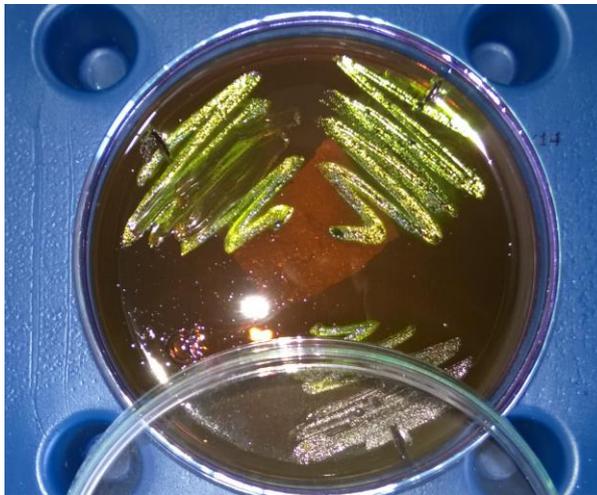
O consumo seguro de água garante uma melhor qualidade de vida e proteção contra as doenças, sobretudo aquelas evitáveis, relacionadas a fatores ambientais e que têm atingindo populações em todo o mundo (BRASIL, 2010). A qualidade da água pode ser avaliada por um conjunto de parâmetros físicos, químicos e biológicos. A lista dos agentes biológicos que podem representar risco à saúde humana compreende bactérias, vírus, fungos, protozoários, helmintos e as formas infectantes destes dois últimos, liberadas, nas fezes dos hospedeiros infectados, fazendo com que os esgotos domésticos sejam uma das mais importantes fontes de contaminação ambiental (CANTÚSIO; SANTOS; FRANCO, 2008).

As características microbiológicas da água são determinadas por análises laboratoriais que visam detectar organismos indicadores, cuja escolha envolve certos critérios de classificação. O mais importante deles corresponde ao fato de que sejam membros da biota intestinal e que a presença desses organismos no ambiente, reflita uma contaminação fecal recente. Considera-se um bom indicador de contaminação hídrica, o organismo com condições de viver parte ou totalmente, em meio aquático. Neste contexto, o indicador ideal de contaminação fecal em águas para consumo humano deve apresentar as seguintes características: 1 – a ocorrência no trato intestinal de animais de sangue quente; 2 – a relação direta com o grau de contaminação fecal da área; 3 – a facilidade na detecção; e 4 – exibir maior resistência à ação dos agentes desinfetantes comparada a outros patógenos (FUNASA, 2006). Sendo assim, *Escherichia coli*, membro do grupo coliforme, é aceito como o principal indicador de contaminação fecal e sua presença determinará o grau de potabilidade e utilização, ao qual a água analisada é destinada, por exemplo, para consumo humano, dessedentação animal, recreação ou preparação de formulações, entre outros (BRASIL, 2005; MADIGAN et al., 2010).

### 3.2 Bactérias do grupo coliforme

As bactérias do grupo coliforme ou simplesmente, bactérias coliformes, são organismos membros da família *Enterobacteriaceae*, composta por mais de 30 gêneros. (FOPPEN e SCHIJVEN, 2006). As enterobactérias são bacilos Gram-negativos fermentadores, aeróbios ou facultativos e não formadores de esporos (FRANCO; LANDGRAF, 2008). A espécie e gêneros mais prevalentes do grupo são: *Escherichia coli*, *Enterobacter* sp., *Citrobacter* sp. e *Klebsiella* sp., no entanto, *E. coli* (Figura 1) é considerado o único membro, exclusivo de origem do trato intestinal de animais de sangue quente, isto é, aves e mamíferos (BARBOSA et al., 2009). As bactérias coliformes podem se manter na água por pouco tempo, e embora sejam considerados o mais próximo ao indicador ideal de contaminação fecal, sua presença reflete o estado de higienização e integridade dos sistemas de distribuição e da presença potencial de biofilmes (CORREIA, 2014).

**Figura 1** – *Escherichia coli* cultivada em meio Eosina-Azul de Metileno (EMB)  
(crédito: Andrwey Viana)



A enumeração das bactérias coliformes é conduzida por técnicas que utilizam, meios sólidos e líquidos. Uma das mais empregadas é a determinação do Número-Mais-Provável (NMP) por meio da técnica dos tubos múltiplos (COELHO et al., 1998). O método estima a contagem de determinados grupos microbianos baseados no seu metabolismo e os resultados são relatados como positivos ou negativos, em uma ou mais diluições decimais da amostra, dispostas em tubos de ensaio. Para os coliformes,

totais e fecais, o resultado positivo do teste é conhecido pela turvação do meio e formação de gás (FRANCO e LANDGRAF, 1996; PEELER et al., 1992).

Ressalta-se que as análises colimétricas podem ser afetadas por diversos fatores físico-químicos, tais como, temperatura e pH, teor de cloreto, salinidade e metais pesados, entre outros, bem como pela ação microbiana, tendo a literatura identificado como interferentes, bactérias Gram-positivas (*Actinomyces*, *Micrococcus* e *Sarcina*), Gram-negativas (*Flavobacterium* e *Pseudomonas*) e alguns fungos (OZYUREK, GUR e BILKAY, 2011).

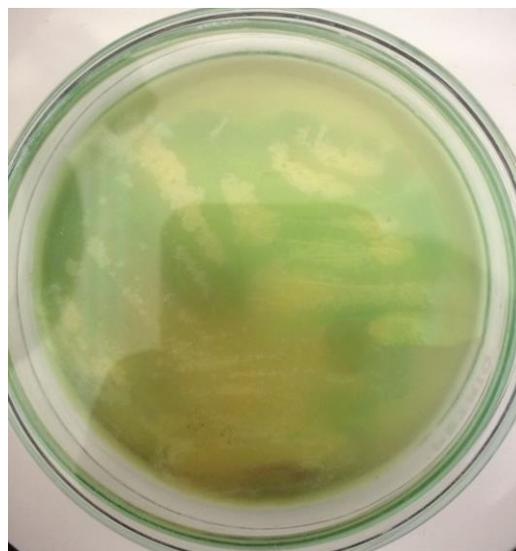
### 3.3 *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* (SCHROETER, 1872; MIGULA, 1894; 1900 *apud* SHORTER BERGEY'S MANUAL, 1994) é um bacilo aeróbio facultativo Gram-negativo, medindo 0,5 µm de largura, por 1,5 µm de comprimento, dotado de um único flagelo polar (YI-CHI; ZHAO-HONG; YING, 2015). A bactéria encontra no solo seu habitat de preferência, no entanto pode também ser isolado com frequência de amostras de água doce e fresca. Além disso, as linhagens são capazes de produzir exopolissacarídeos, garantindo uma vida sob a forma de biofilmes, nos ambientes com baixos teores de matéria orgânica dissolvida, assim como sob alta concentração de nutrientes (ARRUDA, 2013). Adicionalmente, sua habilidade em adaptar-se a uma grande variedade de condições físico-químicas, confere sua ubiquidade em diferentes ambientes (PIRNAY et al., 2005). Devido à sua presença em uma grande diversidade de ambientes, pode carrear plasmídeos e genes que lhe conferem multirresistência a antimicrobianos e capacidade catabólica frente a diversos compostos (MAIA et al., 2009).

Do ponto de vista metabólico e nutricional, *P. aeruginosa* é uma espécie versátil. A bactéria quando cultivada em laboratório, atrai atenções pela exuberante coloração de seus pigmentos e pelo aroma frutal de uva característico, derivado da produção de 2-aminoacetofenona. Seu genoma com tamanho de 6,3 Mpb garante uma impressionante versatilidade metabólica, permitindo adaptar-se a ambientes hostis, utilizando mais de 90 moléculas como fonte de carbono e energia, conferindo vantagens seletivas à *P. aeruginosa* sob condições desfavoráveis e confirmando sua reputação de resiliente (SCOTT-THOMAZ, 2010).

A espécie sintetiza pelo menos cinco diferentes pigmentos: 1-fluoresceína (amarelo-esverdeado) e 2-pioverdina (verde), fluorescentes e com função de sideróforos (DAS e MA, 2013; LEISINGER e MARGRAFF, 1979); 3-piorrubina A e B (vermelho-ferrugem), sintetizadas contra estresses oxidativos (ABU et al., 2013); 4-piomiéline (marrom claro), ainda com função desconhecida, porém acredita-se que desempenhe o mesmo papel da piorrubina (FERGUSON et al., 2007); e 5-piocianina (azul ou azul-esverdeado), fluorescente, cujo mecanismo parece envolver participação na redução do íon  $Fe^{3+}$ , visto que o metal é um fator de crescimento crucial para a bactéria (JAYASEELAN; RAMASWAMY e DHARMARAJ, 2014). A piocianina ainda apresenta outras duas importantes propriedades: como agente carreador de elétrons e a natureza antimicrobiana, atributo explorado como quimioterápico, décadas antes da descoberta da penicilina (MULLER e MERRET, 2014; OZYUREK; GUR e BILKAY, 2011; SCHOENTAL, 1941). A Figura 2 mostra uma cultura de *P. aeruginosa* em agar P, cujo pigmento, piocianina está difundido na superfície.

