



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

JUAN CARLOS BEDOYA PÉREZ

**PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS
DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* CEPA LV:
OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTURA ATRAVÉS DA
METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA**

JUAN CARLOS BEDOYA PÉREZ

**PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS
DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* CEPA LV:
OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTURA ATRAVÉS DA
METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Galdino Andrade Filho

Co-Orientador: Prof. Dr. Admilton Gonçalves
de Oliveira Junior

Londrina - PR
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Bedoya Perez, Juan Carlos.

Produção de metabólitos secundários de *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV :
Otimização das condições de cultura através da metodologia de superfície de resposta.
/ Juan Carlos Bedoya Perez. - Londrina, 2017.
91 f.

Orientador: Galdino Andrade.

Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2017.
Inclui bibliografia.

1. Metabólitos. Otimização. Bioprocessos. Cromatografia - Tese. I. Andrade, Galdino . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

JUAN CARLOS BEDOYA PÉREZ

PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *PSEUDOMONAS*
***AERUGINOSA* CEPA LV:**
OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTURA ATRAVÉS DA
METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Galdino Andrade Filho
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Renato Márcio Ribeiro Viana
Universidade Tecnológica Federal do Paraná -
UFTPr

Profa. Dra. Maria Antonia Pedrine Colabone
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Marcelo Rodrigues de Melo
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Ieda Spacino Scarminio
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 25 de agosto de 2017.

**A mis padres por todo su esfuerzo, apoyo y
dedicación. Es a ellos que debo todo!**

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia por me permitir realizar os estudos de doutorado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Galdino Andrade, por ter mantido sempre as portas abertas. Muito obrigado pela confiança, ajuda e direcionamento.

À minha família, por me apoiar sempre.

Aos meus amigos Ane e Miguel pela ajuda permanente e paciência. Eu vou lembrar sempre de vocês.

A todo o pessoal do Laboratorio de Ecologia Microbiana pela amizade, companhia e boa disposição.

BEDOYA-PÉREZ, Juan Carlos. **Produção de metabólitos secundários de *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV**: otimização das condições de cultura através da metodologia de superfície de resposta. 2017. 91 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

Pseudomonas aeruginosa cepa LV produz em seu metabolismo secundário fenazina-1-ácido carboxílico (PCA), fenazina-1-carboxiamida (PCN), 2-carboxi-2-heptano-indol-3-ona (IDC) e um composto antibiótico organometálico (OAC), que demonstrou ter atividade antimicrobiana (PCA e OAC) e efeito elicitor que estimula a indução de resistência adquirida (SAR) em plantas (PCN e IDC). Estes metabólitos possuem um alto potencial para serem usados nos mais diferentes setores biotecnológicos. Porém os rendimentos são baixos e são necessários estudos para otimizar os processos de produção tornando menos custosos e mais produtivos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi aumentar a concentração final desses metabólitos através da otimização das condições de cultura analisadas pela metodologia de superfície de resposta (MSR). Primeiramente, fatores experimentais únicos foram utilizados para avaliar os efeitos tanto do tamanho do inoculo quanto dos três componentes utilizados no meio de cultivo (peptona, extrato de carne e $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) na produção final dos metabólitos. Em seguida, o nível ótimo das variáveis foi determinado pela MSR utilizando o planejamento de Box-Behnken. Nesta etapa, as maiores concentrações de IDC, PCA, PCN e OAC representaram um aumento, em porcentagem, de 269, 602, 5286 e 84, respectivamente, em comparação com o meio de cultura básico (MCB). Posteriormente, a concentração inibitória mínima (CIM) de OAC contra a cepa LV foi estimada em $15 \mu\text{g mL}^{-1}$, indicando que a concentração obtida ($11,11 \pm 1,05 \text{ mg L}^{-1}$) era provavelmente a máxima possível. Em uma segunda etapa, foi utilizada uma abordagem estatística de quatro passos para avaliar o efeito de nove componentes diferentes de meio de cultura (peptona, extrato de carne, proteína de soja, extrato de levedura, glicose, etanol, solução salina, KH_2PO_4 e triptofano) e dois parâmetros físicos (temperatura e pH inicial), sobre os rendimentos de IDC, PCA e PCN. Dois planejamentos fatoriais sucessivos foram aplicados para investigar os fatores que afetam a produção dos metabólitos de interesse. Após essa análise, a proteína de soja, a glicose, o extrato de levedura e o KH_2PO_4 foram otimizados por MSR usando um delineamento composto central (CCD). Além disso, um dos meios otimizados foi utilizado para determinar as condições adequadas de temperatura e pH inicial empregando um delineamento fatorial completo de três níveis. Estabelecidas as condições ótimas, as concentrações máximas registradas de IDC, PCA e PCN foram 15,61, 112,89 e 177,31 mg L^{-1} , respectivamente. Em conclusão, em condições otimizadas, a produção de IDC, PCA e PCN aumentaram em 42, 38 e 250 vezes, respectivamente, em relação ao sistema de produção. Portanto, essas novas condições de produção devem ser implementadas.

Palavras chaves: *Pseudomonas*. Metabólitos. Otimização. Bioprocessos. Cromatografia

BEDOYA-PÉREZ, Juan Carlos. **Production of secondary metabolites by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain: optimization of culture conditions by response surface methodology.** 2017. 91 pp. Thesis (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

On the secondary metabolism of *Pseudomonas aeruginosa* LV strain were determined four compounds such as phenazine-1-carboxylic acid (PCA), phenazine-1-carboxamide (PCN), 2-carboxi-2-heptano-indol-3-ona (IDC) and an organometallic antibiotic compound (OAC), and two showed antimicrobial activity (PCA and OAC) and as elicitor on induction of acquired resistance (SAR) in plants (PCN and IDC). Thus, these metabolites have a high potential to be implemented in the most different biotechnological sectors. However, the current concentrations are low and new studies are required to increase the production with low cost and more productivity. The objective of this work was to increase the final concentration of these metabolites through the optimization of culture conditions analyzing by the response surface methodology (RSM). First at all, unique experimental factors were used to evaluate the effects of the compounds used in the culture media (peptone, meat extract and $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) and the inoculum size on the final production of the metabolites. After that, the inoculum concentration was set at 1% (v/v) and the levels of variables were determined by RSM using the Box-Behnken design. At this stage, the highest concentration of IDC, PCA, PCN and OAC increased (%) 269, 602, 5286 and 84, respectively, when compared with the basic culture medium (BCM). The second step, a four-step statistical approach was used to evaluate the effect of nine different components of culture medium (peptone, meat extract, soy protein, yeast extract, glucose, ethanol, saline, KH_2PO_4 and tryptophan) and two physical parameters (temperature and initial pH), in the concentrations of IDC, PCA and PCN. Two successive factorial designs were applied to investigate who factors affect the four metabolites production. Four components of the culture medium (soybean protein, glucose, yeast extract and KH_2PO_4) significantly influenced the IDC, PCA and PCN production and were optimized by RSM using a central composite design (CCD). One of optimized media was used to determine the appropriate initial temperature and pH conditions using a three-level complete factorial design. Once the optimal conditions were established, the maximum recorded concentrations of IDC, PCA and PCN were 15.61, 112.89 and 177.31 mg L^{-1} , respectively. In conclusion, under optimized conditions to produce IDC, PCA and PCN increased by 42, 38 and 250 times, respectively, when compared with the initial production system.

Keywords: *Pseudomonas*. Metabolites. Optimization. Bioprocess. Chromatography.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Derivados de fenatos de ocorrência natural selecionados	23
Figura 2 – Núcleo biossíntese de fenazina	25
 ARTIGO	
Figura 1 – HPLC chromatogram of a 10 µL aliquot sample	52
Figura 2 – Fermentation profiles in current production system	60
Figura 3 – Effect of inoculum size, CuCl ₂ .2H ₂ O, peptone, and meat extract concentrations on IDC, OAC, PCA and PCN production.....	61
Figura 4 – Response surface plot (3D) showing the effects of two studied independent variables	64
Figura 5 – Validation of the experimental design	66
Figura 6 – Fermentation profiles	67
Figura 7 – Pareto charts representing the estimated effects of the independent variables on the final concentrations of the responses	71
Figura 8 – Correlation between actual values and values predicted by the.....	76
Figura 9 – Variables in each 2D representation were coded and positioned at the optimum values of the others	77
Figura 10 – Validation of the experimental design	79
Figura 11 – Effect of temperature and initial pH on the final concentration of IDC, PCA and PCN	80
Figura 12 – Fermentation profiles	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características gerais de alguns genomas completos de <i>Pseudomonas</i>	20
Tabela 2 – Exemplos de microrganismos produtores de fenazinas	22

ARTIGO

Tabela 1 – Coded and real levels in Plackett – Burman design – first screening... ..	56
Tabela 2 – Coded and real levels in Plackett – Burman design – second screening.....	58
Tabela 3 – Coded levels and actual values of the independent variables	59
Tabela 4 – Box-Behnken design (BBD)	63
Tabela 5 – IDC, OAC, PCA and PCN concentrations in two current production systems and four optimized production protocols obtained in the present study	65
Tabela 6 – MIC values of OAC against LV strain at different pH.	68
Tabela 7 – Plackett-Burman design: first screening	70
Tabela 8 – Plackett-Burman design: second screening.....	73
Tabela 9 – Central Composite Design (CCD) matrix	75
Tabela 10 – IDC, PCA and PCN concentrations in current production system and optimized production protocols obtained in the present study.....	81