**Figura 2** – *Pseudomonas aeruginosa* desenvolvida em agar P. A produção de piocianina (azul) e fluoresceína (amarela) produz a coloração esverdeada difundida sobre o agar (crédito: Andrwey Viana)

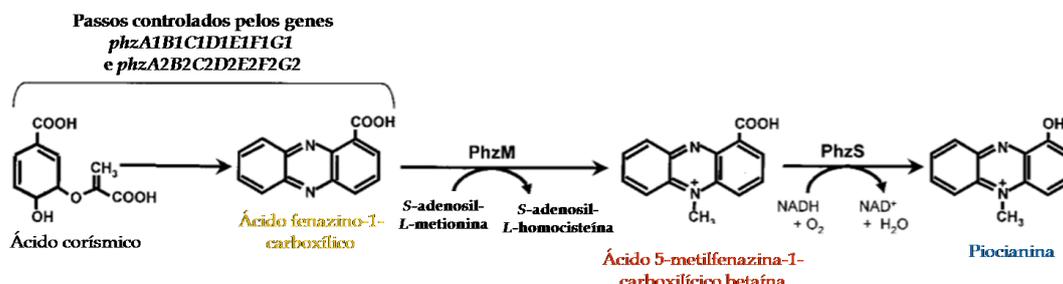


### 3.4 Piocianina

A piocianina é um pigmento sintetizado exclusivamente por 90-95% das linhagens de *P. aeruginosa* e foi o primeiro composto fenazínico natural descrito na literatura (MAVRODI et al., 2001). A molécula é formada por duas subunidades de N-

metil-1-hidroxifenazina e sua molécula precursora é o ácido corísmico, derivado da via do ácido chiquímico. A Figura 3 ilustra a biossíntese da piocianina.

**Figura 3** – Passos da biossíntese de piocianina por *Pseudomonas aeruginosa* (adaptado de MAVRODI et al., 2001)



A conversão do ácido corísmico em ácido fenazino-1-carboxílico (PCA, de cor amarela) é controlado por sete genes codificados por dois operons. Em seguida, dois passos são sugeridos para a síntese de piocianina, regulados por outros dois genes, *phzM* e *phzS*, a partir do PCA. No primeiro é formado o ácido 5-metilfenazina-1-carboxílico betaína (de cor vermelha), catalizado pela metiltransferase fenazina-específica (PhzM), uma S-adenosilmetionina transferase metil-dependente. Já o segundo passo é catalisado pela mono-oxigenase flavina dependente (PhzS), envolvendo a hidroxilação da betaína do ácido 5-metilfenazina-1-carboxílico betaína em 1-hidróxi-5-metil fenazina, isto é, piocianina, de cor azul brilhante (JAYASEELAN; RAMASWAMY e DHARMARAJ, 2014; MAVRODI et al., 2001). A síntese de piocianina é regulada pelo sistema *rhl*, responsável pelo fenômeno de *quorum-sensing*, processo dependente da densidade celular e mantido pela secreção e assimilação de autoindutores, especialmente homosserrina lactonas. Em complemento, a piocianina possui atividade antibiótica para uma grande variedade de micro-organismos, beneficiando a *P. aeruginosa* na eliminação de competidores (BAHARI et al., 2017; PRICE-WHELAN et al., 2006; PRICE-WHELAN et al., 2007; KIPNIS et al., 2006).

### 3.5 Biofilmes: formação e vida preferencial microbiana

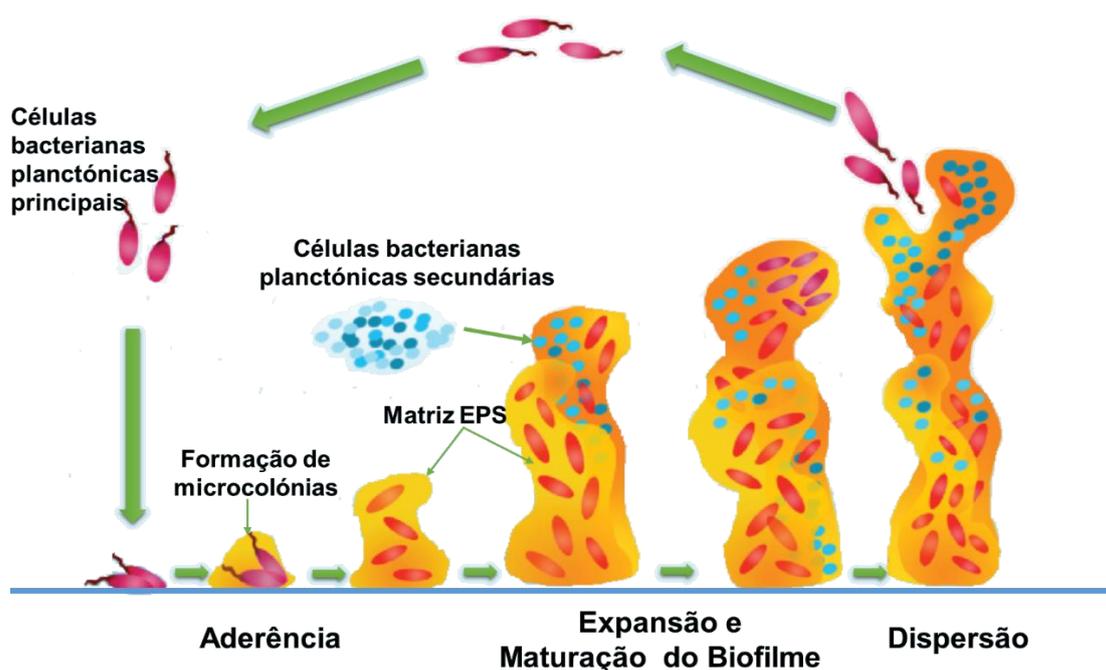
O biofilme pode ser definido como um microsistema complexo, aderido numa superfície orgânica ou inorgânica, formado por populações desenvolvidas a partir de uma única ou várias espécies associadas, envolvidas por uma matriz de

exopolissacarídios, EPS (SALDANHA, 2013). No seu interior ocorre intenso metabolismo, coordenado por um sistema de comunicação intercelular, permitindo a manutenção de todo o sistema (DONLAN e COSTERTON, 2002; STOODLEY et al., 2002).

A organização em biofilmes constitui a forma preferencial de vida microbiana, o modelo mais estudado corresponde à *P. aeruginosa*, os biofilmes medem cerca de 10 µm de largura por até 200 µm de altura, e estão organizados sob forma de pilares, ligados por alguns canais, os quais conferem estabilidade à estrutura e evitam o esgotamento de nutrientes, oxigênio, assim como o acúmulo de metabólitos (COSTERTON e WILSON, 2004).

O ciclo de vida de um biofilme, ilustrado na Figura 4, divide-se em quatro fases: 1- adesão, podendo ser reversível ou permanente, em função do reconhecimento da superfície pelo micro-organismo; 2- colonização; 3- maturação, envolvendo um sistema complexo de comunicação celular, com expressão de EPS e supressão de flagelina; e 4- desprendimento, quando a densidade microbiana compromete a estabilidade do sistema. O EPS é rompido por ação de liases, liberando indivíduos flagelados para nova colonização (COSTERTON e WILSON, 2004).

**Figura 4** – Ciclo de vida de um biofilme  
(disponível em: <http://knoww.net/ciencterravida/biologia/biofilme/>)



Muitas vezes, os biofilmes são responsáveis pelo aumento da carga microbiana nas águas estocadas para consumo humano e o maior risco que isto representa é a presença de organismos patogênicos, tais como membros da família *Enterobacteriaceae* (COSTERTON e WILSON, 2004). Sob competição com outros organismos em meio aquático, especialmente, *Pseudomonas aeruginosa*, a presença da bactéria e de seus metabólitos podem promover limitações no desenvolvimento do biofilme de bactérias coliformes. No entanto, encontrando condições que sejam favoráveis ao crescimento, as enterobactérias podem voltar a aumentar em número, representando risco à saúde (OZYUREK, GUR e BILKAY, 2011; FOPPEN e SCHIJVEN, 2006)

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Isolamento e identificação

Para este trabalho, foram utilizadas três linhagens selvagens de *Pseudomonas aeruginosa* (TGC01, TGC03, AV08) e duas linhagens aquáticas de enterobactérias, *Escherichia coli* (AV01) e *Enterobacter aerogenes* (AV14). Os micro-organismos foram isolados na Região Metropolitana de João Pessoa-PB, de ambientes, considerados para este estudo, com elevado grau de pressão seletiva, como listados na Tabela 1.

**Tabela 1** – Origem das linhagens utilizadas nesse estudo

Linhagem	Micro-organismo	Origem/local de isolamento	PC*
TGC01**	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Solo de posto de gasolina	100,00
TGC03**	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Solo de posto de gasolina	100,00
AV08	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ralo de salão de beleza	99,56
AV01	<i>Escherichia coli</i>	Ralo de salão de beleza	99,64
AV14	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Ralo de salão de beleza	100,00

\* PC - percentual de certeza de identificação do *kit* de identificação bioquímica

\*\* linhagens produtoras de piocianina

Para as linhagens de *P. aeruginosa* isoladas do solo, as amostras foram tomadas de porções cerca de 80-100 g entre a superfície e 15 cm de profundidade, da região central, próxima às bombas e/ou no entorno dos postos de gasolina. Deu-se preferência por estabelecimentos cujo estado de conservação fosse visualmente comprometido, atendendo o seguinte critério, adotado por esta pesquisa: fácil identificação de ferrugem nas bombas e/ou estruturas metálicas de sustentação, pisos quebrados ou rachados, presença de manchas de óleo e/ou vazamento de combustíveis ou de água.

As amostras de solo foram acondicionadas em coletores apropriados esterilizados e o material foi encaminhado sob refrigeração para o processamento no Laboratório de Microbiologia Ambiental do Centro de Biotecnologia da UFPB. Para a obtenção das linhagens foi empregada metodologia descrita pela APHA, AWWA e WEF (2012), utilizando os ensaios presuntivo e confirmativo para *P. aeruginosa*. Para o ensaio presuntivo, cerca de 10 g do solo foram transferidos para frascos cônicos com capacidade de 250 mL contendo 100 mL de solução de NaCl 0,85%. A mistura foi

homogeneizada sob agitação de 150 rpm, durante 30 minutos. Em seguida, alíquotas de 10 mL da suspensão foram transferidas para tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo Asparagina em concentração dupla e incubados durante 24-48h à 30°C, sendo considerados positivos, aqueles apresentando turvação do meio e produção de fluorescência sob luz ultravioleta à  $\lambda = 360 \pm 20\text{nm}$  (CRS, modelo DL-01).

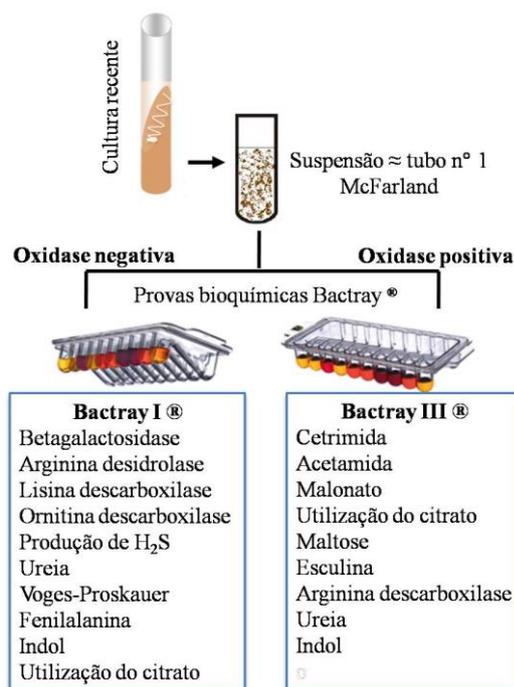
Em seguida, duas alçadas dos tubos considerados positivos do teste presuntivo, foram transferidas para tubos contendo 10 mL de caldo Acetamida. Após incubação à 30°C durante 24-48h, a alteração da coloração do meio de vermelho-alaranjado claro para fúcsia confirma a presença de *P. aeruginosa*. Um teste confirmativo complementar foi realizado em meio sólido, empregando a técnica do esgotamento sobre a superfície do ágar cetrimida, incubado posteriormente à 42°C por 24-48h.

Para o isolamento das linhagens dos ralos de salões de beleza, as amostras foram obtidas por raspagem com auxílio de um *swab* pelas paredes no interior das tubulações dos ralos e da embalagem. Em seguida, o *swab* foi imerso em caldo nutriente distribuído em tubos de ensaio e incubado à 37°C por 24-48h até visualização da turbidez. Alíquotas destes tubos foram transferidas para novos tubos de ensaio contendo meios dos ensaios presuntivos e confirmativos para detecção de *Pseudomonas aeruginosa*, bem como enterobactérias: caldo lactosado e caldo lactosado bile verde brilhante. O procedimento de enriquecimento e detecção das enterobactérias foi semelhante ao descrito anteriormente e a confirmação em meio sólido ocorreu utilizando o meio Eosina-Azul de Metileno, EMB (APHA, AWWA e WEF, 2012).

A identificação das culturas isoladas, após verificação da pureza, por meio do ensaio da coloração de Gram, foi conduzida utilizando o *kit* Bactray® de identificação bioquímica (Laborclin, Pinhais, Brasil), como apresentado na Figura. 5.

Inicialmente foi realizado o teste para atividade da citocromo oxidase, aplicando uma amostra de cultura recente por sobre a fita reagente (Laborclin, Pinhais, Brasil) à temperatura ambiente. A coloração azul formada em até dois minutos indicou resultado positivo para a enzima, enquanto o não surgimento de coloração, um resultado negativo. Em seguida, foram confeccionadas suspensões das culturas recentes, equivalentes ao tubo n° 1 da escala de McFarland ( $\approx 3 \times 10^8$  UFC/mL) e 1 mL desta suspensão foi transferido para a bandeja contendo os substratos específicos, Bactray I® se oxidase negativo e Bactray III® se oxidase positivo.

**Figura 5** – Protocolo de identificação bioquímica dos isolados bacterianos (FERRARO, 2015)



Os ensaios realizados por cada *kit* estão sumarizados na Figura 5. Os sistemas foram levados para incubação à 37°C por 24h e o resultado comparado à uma tabela cuja sequência numérica obtida, identificou a espécie com percentual de certeza entre 80 e 100%, sendo considerada excelente, se  $\geq 99,9\%$ ; muito boa se  $\geq 99\%$ , boa se  $\geq 90\%$  e aceitável se  $\geq 80\%$ , conhecidas no sistema de identificação versão *web Bac tray* Laborclin disponível em: <<http://www.laborclin.com.br/bac tray/default.asp>>.

Todas as linhagens foram mantidas sob refrigeração à 4°C no Laboratório de Microbiologia Ambiental, em ágar nutriente e submetidas a repiques trimestrais

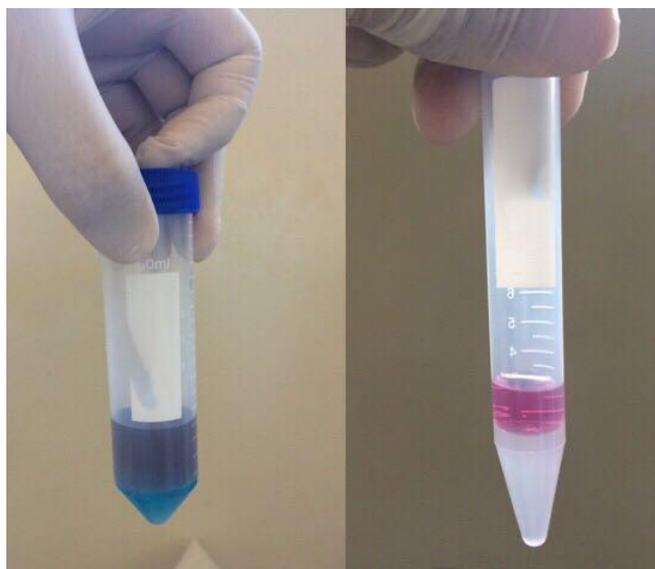
#### 4.2 Produção, extração e quantificação de piocianina

Para estimular a produção de piocianina, a inoculação das linhagens de *P. aeruginosa* foi realizada por meio da transferência de 1 mL de uma suspensão preparada com células de cultivo recente em solução de NaCl 0,85%, padronizada com o tubo n° 1 da escala de MacFarland, para frascos cônicos contendo 200 mL de caldo P (HASSANI et al., 2011), cuja composição, em g/L é: peptona de carne (20,0), MgCl<sub>2</sub> (1,4), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (10,0) e glicerol (10,0 mL/L), pH=7,2±0,2 (KING; WARD e RANEY, 1954). A incubação ocorreu sob agitação de 150 rpm à 29±1°C (Nova

Instruments NI 1713) por 72h, período necessário para a síntese de piocianina, correspondente à fase estacionária tardia (EL-FOULY et al., 2015). As linhagens que não sintetizarem o pigmento foram reservadas para fins de comparação dos resultados.

A extração da piocianina foi conduzida associando as metodologias adaptadas, descritas por Hassani et al. (2011) e Nowroozi et al. (2012). Dos frascos contendo as células e o pigmento dissolvido em caldo P, 10 mL foi transferido para tubos falcon com capacidade para 50 mL e em seguida foram adicionados 3 mL de clorofórmio. Os tubos foram agitados vigorosamente em vórtex (Warmnest VX-28) e deixados em repouso por 2 h. A piocianina na forma protonada ficou retida na fase do clorofórmio, que se tornou azul (Figura 6). Após o período, adicionou-se 1 mL de solução de HCl (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) 0,2 mol/L à uma alíquota de 1,5 mL do clorofórmio, novamente levada para o vórtex obtendo-se a piocianina em sua forma ácida, de cor vermelha (Figura 6), deixada em repouso por mais 2 h.

**Figura 6** – Aspectos da extração de piocianina: forma protonada (azul) à esquerda e forma ácida (vermelha) à direita (crédito: Andrwey Viana)



A estimativa da concentração de piocianina, em  $\mu\text{g/mL}$ , foi realizada pela medida da densidade óptica do sobrenadante acidificado em  $\lambda=520\text{ nm}$  (Quimis U2M). O valor mensurado foi multiplicado pelo coeficiente de extinção molar 17,072 (DAS e MA, 2013). O valor foi corrigido em razão da relação entre o volume gasto de clorofórmio na extração e a alíquota para acidificação, multiplicando-se o resultado por 3. O ensaio foi realizado em duplicata.

### 4.3 Quantificação da biomassa de *P. aeruginosa*

A biomassa (X) foi determinada empregando a técnica do peso seco (OLSSON e NIELSEN, 1997). Uma alçada de cada cultura recente, incubada por 24h à 30°C foi transferida para frascos contendo 200 mL de caldo P e incubados sob agitação de 150 rpm por 72h. Após, um volume de 10 mL foi transferido para tubos falcon e após três centrifugações sucessivas a 10.000 rpm por 15 minutos (HERMLE Labortechink Z326 K), descartando-se o sobrenadante, as células foram ressuspendidas em 10 mL de solução de NaCl 0,85% e transferidas para cadinhos de porcelana de massa conhecida, posteriormente incubados à 80°C (Olidex Cz) por 24h. A biomassa, em peso seco, foi calculada a partir da diferença entre as massas dos cadinhos, empregando a equação:

$$X = m_2 - m_1 \quad (\text{Eq. 1})$$

Em que X – biomassa (mg/L),  $m_1$  – massa do cadinho vazio e  $m_2$  – massa do cadinho após a incubação na estufa. Os testes foram realizados em duplicata

### 4.4 Ensaios de formação do biofilme

O ensaio empregou a técnica desenvolvida por Almshawit, Macreadie e Grando (2014) e teve como objetivo verificar, isoladamente o tempo de formação do biofilme dos micro-organismos teste, na face porosa de uma peça de cerâmica (Legato, Rio de Janeiro, Brasil) com área mínima de contato medindo 1 cm<sup>2</sup>.

A peça de cerâmica foi deixada em repouso, no fundo de um recipiente de material plástico transparente de polipropileno com capacidade para 70 mL, preenchido com 10 mL de uma mistura estéril de água mineral (Itacoatiara, Santa Rita, Brasil) e 0,5 g/L de extrato de levedura, denominada por MWY (Figura 7). Em seguida, 1 mL de uma suspensão do micro-organismo teste foi transferida para o reator, de modo que a população inicial ficou estabelecida em aproximadamente 10<sup>9</sup> UFC/mL. Em seguida, o reator foi incubado de forma estática à 37°C por 48h (Incubadora B.O.D SL – 200).