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	PRODUÇÃO DE COMPOSTOS NATURAIS DE ORIGEM BACTERIANA	14
2.1.1	Produção baseada em fermentação.....	14
2.2	PLANEJAMENTO E OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTURA.....	16
2.2.1	Metodologia de Superfície de Resposta	17
2.3	O GÊNERO <i>Pseudomonas</i>	18
2.3.1	Flexibilidade Genômica do Gênero <i>Pseudomonas</i>	19
2.3.2	<i>Pseudomonas</i> : Produção de Substâncias Bioativas	21
2.3.2.1	Fenazinas: Metabólitos Secundários Importantes Produzidos por Espécies de <i>Pseudomonas</i>	22
2.3.2.1.1	Produção de Fenazinas	26
2.4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27
2.4.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> : genoma acessório e adaptabilidade	28
2.4.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> : diversidade metabólica.....	29
2.5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CEPA LV	31
	REFERÊNCIAS	34
3	OBJETIVOS	47
3.1	Objetivo Geral	47
3.2	Objetivos Específicos	47
4	ARTIGO – ENHANCED PRODUCTION OF TARGET BIOACTIVE METABOLITES BY <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LV STRAIN	48

1 INTRODUÇÃO

Produtos biodegradáveis e eco-amigáveis são tendências no consumo e políticas governamentais em todo mundo, em conjunto com a seleção de microrganismos multirresistentes, a descoberta e o desenvolvimento de novos antimicrobianos de origem natural são essenciais. Conseqüentemente, a demanda por produtos naturais está aumentando, e sua produção é agora um campo emergente de pesquisa e oportunidades de negócios. Em particular, os microrganismos (bactérias, actinobactérias, cianobactérias, micobactérias e fungos) representam uma das fontes mais prolíficas para a produção de compostos naturais com atividade biológica e características químicas que não existem nas bibliotecas de triagem de compostos sintéticos. Portanto, os microorganismos foram e continuarão a ser uma das fontes mais importantes de novos metabólitos secundários de interesse para diferentes indústrias, para produtos farmacêuticos, cosméticos, químicos, nutricionais e agrícolas.

Embora a identificação de cepas e compostos ativos potencialmente úteis seja decisiva, o aumento da produtividade dos biocompostos é talvez o desafio mais importante a ser resolvido tanto para fins comerciais como de pesquisa. Neste contexto, podem ser implementadas várias estratégias, como a síntese química, a manipulação genética e o aprimoramento da produção baseada em fermentação. No entanto, a complexidade estrutural dos compostos e a falta de compreensão dos mecanismos de regulação celular podem tornar os processos de síntese química e manipulação genética muito caros ou inviáveis. A otimização do meio de cultura adequado para cada cepa bacteriana, bem como a determinação de condições de fermentação adequadas poderiam ser estratégias-chave para a produção de metabólitos em quantidades suficientes. Além disso, é um estágio essencial no desenvolvimento de experiências de escala de laboratório bem-sucedidas, cujos resultados poderiam ser posteriormente aplicados em processos de escala piloto e, finalmente, em produção industrial.

Entre os microrganismos, o gênero *Pseudomonas* é de grande interesse pela produção e obtenção de novos produtos químicos e farmacêuticos. As *Pseudomonas* sp. desenvolveram um amplo espectro de características ecológicas, metabólicas e bioquímicas, permitindo-lhes adaptar a diversos ambientes e fatores de estresse através da regulação da expressão de diferentes conjuntos de genes em diversas situações. Entre os membros desse gênero, a espécie *P. aeruginosa* tem uma capacidade de sobrevivência surpreendente em nichos ecológicos muito diversos, ou seja, uma cepa *P. aeruginosa* isolada de uma condição ambiental específica pode expressar genes biossintéticos efetivos que não estão presentes em

outros isolados. Assim, as cepas de *P. aeruginosa* isoladas de diferentes ambientes, que estão sujeitas a condições de estresse específicas, podem representar espécies potencialmente úteis para processos biotecnológicos, como a produção de novos compostos e limpeza ambiental.

Estudos realizados no Laboratório de Ecologia Microbiana (LEM) demonstraram que *P. aeruginosa* cepa LV produz metabólitos com potencial para o controle biológico tanto de fitopatógenos quanto de contaminação bacteriana no processo de produção de álcool combustível, bem como atividade antimicrobiana contra isolados clínicos multirresistentes. Além disso, no LEM vários estudos estão sendo realizados usando extratos microbianos produzidos pela cepa LV que visam avaliar a indução de resistência em plantas em condições de estufa e campo, e o controle de biofilme na produção de álcool combustível. O rendimento de cada composto de interesse (IDC, PCA, PCN e OAC) é muito baixo no sistema de produção, o que dificulta a obtenção para realizar os estudos, sendo necessário um novo processo de produção menos oneroso e com maior produtividade. Portanto, este trabalho foi realizado com o objetivo de aumentar a produção de quatro metabólitos secundários (IDC, PCA, PCN e OAC) com atividade de interesse biotecnológica produzidos pela *P. aeruginosa* cepa LV.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PRODUÇÃO DE COMPOSTOS NATURAIS DE ORIGEM BACTERIANA

Entre os organismos vivos, os microrganismos (bactérias, actinobactérias, cianobactérias, micobacterias e fungos) representam uma das fontes mais prolíficas para a produção de metabólitos com atividades biológicas e características químicas que não existem nas bibliotecas de triagem de compostos sintéticos (Fedorenko et al., 2015). Antimicrobianos, toxinas, transportadores de metais, hormônios sexuais, pigmentos, antitumorais, pesticidas, imunomoduladores, agentes de redução do colesterol e imunossupressores são alguns exemplos de metabólitos secundários produzidos por bactérias, que são de interesse para diferentes indústrias, como a farmacêutica, cosmética, química, nutricional e agrícola (Gokulan et al., 2014). Além disso, alguns produtos naturais são utilizados como materiais de partida em processos de síntese para produzir novos compostos semi-sintéticos.

Tendências no consumo e políticas governamentais em todo o mundo direcionam para produtos mais eco-amigáveis e biodegradáveis. Além disso, a seleção de cepas resistentes aos medicamentos é um grande fator para busca e desenvolvimento de novos compostos antimicrobianos (Venil et al., 2013). Conseqüentemente, a demanda por produtos naturais está aumentando e sua produção é agora um campo emergente de pesquisa e de oportunidades de negócios. No entanto, muitos problemas devem ser resolvidos antes de se tornar economicamente viável a fabricação de compostos bioativos. Apesar do fato de que alguns produtos naturais também podem ser sintetizados quimicamente, sua diversidade e complexidade estrutural podem tornar o procedimento muito caro (Lam, 2007). Na verdade, a maioria deles são complexos e contém vários centros de assimetria que dificultam a produção comercial através de reações químicas. Assim, a produção baseada em fermentação microbiana continua sendo a única maneira de obter muitos compostos bioativos (Fedorenko et al., 2015).

2.1.1 Produção Baseada na Fermentação

A produção de metabólitos secundários através da fermentação submersa tem algumas limitações. Em primeiro lugar, a biossíntese dos metabólitos secundários possui rendimentos muito baixos, o que dificulta a sua aplicação em nível industrial. Isso se deve ao fato de que o sucesso dos processos biotecnológicos é determinado pelo custo do

processamento, que por sua vez é fortemente dependente da concentração final do produto (Woodley et al., 2013). Em segundo lugar, as propriedades finais do produto dependem de vários fatores, tais como, tensão bacteriana, meios de cultura e condições de fermentação. Assim, o processo de produção é mais difícil de controlar em comparação com a síntese química e o produto bruto é menos previsível na composição, bem como seu perfil de impurezas (Brink et al., 2013). Em terceiro lugar, os compostos de interesse estão frequentemente presentes como conjugados ou em misturas complexas de extratos (Lam, 2007). Embora tenham sido desenvolvidos diferentes métodos para otimizar o isolamento destes compostos em formas relativamente puras e concentradas, a recuperação destas espécies moleculares de produto diluído requer procedimentos de purificação geralmente difíceis e dispendiosos (Gil-Chávez et al., 2013).

Para superar esses problemas, os avanços recentes na engenharia metabólica e da biologia sintética de bactérias são desenvolvidos para melhorar as cepas produtoras e redirecionar os fluxos metabólicos para os compostos desejados (Julleson et al., 2015). Quando os genes envolvidos na síntese de um composto específico são conhecidos, várias estratégias, tais como, a interrupção do gene (*knockout* de genes) e a super-expressão podem ser implementadas para aumentar a produção de metabólitos. Além disso, quando a sobre-expressão é difícil na estirpe selvagem, a sobre-expressão heteróloga também pode ser utilizada. Por outro lado, se os genes envolvidos são desconhecidos, o método tradicional de "mutação aleatória e rastreio", bem como ferramentas de bioinformática podem ser utilizados (Tamano, 2014). A maioria dessas tecnologias depende da compreensão dos mecanismos reguladores das células, além de interações complexas entre caminhos metabólicos, a fim de identificar alvos para manipulação e prever os níveis ótimos de expressão gênica (Ren et al., 2017). No entanto, estas informações são pouco conhecidas e o desenvolvimento de novas células para aplicações industriais são limitadas. Para otimização destes processos são necessárias várias rodadas de ciclo de "*design-build-test*" o que normalmente requer aproximadamente de 6-8 anos e mais de 50 milhões de dólares para otimizar o sistema (Nielsen e Keasling, 2016).

Devido a essas limitações, a produção de metabólitos bioativos mais valiosos ainda está em fase de pesquisa e desenvolvimento. Mesmo assim, as cepas microbianas foram e continuarão a ser uma das fontes mais importantes de descoberta e desenvolvimento de novos metabólitos secundários (Salazar e Gormley, 2017). Por conseguinte, são necessárias mais estudos de prospecção biológica para isolar, purificar e identificar novos compostos bioativos e cepas mais adequadas para a produção de compostos

específicos conhecidos. Com o objetivo de aumentar a produtividade dos bioprocessos, como mencionado acima, talvez seja o desafio mais importante a ser resolvido não só como comerciais, mas também para fins de pesquisa, várias estratégias, que não envolvem manipulação genética ou ferramentas de triagem de alto rendimento, podem ser implementadas tais como: (i) planejamento e otimização de meios de cultura; (ii) aplicação de diferentes estratégias de cultura celular (isto é, batelada, batelada alimentada) e (iii) melhoria das estratégias de monitoramento e controle (Liste-Calleja et al., 2014). No futuro, através de novos avanços na manipulação genética e na biotecnologia industrial, essas cepas poderiam ser desenvolvidas e adaptadas para produção comercial (Krause e Tobin, 2013).

2.2 PLANEJAMENTO E OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTURA

Como é de conhecimento, os microrganismos são encontrados em uma ampla variedade de habitats e condições, e os fatores químicos múltiplos (carbono, nitrogênio, vitaminas, minerais, sais e oxigênio) e físico-químicos (temperatura e pH) afetam o crescimento e reprodução. De fato, a disponibilidade de nutrientes pode desencadear vários mecanismos específicos de competição microbiana, como produção de toxinas, competição espacial, predação e crescimento rápido (Hibbing et al., 2010). Do mesmo modo, o crescimento microbiano e a produção de muitos metabólitos secundários (por exemplo, sideróforos, antimicrobianos e moléculas de sinalização) são claramente influenciados por requisitos nutricionais e condições ambientais, que, por sua vez, variam de espécie para espécie (Hibbing et al., 2010). A otimização de meios de cultura adequados para cada estirpe bacteriana, bem como a determinação de condições de fermentação adequadas são estratégias-chave para a produção de metabólitos em quantidades maiores (Arora et al., 2017). Assim, a otimização das condições de cultura é um estágio essencial no desenvolvimento de experimentos de escala de laboratório bem sucedidos, cujos resultados poderiam ser posteriormente aplicados em processos de escala piloto e, finalmente, em produção industrial (Stanbury et al., 2017).

Métodos convencionais e estatísticos podem ser aplicados para avaliar os efeitos sobre a produtividade de metabólitos durante a manipulação de variáveis da fermentação. O método convencional, como a estratégia OFAT (One-Factor-at-a-Time), que muda apenas um parâmetro enquanto mantém outros em um nível constante, é frequentemente usado para pesquisar fontes adequadas de carbono e nitrogênio. Sua principal desvantagem é que as interações entre fatores, que podem influenciar fortemente o

bioprocesso, não são estimadas nesses estudos. Além disso, nos experimentos OFAT é necessário um elevado número de corridas para realizar a avaliação, o que implica em grande quantidade de esforço, tempo e recursos, aumentando os custos (Czitrom, 1999). Os planejamentos experimentais estatísticos levam em consideração fatores que variam simultaneamente, usando um maior número de informações para encontrar soluções ótimas quando comparadas com experimentos de OFAT. Além disso, é preciso um número reduzido de corridas experimentais, sendo não apenas mais eficientes e precisos, mas também mais baratos. Portanto, os métodos estatísticos são a maneira mais eficaz de determinar o impacto de dois ou mais fatores em uma variável de resposta (Bezerra et al., 2008).

2.2.1 Metodologia de Superfície de Resposta

A Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) é uma poderosa técnica estatística multivariada para desenvolver, otimizar e melhorar o desempenho de sistemas, produtos e processos. É altamente útil na modelagem e análise de experimentos em que uma variável de interesse é influenciada por muitos fatores que variam simultaneamente (Khuri e Mukhopadhyay, 2010). Na otimização de processos, experimentos iniciais de triagem são realizados através de planejamentos de primeira ordem (planejamentos fatoriais de dois níveis, Plackett-Burman e Simplex) com o objetivo de determinar quais dos vários fatores experimentais apresentam efeitos mais significativos na resposta alvo. Já planejamentos de segunda ordem (por exemplo, planejamentos fatoriais de três níveis, Composto Central, Box-Behnken e Doehlert) são realizados para determinar os pontos ótimos para a amostra dentro do espaço analisado. Posteriormente, a aptidão do modelo é avaliada, bem como a necessidade e a possibilidade de realizar um deslocamento em direção à região ideal. Finalmente, a validação do modelo deve ser realizada (Bezerra et al., 2008).

Conforme mencionado acima, em experimentos de triagem vários fatores devem ser alterados ao mesmo tempo, o que permite avaliar se um aumento no valor do fator é vantajoso ou não na resposta experimental. Os planejamentos fatoriais de dois níveis completos são adequados nesta fase, mas estes requerem um grande número de tratamentos quando é necessário avaliar mais de quatro variáveis. Nesse caso, planejamentos fatoriais fracionados de dois níveis, bem como, desenhos Plackett-Burman (PBD) podem ser implementados (Plackett e Burman, 1946). Tais modelos permitem a triagem de grande número de fatores com menos experiências. No entanto, o PBD requer o menor número de corridas experimentais possíveis e, portanto, é mais econômico (Khuri e Mukhopadhyay,

2010). Embora ignorando as interações entre as variáveis, é uma ferramenta simples, mas eficaz para avaliar um grande número de variáveis, permitindo um melhor trabalho de otimização. O PBD foi usado com sucesso para avaliar vários fatores pre-determinados em processos relacionados com a produção de compostos naturais, tais como: rastreio de componentes médios para melhorar não apenas a biomassa (Angeli et al., 2017), mas também a biossíntese de enzimas (Vasiee et al., 2016) e metabólitos (El-Sheekh et al., 2016), avaliando melhores condições de produção em processos de fermentação (Agarabi et al., 2015); e melhorando a eficiência de extração (Siriano, et al., 2016), bem como desempenho de separação cromatográfica (Sahu et al., 2017).

Na fase de superfície de resposta, uma região que se acredita conter a localização da resposta ótima deve ser conhecida. Assim, uma vez que os fatores que influenciam fortemente o bioprocessos são conhecidos, eles são priorizados e otimizados através de modelos de primeiro ou segundo grau. Estudos experimentais de superfícies de resposta quadrática, como o fatorial completo de três níveis, assim como os planejamentos Composto Central (CCD) e Box-Behnken (BBD) são os mais usados (Bezerra et al., 2008; Khuri e Mukhopadhyay, 2010). Aqui novamente, o planejamento fatorial completo possui aplicações limitadas porque o número de execuções necessárias é muito grande quando é necessário avaliar mais de dois fatores. Os modelos BBD (Box e Behnken, 1960) e CCD (Box e Wilson, 1951) são mais eficientes e econômicos para um grande número de variáveis. Ambas as determinações através de BBD e CCD foram usados de forma favorável por muitos pesquisadores para otimizar diversas respostas variáveis em vários processos biológicos, tais como, rendimento do produto (Kola et al., 2017; Krupa et al., 2016), taxa de crescimento e consumo de substrato (Kiran et al., 2016; Koca et al., 2017) e rendimento de extração e purificação (Mathimani et al., 2017; Ye et al., 2016).

2.3 GÊNERO *PSEUDOMONAS*

O gênero *Pseudomonas* (subclasse Gamma de *Proteobacteria*) é constituído por mais de 140 espécies de bactérias Gram-negativas, móveis (um ou vários flagelos polares), em forma de haste e não esporulantes (García e Lalucat, 2016). É conhecido por sua capacidade metabólica versátil e facilidade de ocupar uma ampla gama de ambientes como no solo de vida livre ou como agente patogênico oportunista em infecções.

A maioria das espécies são saprófitas da água e dos ambientes relacionados com o solo. Diferentes espécies foram isoladas de todos os tipos de ambientes e condições

geográficas (por exemplo, sedimentos, amostras clínicas, plantas, fungos, espécimes animais doentes, água, solo, rizosfera, mar e desertos), incluindo aqueles considerados como ambientes extremos (Meyer et al., 2004; Peix et al., 2009). Isso implica que as espécies pertencentes a este gênero desenvolveram um amplo espectro de características ecológicas, metabólicas e bioquímicas, permitindo-lhes adaptar nos mais diversos ambientes do planeta através da regulação da expressão de diferentes conjuntos de genes em situações diversas. Embora cepas de *Pseudomonas* sejam facilmente isoladas, a identificação e diferenciação de espécies no gênero é mais difícil, pois o gênero *Pseudomonas* passou por muitas revisões taxonômicas nos últimos 100 anos (Özen e Ussery, 2012).