**Figura 7** – Sistema empregado no ensaio de formação do biofilme. À direita, pode-se perceber a coloração intensa da piocianina difundida no meio (crédito: Andrwey Viana)



O pré-inóculo foi preparado a partir de transferência de uma alçada de cultura recente, desenvolvida em ágar nutriente inclinado, para tubos contendo solução de NaCl 0,85% estéril. Nos intervalos de 24 e 48h após a inoculação, foram realizadas as quantificações. A peça de cerâmica foi removida, com auxílio de uma pinça, sob condições assépticas e a biomassa desenvolvida na superfície porosa foi transferida por meio de raspagem para um recipiente contendo 10 mL de solução de NaCl 0,85%. Após diluições decimais sucessivas, as linhagens de *P. aeruginosa* foram quantificadas pela técnica do *Pour plate* em agar nutriente, utilizando 0,1 mL do volume de amostra. Por outro lado, as linhagens dos coliformes foram quantificadas utilizando a técnica dos tubos múltiplos em série de 3 tubos, contendo meio presuntivo de coliformes totais, caldo lactosado (APHA, AWWA, WEF, 2012). Foram utilizados volumes de amostra de 1,0; 0,1 e 0,01 mL. O resultado positivo do teste foi conhecido pela turvação do meio e formação de gás, retido no tubo de Durham, disposto invertido nos tubos de ensaio. Não foi utilizado o meio confirmativo de coliformes, uma vez que já se conhecia a linhagem e o caldo lactosado foi empregado para a estimativa do Número-Mais-Provável (NMP) em ensaios posteriores.

Os testes foram realizados em duplicata e os resultados foram expressos em Unidade Formadora de Colônia por mililitro por centímetro quadrado (UFC/mL/cm<sup>2</sup>) quando empregada a quantificação em meio sólido e em NMP por centímetro quadrado (NMP/cm<sup>2</sup>), quando a estimativa da população foi realizada em meio líquido. Adicionalmente, o tempo de geração foi determinado para cada linhagem (BROCK, 2000).

#### 4.5 Avaliação da atividade antimicrobiana da piocianina

O teste determinou a concentração inibitória mínima (CIM) do pigmento sobre as duas enterobactérias, empregando a técnica da microdiluição (MARTINS et al., 2014a). As suspensões bacterianas foram confeccionadas em solução de NaCl 0,85% estéril, a partir de uma cultura recente, padronizada pelo tubo n° 1 da escala de MacFarland. Em microplacas, volumes de 0,1 mL da suspensão bacteriana ( $\approx 10^8$  UFC/mL) foram distribuídos e em seguida transferiu-se 0,1 mL da solução MWY de forma a serem testadas as concentrações do pigmento variando de 0,380 a 0,0015 mM, equivalentes às concentrações, menor e maior, detectadas da produção do pigmento em meio aquoso (HASSANI et al., 2011; EL-SHOUNY; AL-BAIDANI e HAMZA, 2011).

O sistema foi incubado por 96h à 37°C e em intervalos de 24h, alíquotas de 2 µL foram transferidas para novos poços contendo caldo nutriente (Sigma Aldrich, Rio de Janeiro, Brasil) e reincubados sob mesmas condições com intuito de verificar a formação de turbidez, indicativo da viabilidade celular. O controle utilizou apenas a MWY. O teste foi realizado em duplicata.

#### 4.6 Ensaio de contato em meio aquoso

O ensaio foi conduzido em duplicata com o objetivo de verificar se a presença de *P. aeruginosa* e/ou da piocianina pode perturbar a adesão de bactérias coliformes na superfície da peça de cerâmica. Em reatores contendo a solução MWY foram testadas duas condições, sob incubação estática, à 37°C por 48h, com intervalos de 24 h na quantificação dos coliformes: na primeira condição, o contato entre os isolados ocorreu em tempos iguais. Na segunda condição foi permitida uma vantagem de crescimento de 48h para *P. aeruginosa*, antes da inoculação dos coliformes, garantindo que a piocianina já estivesse difundida no meio. Uma linhagem de *P. aeruginosa* não produtora de pigmento foi utilizada para fins de comparação.

Uma terceira condição avaliou a participação da concentração subinibitória de piocianina sobre a formação e estabilidade do biofilme das enterobactérias por 240 h. foram quantificadas densidades celulares na peça de cerâmica e no meio MWY.

#### **4.7 Tratamento estatístico**

A análise de normalidade estatística foi realizada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, seguido do teste-t para avaliar a diferença dos resultados do teste de contato na presença e na ausência de piocianina no meio.

A correlação de Pearson foi determinada entre a concentração de piocianina e a produção de biomassa produzida, comparada às linhagens não produtoras de pigmento. Foi utilizado o programa IBM® SPSS® Statistics versão 21, considerando significativa se  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Síntese de Piocianina e produção de Biomassa

Do total de quatro linhagens estudadas, três apresentaram piocianina difundida no caldo P após 72h de incubação sob agitação, TGC01 e TGC02. O pigmento foi observado em até 48h de incubação. Na Figura 8 é possível verificar os diferentes tons na coloração, relacionados à produção concomitante de piocianina (azul) e fluoresceína (amarela), que sob a luz branca, criam a percepção da cor verde. As linhagens produtoras de piocianina, codificadas por PYO+, produziram entre 8-9  $\mu\text{g/mL}$  do pigmento (Tabela 3). A linhagem AV08 não exibiu pigmento. Quanto aos valores determinados de biomassa nas linhagens PYO+, não houve diferenças nas médias obtidas.

**Figura 8** – Diferentes tons de pigmento difundido no caldo P após 72h de incubação sob agitação (crédito da imagem: Andrwey Viana)



**Tabela 2-** Produção de biomassa e piocianina pelas linhagens de *Pseudomonas aeruginosa*

Isolados (codificação)	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	X (mg/L)*
TGC01	8,02 $\pm$ 0,01	8,0 $\pm$ 0,00
TGC03	8,99 $\pm$ 4,38	8,0 $\pm$ 0,00

\* biomassa expressa em peso seco (mg/L)

## 5.2 Formação de biofilme pelas linhagens em cultivo axênico

As linhagens cultivadas de forma axênica, de cada um dos dois grupos microbianos investigados, apresentaram um crescimento significativo e similar, da densidade celular no biofilme desenvolvidos na peça de cerâmica em 48h. Os tempos de geração das enterobactérias foram dilatados, enquanto para as linhagens de *P. aeruginosa* variou de 3,5 a 4,4h, como apresentadas na Tabela 4.

**Tabela 3** – Tempo de geração ( $\tau_g$ ) e quantificação das linhagens axênicas no biofilme

Linhagens	$\tau_g$ (h)	Densidade celular ( $\times 10^4$ )	
		24h	48h
TGC01 ( <i>P. aeruginosa</i> )	4.4 $\pm$ 0.1	29.0 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup>	280.0 $\pm$ 5.0 <sup>a</sup>
TGC03 ( <i>P. aeruginosa</i> )	3.5 $\pm$ 0.1	26.0 $\pm$ 2.0 <sup>a</sup>	260.0 $\pm$ 3.7 <sup>a</sup>
AV08 ( <i>P. aeruginosa</i> )*	3.5 $\pm$ 0.1	16.0 $\pm$ 4.0 <sup>a</sup>	110.0 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup>
AV01 ( <i>E. coli</i> )	1.8 $\pm$ 0.1	0.4 <sup>b</sup>	2.3 <sup>b</sup>
AV14 ( <i>E. aerogenes</i> )	1.9 $\pm$ 0.1	0.4 <sup>b</sup>	2.3 <sup>b</sup>

\* *P. aeruginosa* não produtora de piocianina, <sup>a</sup>UFC/cm<sup>2</sup>, <sup>b</sup>NMP/mL/cm<sup>2</sup>

Embora sob condições estáticas de incubação, os valores da quantificação da população microbiana foram expressivos, uma vez que todas as linhagens se fixaram em um curto intervalo de tempo curto, partidas de um inóculo baixo, sugestivo de que as primeiras 24h foram cruciais para o processo.

## 5.3 Ensaio do contato entre *Pseudomonas aeruginosa* e enterobactérias em tempos iguais

A Tabela 5 apresenta as densidades celulares de AV01 e AV14 desenvolvidas no biofilme. Independentemente de estarem em competição, as linhagens produtoras de piocianina utilizaram período semelhante, ao quando cultivadas de forma axênica, para exibir o pigmento.

A presença de *P. aeruginosa* refletiu perturbações sobre a adesão dos coliformes à superfície da peça de cerâmica. Baseado na premissa de que as primeiras 24h foram cruciais para a adesão das linhagens AV01 e AV14, competindo com *P. aeruginosa* sem que a piocianina estivesse difundida no meio, três respostas distintas foram observadas: inibição da adesão, redução da densidade microbiana instalada no biofilme e estase da população microbiana. A linhagem TGC01 promoveu a maior inibição, seguida de TGC03. A linhagem AV14 foi a enterobactéria mais sensível, comparada à AV01.

**Tabela 4** – NMP/cm<sup>2</sup> das linhagens de enterobactérias\*\*

Linhagens	Tempo e tipo de cultura			
	Mista		Axênica	
	24h	48h	24h	48h
AV01 x TGC01	0.9	0.7	0.4	2.3
AV01 x TGC03	0.9	0,9	0.4	2.3
AV01 x AV08*	0.4	0.9	0.4	2.3
AV14 x TGC01	0.0	0.0	0.4	2.3
AV14 x TGC03	0.4	0.4	0.4	2.3
AV14 x AV08*	0.4	0.9	0.4	2.3

\* linhagem não produtora de piocianina

\*\* Valores encontrados em duas repetições do teste

Por outro lado, competindo com uma linhagem não produtora de pigmento, ambas enterobactérias exibiram em t=24h o mesmo NMP obtido quando cultivadas isoladamente, sugerindo que outros fatores presentes na *P. aeruginosa* além do pigmento participam no fenômeno de antagonismo.