Geralmente, a sequência de rDNA 16S desempenham um papel fundamental na identificação precisa de isolados bacterianos permitindo a descrição de uma cepa em um gênero específico (Woo et al., 2008). No entanto, sua resolução no nível intragênero é baixa para *Pseudomonas*. Portanto, outros genes *housekeeping* foram propostos para a diferenciação de espécies no gênero *Pseudomonas* (García e Lalucat, 2016). Estudos baseados na análise filogenética de sequências parciais dos genes 16 rRNA, *gyrB* e *rpoD* resultaram no agrupamento de *Pseudomonas* em duas linhagens principais e claramente diferenciadas de grupos intragêneros (Mulet et al., 2010; Yamamoto et al., 2000). A primeira linhagem de *P. fluorescens* é dividida em seis grupos (*P. fluorescens*, *P. syringae*, *P. lutea*, *P. putida*, *P. anguilliseptica* e *P. straminea*), cada um dos quais pode ser dividido em vários subgrupos sendo representados por diferentes espécies. A segunda, linhagem de *P. aeruginosa*, é dividido em quatro grupos principais (*P. aeruginosa*, *P. oleovorans*, *P. stutzeri* e *P. oryzae*) com várias espécies cada. Além disso, devido a dificuldades envolvidas na identificação e diferenciação, algumas espécies são divididas em categorias intraspecíficas de acordo com suas características fisiológicas e bioquímicas, propriedades patogênicas contra plantas ou por diferença genômica (Mulet et al., 2013).

2.3.1 Flexibilidade Genômica do Gênero *Pseudomonas*

O genoma de *Pseudomonas* é composto por um único cromossomo circular grande com tamanhos variando entre 4,57 Mb (*Pseudomonas stutzeri* – 4209 genes) e 8,6 Mb (*P. bauzanensis* W13Z2 – 8.170 genes). No entanto, a partir da análise de todas as sequências genômicas completas de *Pseudomonas* apenas 25 a 35% dos genes são conservados em todas as espécies. Ou seja, o número mínimo de genes necessários para qualquer célula ser considerada como *Pseudomonas* (genoma do núcleo) representa 30% da informação genética

acumulativa dentro do genoma (pan-genoma), que foi estimado em 25.907 genes (Kahlon, 2016). Isso reflete um alto grau de diversidade e plasticidade no gênero, uma vez que o pan-genoma compreende: o genoma do núcleo, o genoma acessório e os genes únicos que estão presentes apenas em uma cepa particular (Tabela 1) (Silby et al., 2011). Em geral, os genes no genoma do núcleo contêm a maioria dos genes *housekeeping*, enquanto o genoma acessório são genes ou sequências que podem estar presentes em duas ou mais cepas, mas ausentes em outros e provavelmente foram adquiridas através da transferência horizontal de genes (Ozer et al., 2014).

Tabela 1. Características gerais de alguns genomas de *Pseudomonas*.

Cepa	Tamanho (bp)	Genes	Genes unicos
<i>P. aeruginosa</i> PA2192	6.905.121	6203	187
<i>P. aeruginosa</i> C3719	6.222.097	5696	45
<i>P. aeruginosa</i> LESB58	6.601.757	6026	219
<i>P. aeruginosa</i> PA7.	6.588.339	6396	660
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	6.264.404	5688	54
<i>P. aeruginosa</i> UCBPP-PA14	6.537.648	5977	143
<i>P. fluorescens</i> Pf0-1	6.438.405	5741	657
<i>P. fluorescens</i> SBW25	6.722.539	6009	1195
<i>P. putida</i> F1	5.959.964	5423	272
<i>P. putida</i> GB1	6.078.430	5515	456
<i>P. putida</i> KT2440	6.181.863	5481	422
<i>P. putida</i> W619	5.774.330	5292	418
<i>P. syringae</i> pv. phaseolicola 1448	5.928.787	5436	263
<i>P. syringae</i> pv. syringae B728a	6.093.698	5245	216
<i>P. syringae</i> pv. tomato DC3000	6.397.126	5721	330

Nota. Adaptado de “*Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable” by, Silby, M.W., Winstanley, C., Godfrey, S.A.C., Levy, S.B, Jackson, R.W., 2011. FEMS Microbiology Reviews, 35 (4), 652–680.

A grande versatilidade metabólica e fisiológica, proporcionada tanto pelo genoma acessório como pelas sequências únicas, confere às espécies de *Pseudomonas* algumas vantagens sob certas condições seletivas, como degradação de poluentes ambientais,

resistência a múltiplas classes de antibióticos e produção de novos metabólitos secundários (Ozer et al., 2014). Devido a isto, os membros deste gênero são de grande interesse pela produção e exploração biotecnológica de novos produtos químicos e farmacêuticos. As espécies de *Pseudomonas* podem produzir peptídeos não ribossômicos (pioverdinas, pirololeia, pseudomonina e pseudoverdina), lipopeptídeos cíclicos (CLP) (siringomicina, siringopeptina, arrofactina, massetólidos, putisolvina, safracina, tabtoxina, faseolotoxina, pirrolitrin e Indole-3-ácido acético (IAA)), polipeptídeos (PK) e compostos derivados de ácidos graxos (mupirocina, rizóxidos, 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG), 2,5-dialquilresorcinóis), compostos híbridos de NRP-PK (siringolin, pioluteorin, coronatina e pederina), fenazinas, quinolonas, cianeto de hidrogênio (HCN), promersalina, 3-metilarginina, e exoenzimas hidrolíticas, tais como, proteases, celulases, quitinases e β -glucanases, entre muitas outras de estrutura desconhecida (Li et al., 2011; Braun et al., 2010; Gross e Loper, 2009; Weller, 2007). Esta enorme gama de produtos naturais desempenha papéis importantes nos diversos ambientes em que são encontradas estas cepas.

2.3.2 *Pseudomonas*: Produção de Substâncias Bioativas

Os metabólitos secundários produzidos por *Pseudomonas* spp. Podem ter várias funções como a obtenção de nutrientes, fatores de virulência e defesa contra competidores e predadores nos habitats naturais (Gross e Loper, 2009). Além disso, alguns deles controlam a expressão gênica atuando como compostos de sinalização intracelular (Stintzi et al., 1998). Muitos estudos foram realizados e descreveram a existência da biosíntese de antimicrobianos (Grewall et al., 2014), antivirais (Morimoto e Sato, 2016), antitumorais (Kennedy et al., 2015), antihelmínticos (Cronin et al., 1997) e inseticidas (Bensidhoum et al., 2016). A inibição de agentes patogênicos de plantas, a solubilização do fosfato, a produção de fitohormônios, e de compostos orgânicos voláteis (COV) são responsáveis pelas atividades de promoção do crescimento em plantas (Santoyo et al., 2012). Neste sentido, além de serem excelentes agentes no controle biológico de pragas e doenças, muitas espécies vivem na rizosfera de planta e podem promover o crescimento e induzir resistência sistêmica em plantas (Ramamoorthy et al., 2001), assim como podem ser agentes de biorremediação por degradação de hidrocarbonetos de alto peso molecular (HAM) (Gao et al., 2017), pesticidas e remoção de nutrientes de águas residuais (Mujtaba et al., 2017). O gênero *Pseudomonas* também possui um excelente potencial econômico para a produção

comercial de metabólitos importantes, como biossurfactantes, bioplásticos e enzimas (Masakorala et al., 2013; Reddy et al., 2017).

2.3.2.1 Fenazinas: Metabólitos Secundários Importantes Produzidos por Espécies de *Pseudomonas*

Tabela 2. Exemplos de microrganismos produtores de fenazinas associados com seus hospedeiros.

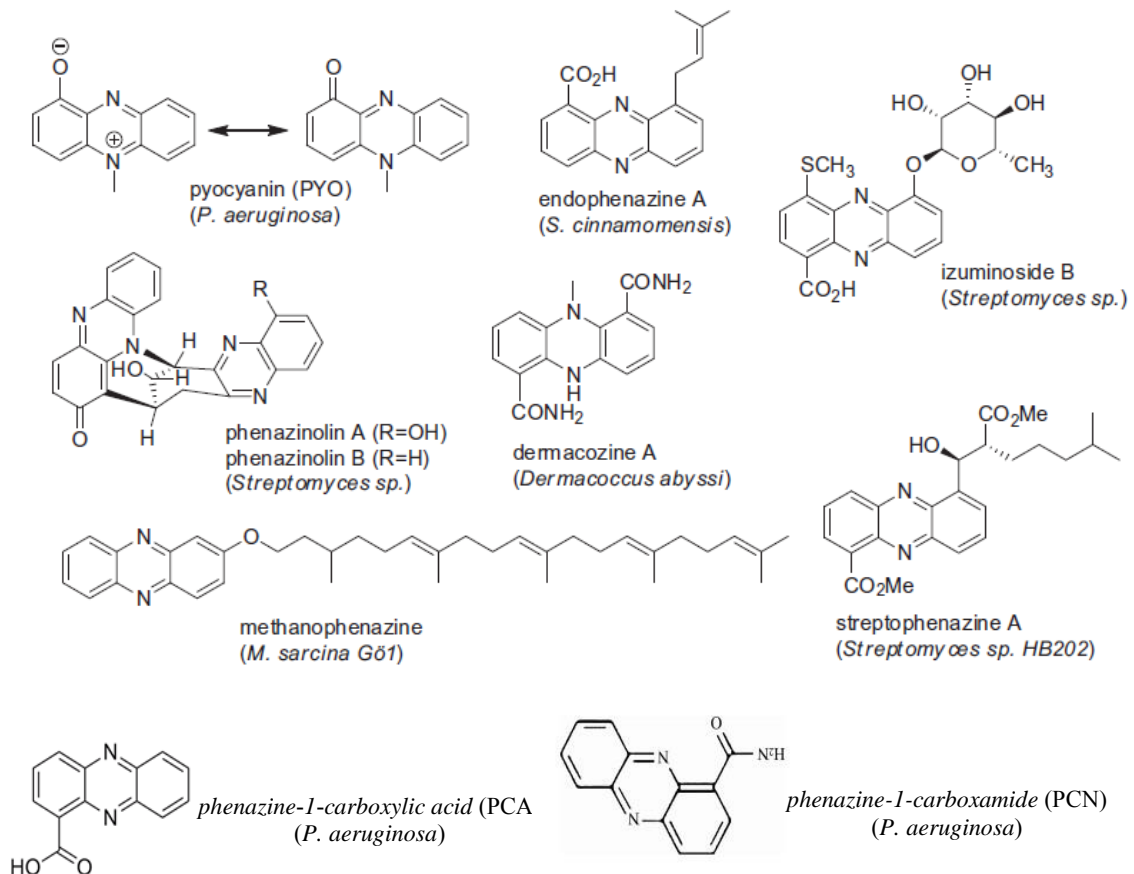
Bactéria	Humano	Animal	Planta	Insetos
<i>Brevibacterium linens</i>	+ (pele)			
<i>Brevibacterium</i> sp. KMD 003		+ (esponja marin.)		
<i>Burkholderia cepacia</i>	+	+	+	
<i>Methanosarcina mazei</i>	+ (intestino)	+ (rúmen)		
<i>Mycobacterium abscessus</i>	+ (pele)			
<i>Pantoea agglomerans</i>	+	+	+	
<i>Pelagio variabilis</i>		+ (macroalga)		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+	+
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>			+	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>			+	
<i>Pseudomonas putida</i>			+	
<i>Pseudomonas syringae</i>			+	
<i>Streptomyces anulatus</i>				+
<i>Streptomyces cinnamonensis</i>			+	

Adaptado de “Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes,” by Pierson, L. S., and Pierson, E. A., 2010, Applied Microbiology and Biotechnology, 86(6), 1659–1670.

As fenazinas são metabólitos secundários intensamente coloridos produzidos e excretados por muitas bactérias Gram-positivas (*Streptomyces*) e Gram-negativas (*Pseudomonas*), ou por espécies de arqueobactérias como *Methanosarcina* (Tabela 2) (Guttenberger et al., 2017; Laursen e Nielsen, 2004; Pierson e Pierson, 2010). Estruturalmente, as fenazinas são moléculas tricíclicas cujo núcleo é um anel de piridina (1,4-diaza benzeno) exibindo dois benzenos aninhados cujas propriedades químicas, físicas e biológicas diferem frequentemente com base na natureza e posição dos grupos funcionais

presentes no anel heterocíclico (Fig1). As fenazinas naturais incluem mais de 150 moléculas pigmentadas e mais de 6.000 derivados de fenazina foram sintetizados e identificados (Blankenfeldt e Parsons, 2014, Nansathit et al., 2009).

Figura 1. Derivados de fenatos de ocorrência natural selecionados.



Adaptado de “Recent developments in the isolation, biological function, biosynthesis, and synthesis of phenazine natural products,” by Guttenberger, N., Blankenfeldt, W., and Breinbauer, R., 2017, . *Bioorganic & Medicinal Chemistry*.

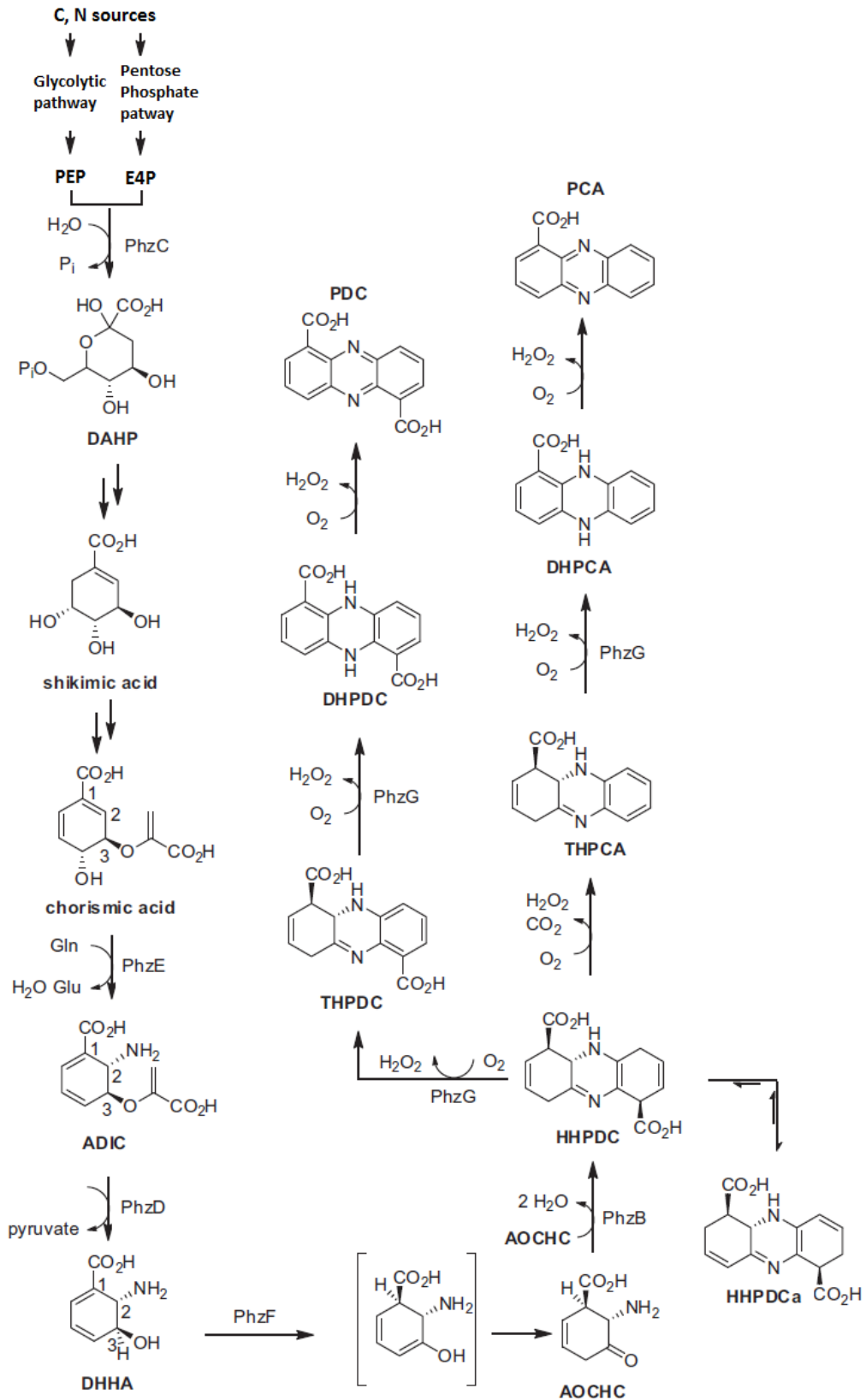
Dependendo do seu potencial redox, relativo ao de outras moléculas de transferência de elétrons na célula ou no meio ambiente, esses compostos podem atuar como receptores (redução de fenazina) ou doadores de elétrons (oxidação de fenazina) (Pierson e Pierson, 2010). Sob baixa condição de oxidantes, as células produtoras podem usá-las como pigmentos respiratórios alternativos para transformar NAD(H) em NAD⁺, facilitando a produção de energia e ajudando na sobrevivência em condições anaeróbicas, dando-lhes vantagens sobre outros microrganismos (Glasser et al., 2014). Além disso, as fenazinas como

1-hidroxi-5-metilfenazina (PYC-piocianina) e a PCA podem ser reduzidas na presença de oxidantes (através da oxidação da glutatona e NADH), resultando em níveis de oxidação aumentados. Nestas condições, as fenazinas podem reagir com oxigênio molecular livre para produzir espécies tóxicas de oxigênio reativo (ROS) (Wang et al., 2010). A geração de ROS pode inibir o crescimento de microrganismos concorrentes e contribuir para a invasão do hospedeiro. Isso explica por que as fenazinas são fatores de virulência e antibióticos de ampla especificidade desempenhando papéis importantes na supressão de doenças radiculares causadas por agentes patogênicos (Chen et al., 2015).