#### 5.4 Avaliação da atividade antimicrobiana da piocianina

A piocianina produziu efeito antagônico nas linhagens AV01 e AV14. Na Tab. 2 estão sumarizados os resultados, nos quais a CIM do pigmento foi conhecida, a partir da detecção de células viáveis ao longo de 96h.

**Tabela 5** – Concentração Inibitória Mínima de piocianina sobre *Enterobacteriaceae*

Concentração (mM)	AV01 / AV14			
	24h	48h	72h	96h
0,380	- / -	- / -	- / -	- / -
0,190	- / -	- / +	- / +	- / +
0,090	+ / -	+ / +	+ / +	+ / +
0,048	+ / -	+ / +	+ / +	+ / +
0,024	+ / -	+ / +	+ / +	+ / +

(+) indica viabilidade das células após período do contato

Frente AV01 foi observado crescimento a partir da concentração 0,09 mM desde o início do teste, sugerindo que as concentrações de 0,380 e 0,190 mM surtiram efeito biocida sobre a bactéria em até 96h. Por outro lado, contra AV14, a piocianina exibiu um efeito antimicrobiano inicialmente na maior concentração, 0,38 mM,

entretanto, crescimento microbiano foi verificado no intervalo seguinte, a partir da concentração de 0,190 mM, permanecendo assim até o final das 96h.

### 5.5 Ensaio do contato entre enterobactérias e *P. aeruginosa* em vantagem de 48 horas

A vantagem de 48h dada às linhagens de *P. aeruginosa* garantiu que a piocianina já difundida no meio, tenha perturbado significativamente a adesão de AV01 e AV14. Na Tabela 6 estão apresentados os valores do NMP, comparando-os com o crescimento sob a forma de culturas axênicas.

**Tabela 6** – NMP/cm<sup>2</sup> das linhagens dos coliformes aderidos na peça de cerâmica\*\*

Linhagens	Tempo e tipo de cultura			
	Mista		Axênica	
	24h	48h	24h	48h
AV01 x TGC01	0.4	0.0	0.4	2.3
AV01 x TGC03	0.0	0.0	0.4	2.3
AV01 x AV08*	1.4	0.9	0.4	2.3
AV14 x TGC01	0.4	0.3	0.4	2.3
AV14 x TGC03	0.0	0.0	0.4	2.3
AV14 x AV08*	1.4	0.9	0.4	2.3

\* linhagem não produtora de piocianina

\*\* Valores encontrados em duas repetições do teste

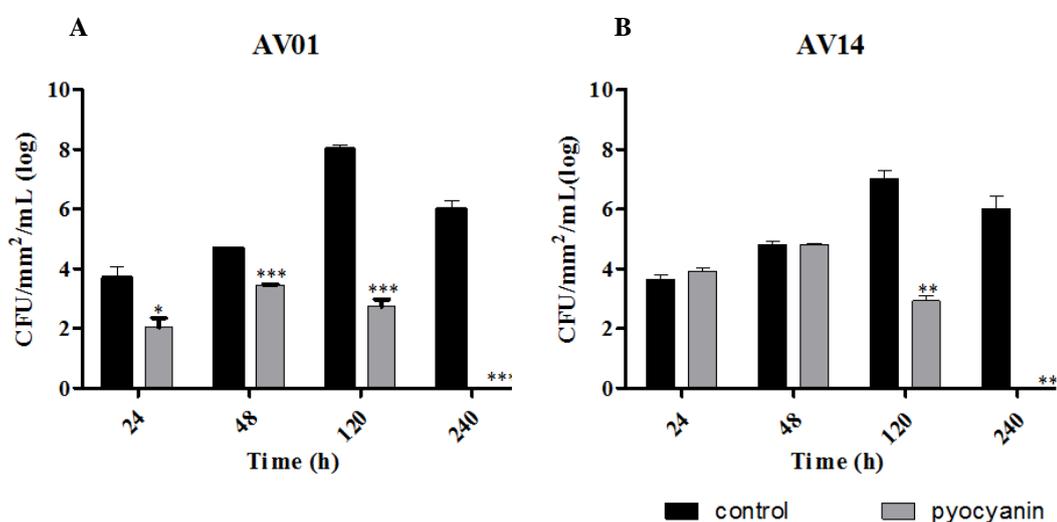
A presença do pigmento difundido no meio, associado à adesão de *P. aeruginosa* à peça de cerâmica e o dilatado tempo de geração exibido por AV01 (1,8 h) e AV14 (1,9h), produziu um efeito negativo sobre o desenvolvimento destas linhagens e duas respostas foram observadas: antibiose com ação biocida e perturbação na manutenção da população das enterobactérias, resultando reduções acentuadas no número de células aderidas a peça de cerâmica.

As maiores inibições foram promovidas pela linhagem TGC03, seguida por TGC01. Por outro lado, na ausência de piocianina, após 48h, o resultado foi semelhante ao obtido no ensaio de contato em tempos iguais, reforçando a hipótese de que outros fatores espécie-específicos da *P. aeruginosa* também podem participar do fenômeno de inibição.

## 5.6 Ensaio do contato durante 240h

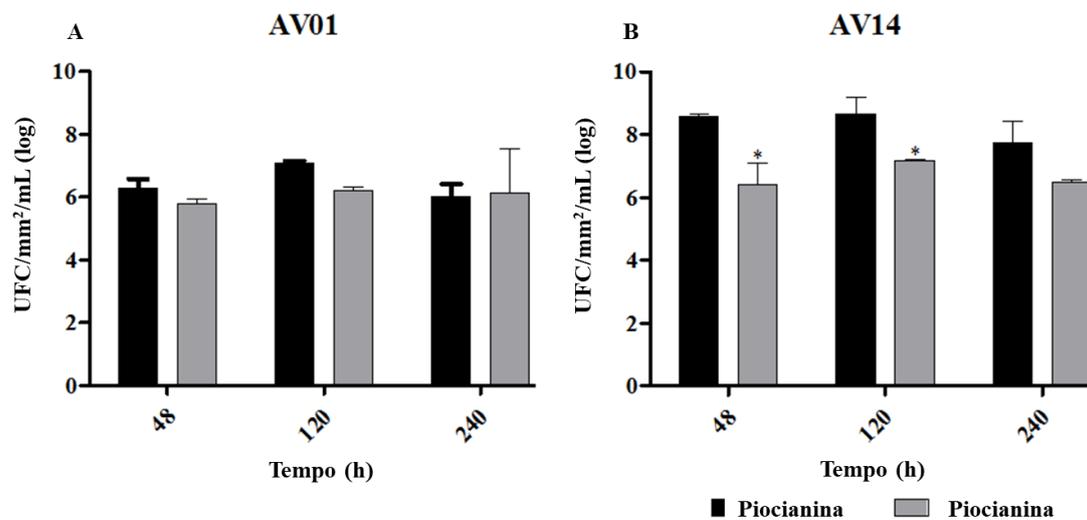
Com a dilatação no tempo do teste foi possível mensurar o grau de perturbação na dinâmica da formação do biofilme pelas bactérias coliformes. As concentrações subinibitórias de piocianina, respectivamente de 0,09 e 0,190 mM sobre as linhagens AV01 e AV14 promoveram um efeito negativo significativo, cuja densidade celular foi sendo gradativamente reduzida, chegando a não ser detectada após 240h de incubação (Fig. 9).

**Fig. 9** – Número de células viáveis de enterobactérias na peça de cerâmica (\* $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ;  $p^{***} < 0,001$ )



A letra A corresponde ao número de células viáveis de enterobactérias na peça de cerâmica para linhagem AV01 (*E. coli*) e a letra B, corresponde a linhagem AV14 (*E. aerogenes*).

Com o intuito de verificar se a redução da população de enterobactérias na peça de cerâmica ocorreu em função de um efeito biocida causado pela piocianina, difundida no meio, a densidade celular de AV01 e AV14 também foi quantificada na solução MWY (Fig. 10). Foi verificado que as linhagens se mantiveram viáveis ao longo das 240h, sugestivo de que, sob concentrações subinibitórias, o pigmento participa de algum mecanismo de inibição envolvendo os fatores de adesão.

**Fig. 9** – Número de células viáveis de enterobactérias no meio MWY (\* $p < 0.05$  )

A - corresponde ao número de células viáveis de enterobactérias no meio MWY para linhagem AV01 (*E. coli*) e a letra B corresponde a linhagem AV14 (*E. aerogenes*).

## 6 DISCUSSÃO

No ambiente, um dos principais papéis desempenhados pelas linhagens de *P. aeruginosa* inclui a utilização de certos compostos, naturais ou sintéticos, como fonte de carbono e energia (FERNANDES, 2014; PEIXOTO, 2008). Em meio aquoso e sob condições específicas de incubação tais como estresse nutricional, as quais incluem a utilização do meio Caldo P, a piocianina é sintetizada durante o final da fase logarítmica e o início da fase estacionária (FERNANDES, 2010). A literatura descreve que a produção *in vitro* do pigmento ocorre em 48h quando condições específicas de temperatura e agitação são oferecidas, i.e., 30°C e 150rpm (AGRAWAL et al., 2016). Além disso, o meio de cultura também influencia neste resultado. Em caldo mineral e GSNB, por exemplo, o pigmento foi observado difundido no meio, após 96h de incubação à 37°C (EL-FOULY et al., 2015). Embora o presente estudo tenha testemunhado a difusão do pigmento no meio a partir de 48h de incubação, as análises de determinação da concentração de biomassa e de piocianina aqui apresentadas, ocorreram em t=72h, uma vez que o intervalo anterior não foi possível quantificar.