Os produtores de fenazinas podem biossintetizar derivados de fenazinas diferentes e múltiplos, cujas proporções são freqüentemente associadas ao tipo de espécie e às condições ambientais em que se desenvolve (Gross e Loper, 2009). Foi demonstrado que o cluster de genes *phzABCDEFG* é responsável pela biossíntese de fenazinas em *Pseudomonas* (Blankenfeldt e Parsons, 2014). No entanto, são necessárias cinco enzimas (PhzB, PhzD, PhzE, PhzF e PhzG) para a biosíntese da estrutura básica de fenazina de três anéis. Essas enzimas convertem o ácido corísmico em ácido fenazina-1,6-dicarboxílico (PDC) e PCA, os precursores de derivados de fenazina específicos da estirpe (Fig 2). Curiosamente, uma comparação de genes *phz* de diferentes espécies revela que *PhzB*, *PhzD*, *PhzE*, *PhzF* e *PhzG* possuem alto grau de conservação entre os gêneros bacterianos e provavelmente se espalham via transferência horizontal de genes (HGT) (Blankenfeldt, 2013).

As enzimas que modificam radicais diferentes são codificadas por genes (*phzO*, *phzH*, *phzS* e *phzM.phzS*) localizados *up* ou *downstream* desse “núcleo” do cluster biossintético (Mavrodi et al., 2010). Isso resulta em modificações químicas em uma ou mais posições das estruturas do anel aromático que podem ser únicas para espécies bacterianas específicas (Delaney et al., 2001). Em *P. chlororaphis* PCL1391 e *P. aeruginosa* PAO1, *phzH* converte PCA em PCN (Chin-A-Woeng et al., 2001), a presença de *phzO* em *P. chlororaphis* 30-84 converte uma porção de PCA (~ 10%) em laranja brilhante ácido 2-hidroxifenazina-1-carboxílico (2OHPCA) (Pierson e Thomashow, 1992), o *PhzS* facilita a conversão de PCA em 1-hidroxifenazina (1OHPZ) em *P. aeruginosa* (Parsons et al., 2007) e *phzM* e *phzS* juntos são responsáveis pela conversão de PCA em PYC em *P. aeruginosa* PAO1 (Mavrodi et al., 2001; Greenhagen et al., 2008). Essas modificações adicionais geram muitos compostos derivados de fenazina e determinam sua função biológica (Pierson e Pierson, 2010).

Figura 2. Núcleo de biossíntese de fenazina. PhzC é uma 3-desoxi-D-arabinoheptulose-7-fosfato (DAHP) sintase, catalisando a biossíntese do corísmo como o primeiro passo do ácido chiquímico.



Fenazinas são amplamente conhecidas por sua atividade antimicrobiana de amplo espectro. Liu et al. (2007) demonstraram a capacidade de uma mistura de PCA e 2OHPCA para inibir *Colletotrichum lagenarium*, *Phytophthora capsici*, *Pythium aphanidermatum*, *P. ultimum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Corticium sasakii* e *Rhizoctonia solani*. Nansathit et al. (2009) reportaram capacidade antimicrobiana de PCA contra *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Bacillus subtilis*, *Ralstonia solanacearum*, *Candida albicans*, *Escherichia coli* and *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*, bem como de phenazine-5,10-dioxide (PDO) contra *P. syringae*, *R. solanacearum* e *Enterobacter aerogenes*. Além disso, PCA demonstrou capacidade de inibir *Trichophyton rubrum* e *Candida albicans* (Gorantla et al., 2014), *Alternaria alternata* (Jain e Pandey, 2016), *Fusarium oxysporum* (Upadhyay e Srivastava, 2011), *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* (Xu et al., 2015), *Erwinia carotovora*, *P. syringae*, *Enterobacter aerogenes*, *C. tropicalis*, *Phytophthora capsici*, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Gibberella avenacea*, *Aspergillus fumigatus* e *Drechslera graminea* (Mavrodi et al., 2006). Além disso, também foi demonstrado que algumas podem atuar como promotores de crescimento em plantas (Chen et al., 2015), como inseticidas (Bensidhoum et al., 2016), exibir atividade antiviral, antiplasmodial, antimalárica, antiparasitária, anti-hepatites C (Wang et al., 2000), bem como atividade antitumoral (Kennedy et al., 2015) e cancer quimiopreventiva (Guttenberger et al., 2017). Conseqüentemente, os derivados de fenazina naturais e sintéticos são estudados e implementados em processos biotecnológicos.

2.3.2.1.1 Produção de Fenazinas

Existem dois métodos para produzir fenazinas: quimiossíntese e biossíntese. A quimiossíntese tem a vantagem de ser utilizada para obtenção de fenazinas naturais e sintéticas (Udumula et al., 2017, Xiong et al., 2017). Foram realizados vários experimentos para desenvolver um método útil para a produção de fenazinas com atividade biológica excepcional, mas ainda há alguns problemas que precisam ser resolvidos. O escopo limitado do substrato, as condições de reação severas, os baixos rendimentos, a síntese *multistep* e vários procedimentos de isolamento e purificação são alguns deles (Guttenberger et al., 2017). Portanto, a biossíntese continua sendo o sistema para aumentar a produção de fenazinas naturais. Na verdade, a biossíntese de PCA por bactérias produtoras de fenazinas alcançou níveis economicamente viáveis para a produção industrial viabilizando sua venda comercial, como na China, a PCA é produzida por processos fermentativos (rendimentos superiores a 4 g

L⁻¹) e foi registrada e comercializada como "Shenqinmycin". Uma suspensão de 1% de shenqinmycin tem ação fungicida altamente eficiente para controlar doenças de arroz e vegetais causadas por *R. solani* e *F. oxysporum*, aumentando a produção das culturas, além de ser seguro para humanos, animais e meio ambiente (Su et al., 2010; Sun et al., 2016).

Como já se sabe, as fenazinas são metabólitos secundários, portanto em culturas líquidas sua produção começa em estágios de crescimento tardio, sendo tipicamente acumuladas na fase estacionária. As cepas de *P. aeruginosa* contêm dois grupos de genes de *phz* [*phz1* (*phzA1B1C1D1E1F1G1*) e *phz2* (*phzA2B2C2D2E2F2G2*)] que estão relacionados com a síntese de PCA, um precursor das outras fenazinas (Cui et al., 2016). A expressão diferencial de operon redundantes proporciona vantagens seletivas de sobrevivência em diferentes condições ambientais e desempenham papéis específicos em sua patogenicidade (Recinos et al., 2012). A expressão de genes *phz* pode ser regulada pelo *quórum sensing* (QS), processo que pode ser desencadeado pelo esgotamento de nutrientes, alta densidade celular e conversão da bactéria na forma de biofilme (Nansathit et al., 2009; Schuster e Greenberg, 2006), de modo uniforme, o padrão de expressão do gene *phz* dependente de QS pode depender de parâmetros ambientais como temperatura, pH, salinidade, oxigênio e disponibilidade de nutrientes (Gokulan et al., 2014; Sun et al., 2016). Conseqüentemente, a produção de fenazinas é controlada por redes reguladoras complexas (Moradali et al., 2017).

2.4 PSEUDOMONAS AERUGINOSA

P. aeruginosa é uma bactéria Gram-negativa, cosmopolita sendo encontrada nos mais diversos ambientes. Pode ser oportunista capaz de causar infecções ou a inibição do crescimento e morte em uma ampla gama de organismos hospedeiros, como fungos, amebas, nematóides, insetos, plantas e vertebrados (Opperman e Shachar-Hill, 2016). Pode ser também agente infeccioso em ambiente hospitalar devido à sua resistência a múltiplos antibióticos e desinfetantes e sua capacidade de formar biofilmes e a diversidade metabólica (Dantas et al., 2008; Nathwani et al., 2014; Stover Et al., 2000). Entre as espécies do gênero *Pseudomonas*, apenas *P. aeruginosa* é capaz de causar infecções humanas graves em pacientes imunossuprimidos acometidos por fibrose cística (Winstanley et al., 2016), infecções leves da pele e do trato urinário (Trubiano e Padiglione, 2015) e septicemia (Streeter e Katouli, 2016). A *P. aeruginosa* tem a capacidade de utilizar uma ampla variedade de fontes de carbono, em ambientes oligotróficos aeróbicos, bem como utilizar diferentes fontes como aceptores finais de elétrons em condições anaeróbicas. Pode crescer a até 42°C, e produzir

múltiplos metabólitos e polímeros secundários, formar biofilmes e resistir a muitos biocidas e antibióticos (Hassett et al., 2009; Moradali et al., 2017). Esta adaptabilidade sugere a existência de um mecanismo evolutivo altamente flexível para facilitar a sobrevivência. A este respeito, a transferência horizontal gênica tem sido um dos principais contribuintes para a evolução do genoma *P. aeruginosa* (Kung et al., 2010). Estes elementos genéticos acessórios promovem a adaptação de cepas particulares em ambientes contendo metais pesados (Aguilar et al., 2010), hidrocarbonetos (Campos et al., 2010), antibióticos (Mesaros et al., 2007), pesticidas (Curutiu Et al., 2017), bem como, promove a persistência em várias espécies hospedeiras, codificando fatores de virulência (He et al., 2004; Wood and Wood, 2016).