A maior concentração de piocianina estimada foi obtida com a linhagem TGC03 (8,99±4,38 µg/mL) embora a TGC01 tenha obtido um valor próximo (8,02±0,01). Estudos anteriores de produção de piocianina determinaram quantidades do pigmento variando de 2,4 a 42,0 µg/mL (EL-FOULY et al., 2015; BARAKAT et al., 2015). As concentrações de piocianina detectadas por este estudo podem ser justificadas em função do tempo e faixa de temperatura empregados na incubação, 29±1°C. Possivelmente, caso o tempo de incubação fosse dilatado, maior quantidade de piocianina poderia ter sido produzida, como observado por Bakar et al. (2015), 42 µg/mL em 96h.

Os valores obtidos da produção de biomassa das linhagens PYO+ também foram semelhantes, possivelmente em razão da proximidade da concentração de piocianina produzida. A literatura preconiza que uma menor produção de biomassa é formada em função de maior produção de pigmento (WHOLLEY e McLOUGHLIN, 1982). Entretanto, dados relativos à biomassa de AV08 ou outras linhagens PYO+ não estão disponíveis nesta pesquisa para verificar esta afirmação.

Ressalta-se que o meio empregado no teste contém nutrientes que estimulam a síntese do pigmento, assim como incrementam o crescimento das linhagens de *P. aeruginosa* (FERNANDES, 2010; NORMAN et al., 2004). O caldo P possui em sua

constituição peptona e glicerol, responsáveis pelo estímulo da síntese de piocianina e produção de biomassa, respectivamente. Esta associação justifica o elevado percentual de correlação entre estas variáveis.

Das et al. (2015) em um estudo sobre produção de biossurfatantes, observaram que linhagens de *P. aeruginosa* cultivadas em caldo LB, cuja composição apresenta glicerol e peptona, quando confeccionado 3,5 vezes mais concentrado com peptona e metade da concentração de glicerol, em comparação com o meio original, refletiu de modo significativo no crescimento da biomassa, embora a redução da concentração do glicerol é observada, o meio de produção objetivava a síntese de biossurfatantes e possivelmente a biomassa foi aumentada a partir da concentração de outros nutrientes. Além disso, a peptona contém pequenos peptídeos e microelementos essenciais para síntese de pigmentos fluorescentes (DAS et al., 2015). Este fato sugere que a presença de peptona e glicerol promoveram aumento das duas variáveis. Ressalta-se ainda que a produção de piocianina se inicia no início da fase estacionária que é condicionada ao tempo de geração das linhagens (TAGMANINI e GONZÁLES, 1997), justificando a aparição da coloração azul-esverdeada entre 48 ou 72h após o início da incubação.

Não foi possível encontrar na literatura consultada, estudos que discutiram a correlação entre produção de pigmento e o valor da biomassa. É importante dizer que para identificar a significância desta correlação, o ideal seria ter obtido vários pontos da biomassa. Assim, seria possível melhor identificar se o valor de biomassa pode alterar a produção do pigmento no meio MWY.

Ecologicamente, a síntese do pigmento garante muitas vantagens à *P. aeruginosa* sendo a atividade antimicrobiana a propriedade mais investigada contra bactérias (JAYASEELAN; RAMASWAMY e SELVAKUMAR, 2014) e fungos (SUDHAKAR et al., 2013). O ambiente aquático é um meio caracterizado por uma grande relação de competitividade entre os organismos que coexistem entre si. Esta relação está associada ao fato dos nutrientes estarem diluídos, aliado às pressões seletivas de diferentes formas, exercidas pelo meio. Neste contexto, algumas linhagens podem se tornar mais prevalentes que outras, em razão de sua constituição metabólica, a exemplo de *P. aeruginosa*.

Hipoteticamente, as enterobactérias são mais sensíveis que outros bacilos aquáticos e seu reaparecimento depende de diferentes fatores que favoreçam a permanência no meio, especialmente, aqueles relacionados à adesão e colonização em superfícies (OLIVEIRA et al., 2015; VAN DER LAAN et al., 2014). Uma vantagem

das enterobactérias sobre *P. aeruginosa* em meio aquático diz respeito às diferenças no tempo de geração entre os dois micro-organismos. Enquanto as enterobactérias podem dobrar até três vezes dentro de uma hora, *P. aeruginosa* pode demandar em média de 3-6h para duplicar a população uma única vez (TAMAGNINI e GONZALES, 1997).

Os tempos de geração exibidos pelas enterobactérias utilizadas neste estudo foram significativamente diferentes do parâmetro descrito pela literatura (SEZONOV; JOSELEAU-PETIT e D'ARI, 2007; KEREN et al., 2004). Embora as linhagens AV01 e AV14 terem apresentado tempos de geração dilatados, os valores obtidos ainda assim foram inferiores aos determinados com as linhagens de *P. aeruginosa*, TGC01, TGC03 e AV08.

Diferente das condições de crescimento em meios de enriquecimento, períodos mais longos para que a população microbiana dobre em número podem ocorrer frequentemente quando condições semelhantes às aplicadas neste estudo são empregadas, isto é, o meio de cultivo apresenta baixos teores nutricionais. Nestes casos, as concentrações limitadas de carbono orgânico, promovem pressões e forçam a microbiota empregar outros artifícios metabólicos para se estabelecer e permanecerem viáveis, os quais incluem a síntese de exopolissacarídeos (JOSEPH et al., 2001; CAMPER et al., 1991). Neste contexto, ao se multiplicarem, alguns indivíduos podem superar as perturbações iniciais causadas pelas interações negativas entre dois micro-organismos distintos que coexistam e estejam em competição por nutrientes e espaço vital.

O amensalismo é um fenômeno ecológico comum que ocorre entre dois organismos competidores. Enquanto um deles produz substâncias de várias naturezas, tais como enzimas, ácidos orgânicos, toxinas e pigmentos, entre outros, o segundo tem o seu desenvolvimento prejudicado, seja por um efeito biocida, seja por um efeito bioestático (BLANCHARD e LU, 2015; CRAY et al., 2013). No ambiente aquático, vários fatores permitem a ocorrência do fenômeno, dentre elas: temperatura, pH, nível de nutrientes, presença de oxigênio e densidade da população microbiana. *P. aeruginosa* é uma bactéria reconhecidamente hábil em se desenvolver num ambiente aquático com baixos teores de matéria orgânica dissolvida (MACIEL-GUERRA, et al. 2006).

Acredita-se que a piocianina exerça papel fundamental nos fenômenos de antibiose por meio da geração de espécies reativas de oxigênio (EL-FOULY et al., 2015; O'MALLEY et al., 2003; MAVRODI et al., 2001). Neste contexto, sob certas condições, o potencial de sobrevivência de enterobactérias patogênicas organizadas em

biofilmes é mais limitado e dados da literatura reforçam que *P. aeruginosa* leva vantagem, por exemplo, sobre *E. coli* e *E. aerogenes* (VASCONCELOS et al., 2010; BANNING et al., 2003).

Todas as linhagens empregadas neste estudo, em alguns ensaios anteciparam a produção da piocianina entre 24-48h, possivelmente em razão dos baixos teores de carbono orgânico presentes no meio. Sob condições de carência nutricional, a produção do pigmento é favorecida para que a bactéria se torne mais bem-sucedida numa eventual competição com outros microrganismos presentes (PIERSON e PIERSON, 2010; JIMENEZ et al., 2012; DAS et al, 2013). Ressalta-se que foi utilizado um baixo teor de carbono para simular condições do possível acúmulo de matéria orgânica e neste cenário, *P. aeruginosa* teria maiores chances de sobrevivência, comparada a outros micro-organismos, incluindo membros da família *Enterobacteriaceae*.

Por outro lado, a disponibilidade de matéria orgânica se encontrava mais na solução MWY do que na peça de cerâmica. Sugere-se que dadas as condições estáticas do ensaio e uma possível sedimentação da matéria orgânica, ao longo do tempo explique o aumento da população de AV01 e AV14 na superfície das peças de cerâmica, quando a piocianina não estava presente.

Embora outros micro-organismos exibam relações de antagonismo frente enterobactérias, por exemplo, *Aeromonas hydrophila* e *Lactobacillus acidophilus*, *P. aeruginosa* ainda é considerada uma das espécies com participação mais significativa no fenômeno (MAVRODI et al., 2001), especialmente em função da piocianina (VASCONCELOS; LIMA e CALAZANS, 2010; GUILHERME e SILVA, 2000). Recentemente, Jayaseelan et al. (2014) e Martins et al. (2014b) observaram diferentes relações antagônicas envolvendo linhagens de *P. aeruginosa* em água, frente vários patógenos, tais como, *Salmonella paratyphi*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* e *Klebsiella pneumoniae*. Em cerca de 90-95% das observações foram correlacionadas à síntese de piocianina e/ou associada à presença de pioverdina, segundo pigmento mais importante sintetizado por *P. aeruginosa*.

O primeiro relato da atividade antibacteriana da piocianina ocorreu durante a II Guerra Mundial, em um estudo envolvendo a inibição do crescimento de *E. coli* (WAKSMAN e WOODRUFF, 1940). Até o final do século passado descobriu-se que o efeito biocida da piocianina é concentração-dependente (BARON e ROWE, 1981). Atualmente acredita-se que este fenômeno envolve diferentes mecanismos, de modo que *P. aeruginosa* é beneficiada, perturbando a estabilidade ou eliminando possíveis

competidores (PRICE-WHELAN et al, 2007). Nos últimos anos, teorizou-se que o provável mecanismo antimicrobiano da piocianina ocorre em nível da cadeia respiratória e perturbação do mecanismo de transporte ativo pela membrana. Além disso, acredita-se que o pigmento pode provocar diminuição do fornecimento de oxigênio para as células, acarretando o acúmulo de superóxido e peróxido de hidrogênio. Em complemento, a piocianina pode desviar o fluxo de elétrons, promovendo efeito tóxico às células afetadas (JAYASEELAN et al., 2014) e mesmo sob concentrações subinibitórias, importantes características de enterobactérias podem ser alteradas, tais como, cinética de crescimento, perfil bioquímico, mecanismos contra estresse oxidativo, motilidade e produção de biofilme (ANDRADE et al., 2016).