2.4.1 *Pseudomonas aeruginosa*: Genoma Acessório e Adaptabilidade

Ozer et al. (2014) sequenciaram o genoma de *Pseudomonas* e observaram que várias partes são conservadas nas diferentes espécies nos genomas de referência de *P. aeruginosa* (B136-33, DK2, RP73, PAO1, PA14, PA7, LESB58, PACS2, M18, NCGM2. S1, 19BR e 213BR). Surpreendentemente, onze destas cepas de referência foram isoladas de amostras clínicas e apenas a cepa M18 foi isolada do ambiente, o que demonstra a importância desta espécie nos cuidados de saúde. Tanto o genoma total quanto o genoma do cromossoma tem um tamanho médio de 6,52 Mb (5892 genes) e 5,84 Mb (5316 genes), respectivamente (Ozer et al., 2014). Isto significava que, entre as cepas de *P. aeruginosa* um de cada 10 genes variam (genoma acessório) e o resto são genes homólogos (genoma do núcleo). Da mesma forma, a partir da análise comparativa dos genes, Mulet et al. (2010) encontraram que mais de 90, 70 e 60% das proteínas são comuns entre as diferentes espécies de *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* e *P. syringae*, respectivamente. Assim, *P. aeruginosa* é homogênea e é relativamente fácil de diferenciar e identificar. Além disso, esta espécie é facilmente detectável em ágar devido à sua capacidade de produzir e excretar, sob condição de limitação de ferro, pigmentos fluorescentes como a pioverdina (amarelo-verde) e a piocianina (azul-verde) (Saber et al., 2015).

Os genes de *P. aeruginosa* proporcionam uma ampla versatilidade e adaptabilidade que lhe permite sobreviver em diversos ambientes, além de infectar uma ampla gama de hospedeiros (Mulet et al., 2010). Vários estudos revelaram que os mecanismos envolvidos na adaptação estão principalmente sob o controle regulatório dos sistemas de detecção de QS (Rasamiravaka e El Jaziri, 2016, Papenfort e Bassler, 2016, Barr et al., 2015). O QS permite que as bactérias percebam e processem sinais ambientais para desencadear

mudanças fisiológicas para promover a adaptação a condições desfavoráveis. As concentrações de limiar crítico destas moléculas de sinal de detecção de QS como lactonas de N-acilhomoserina, derivados de ácidos graxos, 4-quinolonas, furanonas e oligopéptidos podem afetar a expressão gênica de acordo com o ambiente de crescimento predominante (Sakhtah et al., 2013; Williams, 2006). Especificamente, mais de 10% dos genes PA são regulados pelo QS e, por sua vez, é desencadeado em resposta a vários estresses ambientais, como calor, metal pesado, condições oxidativas e depleção de nutrientes (García-Contreras et al., 2015; Nguyen et al., 2015, Williams e Camara, 2009). Assim, QS regula a produção de diferentes compostos por *P. aeruginosa*, tais como proteases, fenazinas, toxinas, antimicrobianos e cianeto de hidrogênio (Lee e Zhang, 2015).

Conforme mencionado acima, o genoma acessório é formado por genes que são encontrados somente em algumas cepas, mas nenhum outro. Neste sentido, as condições ambientais são fortes fatores de seleção e a distribuição de algumas espécies microbianas apresenta padrões biogeográficos determinados por condições microambientais (Arnold et al., 2007; McDaniel et al., 2015). Frimmersdorf et al. (2010) observaram que em culturas na fase estacionária, a *P. aeruginosa* mantém uma ampla variedade específica de rotas metabólicas relacionados à fonte de carbono anteriormente disponível, revelando sua adaptabilidade e versatilidade metabólica. Assim, as cepas de *P. aeruginosa* isoladas de diferentes ambientes, que estão sujeitas a condições de estresse específicas, como choque osmótico, pH, dessecação, temperatura de crescimento sub-ótima e produtos químicos tóxicos, podem representar espécies potencialmente úteis em processos biotecnológicos, como a produção de novos compostos e a limpeza ambiental (Bhattachayya E Jha, 2012; Gao, et al., 2017; Opperman e Shachar-Hill, 2016;).

2.4.2 *Pseudomonas aeruginosa*: Diversidade Metabólica

Embora a *P. aeruginosa* tenha capacidade limitada para usar açúcares como fonte de C, ela possui uma grande quantidade de genes para a catálise de macromoléculas e obtenção de nutrientes o que permite que ela possa utilizar diferentes tipos de substrato, o que amplia a variedade de compostos que podem ser utilizados como nutrientes (Stanier et al., 1966). Em condições anaeróbicas, ocorre a desnitrificação e podem acumular fosfato usando nitrato ou nitrito como aceptor final de elétrons e polihidroxibutirato intracelular (PHB) como fonte de energia (Liu et al., 2016). Zheng et al. (2016) relataram que a *P. aeruginosa* PCN-2 possui alta capacidade de remoção de nitrogênio (NO e NO₂) na concentração de oxigênio de

0-10%. Além disso, em condições ambientais extremas incluindo a escassez de nutrientes ou a presença de concentração elevada de metais pesados, a *P. aeruginosa* produz agentes quelantes metálicos denominados sideróforos, capazes de se ligar aos metais e, assim, diminuindo a sua disponibilidade na rizosfera através de uma reação de complexação (Ullah et al., 2015; Rajkumar et al., 2010) este processo torna a *P. aeruginosa* um excelente agente de biorremediação sendo capaz de remediar ambientes contaminados por Cu, Zn, Pb, Cr e Cd tornando estes elementos biodisponíveis para as plantas (Liang et al., 2014; Kumar et al., 2011; Braud et al., 2009).

Além disso, muitas espécies de *P. aeruginosa* podem crescer em substratos hidrofóbicos produzindo biosurfactantes efetivos como rhamnolipídios (Diaz et al., 2016). Estes compostos podem ser utilizados como emulsionantes, agentes molhantes, agentes espumantes, agentes de espalhamento, ingredientes alimentares e detergentes funcionais, bem como na limpeza ambiental por biodegradação e desintoxicação de efluentes industriais e na biorremediação de solo contaminado (Vijayakumar e Saravanan, 2015). Além disso, os biosurfactantes exibem atividades de aplicações terapêuticas antimicrobianas, uma vez que esses compostos podem inibir a formação de biofilmes, desestabilizar biofilmes existentes e alterar a integridade das membranas celulares que comprometem o transporte e a geração de energia, e também inibir seletivamente a proliferação de células cancerígenas (Gudiña et al., 2013). Além disso, a *P. aeruginosa* tem a capacidade de produzir várias fenazinas redox-ativas incluindo PYC (azul), PCA (amarelo), 2OHPCA e PCN (amarelo). Estes compostos são o principal foco de pesquisa e desenvolvimento porque podem exibir atividades multifuncionais como foi comentado acima.

P. aeruginosa que vivem na rizosfera podem ser endófitas e capazes de promover o crescimento da planta devido a produção de fitohormônios como ácido indol-3-acético (IAA), ácido salicílico (SA) e zeatina (Parvin et al., 2015). Em microrganismos IAA é uma molécula de sinalização que afeta a expressão gênica, enquanto que nas plantas pode aumentar a área e comprimento da superfície da raiz e, desse modo, proporciona maior acesso aos nutrientes do solo (Spaepen e Vanderleyden, 2011). O SA é um intermediário na biossíntese de sideróforos por microrganismos (Press et al., 1997), afetando uma variedade de eventos bioquímicos e moleculares associados à indução de resistência à doença em plantas (Saikia et al., 2003). Por sua vez, a zeatina estimula o crescimento das plantas (Maseka et al., 2016).

Em conclusão, a *P. aeruginosa* pode ser usada na produção de uma ampla variedade de bioprodutos para o controle biológico de fitopatógenos e insetos, antibióticos,

promotores de crescimento e indutores de resistência sistêmica adquirida em plantas e agentes de biorremediação. *P. aeruginosa* pode utilizar uma ampla variedade de substratos como fonte de nutrientes e viver em diferentes condições ambientais. Assim, uma *P. aeruginosa* isolada de um nicho ecológico específico pode exibir genes biossintéticos eficazes que não estão presentes em outros isolados, tornando-o atraente para aplicações biotecnológicas. Por conseguinte, é essencial isolar e utilizar organismos selvagens para a busca de novos metabólitos úteis para diferentes fins (Shanmugam et al., 2008).