Os resultados deste estudo indiretamente alertam o risco para saúde humana que a presença de *P. aeruginosa* representa quando em coexistência com *E. coli* ou *E. aerogenes*, em meio aquoso. Estes patógenos são responsáveis por importantes distúrbios gastrointestinais e neste cenário, *P. aeruginosa* pode ser apontada como um possível indicador nas análises colimétricas da água para consumo humano. Mesmo que *P. aeruginosa* impeça a adesão de enterobactérias à superfícies, uma população subestimada exposta à condições que favoreçam seu crescimento, posteriormente podem se manter da matéria orgânica disponível no meio. No caso de linhagens mais resistentes aos efeitos inibitórios da presença de *P. aeruginosa* ou de seu pigmento, o risco é magnificado (LIN et al., 2010).

Por fim, é importante ressaltar que a versatilidade metabólica da *P. aeruginosa* vai além da síntese de piocianina, garantindo vantagem de crescimento com posterior predominância em cenários de competição, como pôde ser observado nos ensaios com a linhagem não produtora do pigmento. Embora observado a inibição da formação do biofilme, ressalta-se que a densidade celular no meio MWY era representativa e a redução da densidade microbiana na peça de cerâmica pode ilustrar um possível efeito específico sobre a adesão das células de enterobactérias por parte da *P. aeruginosa* durante o estabelecimento do biofilme, evento que carece de mais investigações para melhor compreensão dos fenômenos celulares e moleculares envolvidos.

## 7 CONCLUSÕES

Nas condições estabelecidas e avaliadas por este estudo, linhagens selvagens de *P. aeruginosa* produziram piocianina a partir de 48h de incubação, formando uma concentração de biomassa similar.

A piocianina produziu um efeito inibitório sobre as linhagens estudadas de enterobactérias, interferindo posteriormente na sua adesão à superfície de uma peça de cerâmica, mas não perturbou sua viabilidade em meio aquoso.

As diferenças observadas na densidade das bactérias coliformes no meio MWY e na superfície de cerâmica, na presença de piocianina foram sugestivas de que outros fatores espécie-específicos da *P. aeruginosa*, além do pigmento, atuam no fenômeno de antagonismo contra enterobactérias.

**REFERÊNCIAS**

- ABU, E. A.; SU, S.; SALLANS, L.; BOISSY, R. E.; GREATENS, A.; HEINEMAN, W. R.; HASSETT, D. J. Cyclic voltammetric, fluorescence and biological analysis of purified aeruginosin A, a secreted red pigment of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology*. v. 159, p. 1736-1747, 2013.
- AGRAWAL, A. H.; CHAUHAN, P. B. Effect of cultivation media components on pyocyanin productions and its application in antimicrobial property. *Int J Curr Adv Res*. v.5, p. 829-833, 2016.
- ALMSHAWIT, H.; MACREADIE, I.; FRANDO, D. A simple and inexpensive device for biofilm analysis. *J Microbiol Methods*. v. 98, n. 1, p. 59-63, 2014.
- ANDRADE, J.P.; DE MACEDO FARIAS, L.; FERREIRA, J.F.; BRUNA-ROMERO, O.; DA GLÓRIA DE SOUZA, D.; DE CAVALHO, M.A.; DOS SANTOS, KV. Sub-inhibitory concentration of piperacillin-tazobactam may be related to virulence properties of filamentous *Escherichia coli*. *Curr Microbiol*. v. 72, n. 1, p. 19-28, 2016.
- APHA, AWWA, WEF – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION, WATER ENVIRONMENT FEDERATION. Standard methods for the examination of water and wastewater. 22<sup>nd</sup>. ed. Baltimore: APHA, AWWA, WEF, 2012.
- ARRUDA, K.L.S. Resistência das *Pseudomonas* à ciprofloxacina e sua relação com a saúde ambiental. (Trabalho de Conclusão de Curso). Bacharelado em Engenharia Sanitária e Ambiental. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.
- BAHARI, S.; ZEIGHAMI, H.; MIRSHAHABI, H.; ROUDASHTI, S.; HAGHI, F. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* quórum sensing by subinhibitory concentrations of curcumin with gentamicin and azithromycin. *J Global Antimicrob Resist*. v. 10, n. 1, p. 21-28, 2017.
- BANNING, N.; TOZE, S.; MEE, B.J. Persistence of biofilm-associated *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* in groundwater and treated effluent in a laboratory model system. *Microbiology*. v. 149, n. 1, p. 47-55, 2003.
- BARAKAT, K.M.; MATTAR, M.Z.; SABAE, S.Z.; DARWESH O.M.; HASSAN, S.H. Production and characterization of bioactive pyocyanin pigment by marine *Pseudomonas aeruginosa* Osh1. *Res J Pharm Biol Chem Sci*. v.6, n.5, p. 933-943, 2015.
- BARON, S.S.; ROWE, J.J. Antibiotic Action of Pyocyanin. *Antimicrob Agent Chemother*, v. 20, n. 6, p. 814-820, 1981.
- BLANCHARD, A. E.; LU, T. Bacterial social interactions drive the emergence of differential spatial colony structures. *BMC Syst Biol*. v. 9, n. 59, p. 1-13, 2015.
- BARBOSA, D.B.; LAGE, M.M.; BADARÓ, A.C.L. Qualidade microbiológica da água dos bebedouros de um Campus universitário de Ipatinga, Minas Gerais. *NUTRIR GERAIS* – Revista Digital de Nutrição, Ipatinga, v. 3. n. 5. p. 505-517,. 2009.

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente. *Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA*. Resolução Nº357, de 17 de março de 2005

BRASIL. Ministério da Saúde. *Vigiágua*. Brasília, 2010.

BROCK. *Biology of microorganisms*, 9<sup>th</sup> ed. , New Jersey: Prentice hall 1045p, 2000.

CAMPER, A.K.; McFETERS, G.A.; CHARACKLIS, W.G.; JONES, W.L. Growth kinetics of coliform bacteria under conditions relevant to drinking water distribution systems. *Appl Environ Microbiol.* v. 57, n. 8, p. 2233-2239, 1991.

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

COELHO, D. L.; PIMENTEL, I. C.; BEUX, M. R. Uso do método cromogênico para quantificação do NMP de bactérias do grupo coliforme em águas minerais envasadas. *Bol. CPPA*, v.16, n.1, p.45-54, 1998.

COSTERTON, W.J.; WILSON, M. Introducing biofilms. *Biofilms*. v. 1, n. 1, p. 1-4, 2004.

CORREIA, A.M.G.G. Presença de bactérias coliformes e *Escherichia coli* resistentes aos antibióticos Ciprofloxacina e Estreptomomicina em água natural. (Dissertação). Mestrado em Engenharia Química. Universidade do Porto, Porto/Portugal, 2014.

CRAY, J.A.; BELL, A.N.W.; BHAGANNA, P.; MSWAKA, A.Y.; TIMSON, D.J.; HALLSWORTH, J.E. The biology of habitat dominance; can microbes behave as weeds? *Microb Biotechnol.* v. 6, n. 5, p. 453-492, 2013.

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

DAS, S.; DAS, P. Effects of cultivation media components on biosurfactant and pigment PAO1. *Braz J Chem Eng.* v. 32, n. 2, p. 317-324, 2015.

DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.M. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* V.15, n.2, p. 167-193, 2002.

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

EL-SHOUNY, W.A.; AL-BAIDANI, A.R.H.; HAMZA, W.T. Antimicrobial activity of pyocyanin produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from surgical wound-infections. *Int J Pharm Med Sci.* v. 1, n. 1, p. 01-07, 2011.

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

FERNANDES, A.C.L.B. Estudo de fatores de virulência e de estresse oxidativo na produção de biosurfactante do tipo ramnolipídeo por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. (Dissertação). Mestrado em Bioquímica. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

FERNANDES, A.F.T. Caracterização fenotípica e molecular de linhagens de *Pseudomonas* spp. envolvidas na biodegradação da atrazina. (Dissertação). Mestrado em Biociências aplicadas à Farmácia. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

FERRARO, A. P. S. Análises bacteriológicas em lavatórios e pias de salões de beleza. (Relatório final). Programa De Iniciação Científica e Tecnológica PIBIC/PIBITI/PIBIC-AF/PIVIC/PIVITI. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.

FOPPEN, J. W. A.; SHIJVEN, J. F. Evaluation of data from the literature on the transport and survival of *Escherichia coli* and thermotolerant coliforms in aquifers under saturated conditions. *Water Res.* v. 40, n. 3, p. 401-426, 2006.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. Microbiologia de alimentos. São Paulo: Atheneu, p.182, 1996.

FRANCO, B. D. G. M., LANDGRAF, M. Microbiologia dos Alimentos. São Paulo: Ateneu, 182p, 2008.

FUNASA – FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Manual prático de análise de água. 2ª ed. revisada. Brasília: Fundação Nacional de Saude, 2006.

GUILHERME, E.F.M.; SILVA, J.A.M. *Pseudomonas aeruginosa* como indicador de contaminação hídrica, *Rev Hig Alim.* v. 14, n. 76, p. 43-47, 2000.

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

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

JIMENEZ, P.N.; KOCH, G.; THOMPSON, J.A.; XAVIER, K.B.; COOL R.H.; QUAX, W.J. The Multiple Signaling Systems Regulating Virulence in *Pseudomonas aeruginosa*, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 76, n. 1, p 46-65, 2012.

JOSEPH, B.; OTTAS, S.K.; KARUNASAGAR, I; KARUNASAGAR, I. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *Int J Food Microbiol.* v. 64, n.3, p. 367-372, 2001.

KEREN, I.; KALDALU, N.; SPOERING, A.; WANG, Y.; LEWIS, K. Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiol Let.* v. 230, n. 1, p. 13-18, 2004.

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

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

LEISINGER, T.; MARGRAFF, R. Secondary metabolites of the fluorescent *Pseudomonads*. *Microbiol Rev.* v. 43, p. 422-442, 1979.

- LIN, D.; ZHOU, Q.; XIE, X.; LIU, Y. Potential biochemical and genetic toxicity of triclosan and emerging pollutant on earthworms (*Eisenia foetida*). *Chemosphere*. v. 81, n. 10, p. 1328-1333, 2010.
- MAIA, A.A.; CANTISANI, M.L.; ESPOSTO, E.M.; SILVA, W.C.P.; RODRIGUES, E.C.P.; RODRIGUES, D.P.; LÁZARO, N.S. Resistência antimicrobiana de *Pseudomonas aeruginosa* isolados de pescado e de cortes e de miúdos de frango. *Ciência Tec Alim.*, v. 29, p. 114-119, 2009.
- MACIEL-GUERRA, N.M.; OTENIO, M.H.; ZAMBERLAN-SILVA, M.E.; GUILHERMETTI, M.; VATARU-NAKAMURA, C.; UEDA-NAKAMURA, T.; PRADO DIAS FILHO, B. Ocorrência de *Pseudomonas aeruginosa* em água potável. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*. v. 28, n. 1, p. 13-18, 2006.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D.P. Microbiologia de Brock. Traduzido de Brock Biology of Microorganisms. 12ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- MARTINS, V.V.; GADELLA, D.G.; MACARENCO, A.C.S.; STEHLING, E.G. Investigação do antagonismo entre linhagens clínicas e ambientais de *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Congresso Latinoamericano de Microbiologia, 21., 2012, Santos. Anais ALAM. São Paulo: ALAM, v. 1. p. 1399-1, 2012.
- MARTINS, M.R.; ARANTES, S.; CANDEIAS, F.; TINOCO, M.T. CRUZ-MORAIS, J. Antioxidant, antimicrobial and toxicological properties of *Schinus molle* L. essential oils. *J Ethnopharmacol*. v. 151, n. 1, p. 485-492, 2014a
- MARTINS, V.V.; MACARENO, A.C.; GRADELLA, D.G.; STEHLING, E.G. Antagonism between clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa* against coliforms. *Wat Sci Technol: Wat Suppy*. v. 14, n. 1, p. 99-106, 2014b.
- MANCHESTER, R. S. A. S.; RODRIGUES, J. L.; BOMFETI, C. A. Determinação da qualidade da água de Minas na área urbana do município de Teófilo Otoni-MG-Brasil. *Revista Vozes do vale – UFVJM*, n. 3, 2013
- MAVRODI, D. V. ; BONSTALL, R. ; DELANEY, S. M. ; SOULE, M. J. ; PHILLIPS G.; THOMASHOW, L. S. Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PA01. *J Bacteriol*. v. 183, p. 6454-6465, 2001.
- MULLER, M.; MERRETT, N. D. Pyocyanin production by *Pseudomonas aeruginosa* confers resistance to ionic silver. *Antimicrob Agent Chemother*. v. 58, p. 5492-5499, 2014.
- NORMAN, R. S., MOELLER, P., MCDONALD, T. J., MORRIS, P. J., Effect of pyocyanin on a crude-oil-degrading microbial community. *Applied and Environmental Microbiology*, v.70, p.4004-4011, 2004.
- NOWROOZI, J.; SEPAHI, A. A.; RASHMONEJAD, A. Pyocyanine biosynthetic genes in clinical and environment isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and detection of pyocyanine's antimicrobial effects with and without colloidal silver nanoparticles. *Cell J*. v. 14, n. 1, p. 7-18, 2012.

- O'MALLEY, Y.Q.; ABDALLA, M.Y.; McCORMICK, M.L.; RESZKA, K.J.; DENNING, G. M.; BRITIGAN, B.E. Subcellular localization of *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin cytotoxicity in human lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Molec Physiol*. v. 284, n. 2, p. L-420-L430, 2003.
- OLIVIEIRA, N.M; MARTINEZ-GARCIA, E.; XAVIER, J.; DURHAM, W.M.; KOLTER, R.; KIM, W.; FOSTER, K.R. Biofilm formation as a response to ecological competition. *PLOS Biology*. v. 13, n. 8, e1002232. doi 10.1371/journal.pbio.1002191. pmid: 26158271, 2015.
- OLSSON, L.; NIELSEN, J. On Line and in situ monitoring of biomass in submerged cultivations. *Trends in Biotech*. v. 15, p. 517-522, 1997.
- OZYUREK, S. B.; GUR, S. D.; BILKAY, I. S. Production of pyocyanin pigment from *Pseudomonas aeruginosa* strains and investigation of the antimicrobial effect of pyocyanin on other microorganisms. *Curr Opin Biotechnol*. v. 22S, n. 1, p. S113, 2011.
- PALUDO, D. Qualidade da água nos poços artesianos do município de Santa Clara do Sul. (Trabalho de Conclusão de Curso). Bacharelado em Química Industrial. Centro Universitário Univates, Lajeado, 2010.
- PEELER, J.T.; HOUGHTBY, G.A.; RAINOSEK, A.P. The most probable number technique, 3<sup>th</sup> ed, Washington: American Public Health Association 1005-120p, 1992.
- PEIXOTO, R.M. Bioprospecção de micro-organismos do gênero *Pseudomonas* produtores de biossurfactantes. (Dissertação). Mestrado em Ciências Morfofuncionais. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- PIERSON, L.; PIERSON, E. Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes. *Appl Microbiol Biotechnol*. v. 86, n.6, p. 1659–1670, 2010.
- PIRNAY, J.P., MATTHIJS, S., COLAK, H., CHABLAIN, P., BILOCQ, F., VAN ELDERE, J., DE VOS, D., ZIZI, M., TRIEST, L., CORNELIS, P. Global *Pseudomonas aeruginosa* biodiversity as reflected in a Belgian river. *Environ Microbiol*. v. 7, p. 969-980, 2005.
- PRICE-WHELAN, A.; DIETRICH, L. E.; NEWMAN, D.K. Rethinking 'secondary' metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics. *Natural Chemical Biology*, v.2. p.71-78, 2006.
- \_\_\_\_\_. Pyocyanin alters redox homeostasis and carbon flux through central metabolic pathways in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *The Journal of Bacteriology*, v.189. p.6372-6381, 2007.
- SALDANHA, J. T. Emprego de nanopartículas em estratégias de prevenção e tratamento de infecções relacionadas à formação de biofilmes bacterianos. (Trabalho de Conclusão de Curso). Bacharelado em Farmácia. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.
- SCHOENTAL, R. The nature of the antibacterial agents present in *Pseudomonas pyocyanea* cultures. *Br J Exp Pathol*. v. 22, p. 137-147, 1941.

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

SEZONOV, G.; JOSELEAU-PETIT, D.; DARI, R. *Escherichia coli* physiology in Lauria-Bertani broth. *J Bacteriol.* v. 189, n. 23, p. 8746-8749, 2007

SHORTER BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY, 9th ed., Maryland: Williams & Wilkins, 1994.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D.G.; COSTERTON, J.W. Biofilm as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol.* V.56, p.187-209, 2002.

SUDHAKAR, T.; KARPAGAM, S.; SHIYAMA, S. Antifungal efficacy of pyocyanin produced from bioindicators of nosocomial hazards. *Int J ChemTech.* v. 5, p. 1101–1106, 2013.

TAMAGNINI, L. M.; GONZALES, R. D. Bacteriological stability and growth kinetics of *Pseudomonas aeruginosa* in bottled water. *J Appl Microbiol.* v. 83, n.1, p. 91-94, 1997.

TAIT K.; SUTHERLAND, I. W. Antagonistic interactions amongst bacteriocin-producing enteric bacteria in dual species biofilms. *J Appl Microbiol.* v. 93, n. 2, p. 345-352, 2002.

VAN DER LAAN, H.; HALEM, D.; SMEETS, P.W.M.H.; SOPPE, A.I.A.; KROESBERGEN, J.; WUBBELS, G.; NEDERSTIGT, J.; GENSBURGER, I.; HEIJMAN, S.G.J. Bacteria and virus removal effectiveness of ceramic pot filters with different silver applications in a long term experiment. *Wat Res.* v. 51, n. 1, p. 47-54, 2014.

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

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

WHOOLEY, M. A.; McLOUGHLIN, A. J. The regulation of pyocyanin production in *Pseudomonas aeruginosa*. v. 15, n. 3, p 161-166, 1982.

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

---

## APÊNDICE A – PRODUÇÃO GERADA POR ESTA PESQUISA

### Artigo publicado em periódico

- ❖ **Viana, A.A.G.;** Martins, R.X.; Ferreira, G.F.; Zenaide Neto, H.; Amaral, I.P.G.; Vasconcelos, U. *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, part II, p. 23-30, 2017.

### Resumo publicado em anais de reuniões científicas

- ❖ **VIANA, A.A.G.;** XAVIER, R.; FERREIRA, G.F.; AMARAL, I.P.G.; VASCONCELOS, U. Identification of non-fermenting gram-negative bacilli in cosmetics. Congresso Brasileiro de Microbiologia, 29. 2017. Foz do Iguaçu. *Resumos.* Rio de Janeiro: SBM, 2017.

### Apresentação de trabalhos (PIBIC)

- ❖ **VIANA, A. A. G.;** VASCONCELOS, U. Papel da *Pseudomonas aeruginosa* na densidade de coliformes em velas de cerâmica. Encontro de Iniciação Científica da Universidade Federal da Paraíba, 24. 2016. João Pessoa. *Apresentação de pôster.*
- ❖ **VIANA, A. A. G.;** SOUZA, A. F.; VASCONCELOS, U. Inibição do desenvolvimento de biofilme de *Escherichia coli* por *Pseudomonas aeruginosa* RX08. Simpósio de Limnologia do Semiárido, 1. 2016. Areia. *Apresentação de pôster.*