2.5 PSEUDOMONAS AERUGINOSA CEPA LV

A cepa PA LV foi isolada de uma antiga lesão de cancro cítrico de fruto de laranja (*Citrus sinensis* cv. Valencia) coletada em Astorga, Brasil (Rampazo, 2004), sua capacidade de produzir compostos antimicrobianos foi avaliada nos primeiros estudos e o processo de produção foi estabelecido e patenteado (Andrade, 2008; Oliveira, 2007). Oliveira et al. (2011) avaliaram o efeito de diferentes frações de metabólitos secundários produzidos pela cepa LV sobre o controle e ação da fração na morfologia celular de *X. citri* pv. *citri* 306 (Xcc 306), um agente causal de cancro cítrico em culturas cítricas, bem como sobre a formação de lesões em folhas de *C. sinensis* cv. Valência. Esse estudo mostrou uma redução significativa na produção de EPS por Xcc 306 e na formação de lesões nas folhas com um excelente efeito de antibiose de uma fração de acetato de etila, denominada fração F3. Em seguida, Lopes et al., (2012) relataram uma alta atividade antibiótica da fração F3 contra *X. axonopodis*, um agente causal de ferrugem bacteriana em mudas de eucalipto. Matsuoka et al. (2013) observaram que a fração metanol possui atividade antibiótica contra *Lactobacillus* sp. e pode ser utilizada como uma alternativa para controlar a contaminação de bactérias e a formação de espuma e floculação no processo de fermentação de etanol combustível.

A fração F3 mostrou uma forte ação contra várias espécies de *Xanthomonas* como *X. axonopodis* pv. *citri* (Xac) (Murate et al., 2015) e *X. arboricola* pv. *pruni* (Xap) (Silva et al., 2014) *in vitro* e reduzindo a incidência de lesões geradas por Xac e Xap em plantas de *C. sinensis* cv. valência e *Prunus persica* cv. maciel, respectivamente, em condições de estufa. Através da microscopia eletrônica de varredura, foi observado que as frações F4f e F3d (obtidas por fracionamento de F3) afetaram a morfologia celular, enquanto a fração F4f afetou a formação do biofilme. Em outros estudos, Cardozo et al. (2013) demonstraram atividade antibacteriana tanto da fração F3 como da fração F3d contra estirpes de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA), um dos mais importantes patógenos humanos

associados a infecções hospitalares e comunitárias. A partir da fração F3d, houve a purificação e identificação da PCN, que apresentaram atividade antibacteriana contra MRSA e efeito sinérgico quando combinados com nanopartículas de prata produzidas por *F. oxysporum*. Além disso, um composto organometálico com alto efeito antibacteriano também foi purificado. Do mesmo modo, este metabólito apresentou uma alta atividade antibiótica e formação de biofilme e de células planctônicas de biofilme *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase (Kerbaui et al., 2016). No mesmo estudo, os autores sugeriram que o composto organometálico tinha potencial no desenvolvimento de novos fármacos, pois é mais seletivo para as bactérias que as células hospedeiras. Mais tarde, este composto foi designado como OAC (composto antibiótico organometálico) e seu alto potencial para ser usado como um bioproduto para controle do cancro cítrico (Oliveira et al., 2016).

Munhoz et al. (2017) avaliaram a atividade antibiótica de um extrato semi-purificado produzido pela cepa LV contendo principalmente OAC e PCN em *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc), agente causal da podridão bacteriana do caule no tomate. Da mesma forma, foi avaliado a atividade tanto da fração quanto de PCN para induzir a resistência adquirida sistêmica (SAR) em plantas de tomateiro infectadas com Pcc. Os resultados indicam a atividade antibiótica do extrato semi-purificado e o aumento da SAR por PCN. Por outro lado, Simionato et al. (2017) purificaram e identificaram PCA do sobrenadante produzido por estirpe de LV que inibiu o crescimento micelial do fungo *Botrytis cinerea*, um fitopatógeno necrotrófico, além de reduzir a formação de exopolissacarídeos (fator de virulência importante), mostrando ter um alto potencial para o controle biológico de *B. cinerea*. Além disso, a cepa LV produz um composto derivado de indólico (IDC: 2-carboxi-2-heptano-indol-3-ona) com atividade anticancerígena, bem como a capacidade promover o crescimento de planta (dados não publicados). Mais tarde, o processo de produção IDC foi patenteado (Andrade et al., 2014).

Gionco (2016) relatou a capacidade inibitória do OAC em cinco isolados multiresistentes de *Acinetobacter baumannii*, um importante agente patogénico multiresistente relacionado a infecções hospitalares, com altas taxas de resistência ao carbapenem. Além disso, analisaram a expressão do gene diferencial da cepa LV em meio de cultura com e sem íons de Cu^{+2} . Nove genes foram diferencialmente expressos na ausência/presença de íons Cu^{+2} , incluindo três genes relacionados ao transporte de íons metálicos (PA3521, PA3523 e PA3920), três genes (PA2691, PA4141 e PA4782) não detectados em nenhum dos bancos de dados utilizados, um gene (PA3574a) associado ao grupo de chaperons ligado ao cobre, um gene (PA4872) classificado como um regulador

transcricional e um gene (*phzA2*) relacionado à via biossintética de fenazina. Estes resultados sugerem que a cepa LV pode expressar sequências de genes que não são presentes em outras *Pseudomonas*.

Hoje em dia, vários estudos estão sendo realizados em nosso laboratório usando frações microbianas produzidas pela cepa LV. Esses estudos visam avaliar a indução de resistência em plantas em condições de estufa e campo, controle de biofilme e contaminação bacteriana na produção de álcool combustível e avaliação de atividades antimicrobianas em fitopatógenos, bem como em isolados clínicos multiresistentes.

REFERÊNCIAS

- Agarabi, C.D., Schiel, J.E., Lute, S.C., Chavez, B.K., Boyne, M.T., Brorson, K.A., Khan, M., and Read, E.K. Bioreactor process parameter screening utilizing a Plackett-Burman design for a model monoclonal antibody. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.104, n.6, p.1919-1928, março 2015.
- Aguilar-Barajas, E., Ramírez-Díaz, M.I., Riveros-Rosas, H., and Cervantes C. Heavy metal resistance in pseudomonads, In: Ramos, J.L., and Filloux, A. **Pseudomonas: Molecular Microbiology, Infection and Biodiversity**. 6. New York, NY: Springer, 2010. p.255–282.
- Andrade, G. Process of production, purification and obtaining of substances with antibiotic activity to control diseases caused by bacteria in plants. **BR PI0803350-1A**, 2009.
- Angeli, D., Saharan, K., Segarra, G., Sicher, C., and Pertot, I. Production of *Ampelomyces quisqualis* conidia in submerged fermentation and improvements in the formulation for increased shelf-life. **Crop Protection**, v.97, p.135-144, julho 2017.
- Arnold, D.L., Jackson, R.W., Waterfield, N.R., and Mansfield, J.W. Evolution of microbial virulence: the benefits of stress. **Trends in Genetic**, v.23, n.6, p.293–300, julho 2007.
- Arora, R., Behera, S., Sharma, N.K., and Kumar, S. Augmentation of ethanol production through statistically designed growth and fermentation medium using novel thermotolerant yeast isolates. **Renewable Energy**, v.109, p.406-421, março 2017.
- Barr, H. L., Halliday, N., Cámara, M., Barrett, D. A., Williams, P., Forrester, D. L., et al. *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing molecules correlate with clinical status in cystic fibrosis. **European Respiratory Journal**, v.46, p.1046–1054, maio 2015.
- Bensidhoum, L., Nabti, E., Tabli, N., Kupferschmied, P., Weiss, A., Rothballer, M., Schmid, M., Keel, C., and Hartmann, A. Heavy metal tolerant *Pseudomonas protegens* isolates from agricultural well water in northeastern Algeria with plant growth promoting, insecticidal and antifungal activities. **European Journal of Soil Biology**, v.75, p.38-46, abril 2016.
- Bereza-Malcolm, L., Aracic, S., Kannan, R., Mann, G., and Franks, A.E. Functional characterization of Gram-negative bacteria from different genera as multiplex cadmium biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v.94, p.380-387, março 2017.
- Bezerra, M.A., Santelli, R.E., Oliveira, E.P., Villar, L.S., and Escaleira, L.A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v.76, n.5, p.965-977, setembro 2008.
- Bhattacharyya, P.N., and Jha, D.K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.28, n.4, p.1327–1350, dezembro 2012.
- Blankenfeldt, W. The Biosynthesis of phenazines. In: Chincholkar, S.B., Thomashow, L. **Microbial Phenazines Biosynthesis, Agriculture and Health**. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2013. p.19-42.

Blankenfeldt, W. and Parsons, J.F. The structural biology of phenazine biosynthesis. **Current Opinion in Structural Biology**, v.29, p.26-33, setembro 2014.

Box, G., and Behnken, D. Some new three level designs for the study of quantitative variable. **Technometrics**, v.2, n.4, p.455-475, novembro 1960.

Box, G., and Wilson, K. On the experimental attainment of optimum conditions. **Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)**, v.13, n.1, p.1-45, 1951.

Braud, A., Jézéquel, K., Bazot, S., and Lebeau, T. Enhanced phytoextraction of an agricultural Cr, Hg- and Pb-contaminated soil by bioaugmentation with siderophore producing bacteria. **Chemosphere**, v.74, n.2, p.280–286, outubro 2009.

Braun, S.D., Hofmann, J., Wensing, A., Ullrich, M.S., Weingart, H., Volksch, B., and Spiteller, D. Identification of the biosynthetic gene cluster for 3-methylarginine, a toxin produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 22d/93. **Applied Environmental Microbiology**, v.76, p.2500–2508, abril 2010.

Brink, A.J., Richards, G.A., Colombo, G., Bortolotti, F., Colombo, P., and Jehl, F. Multicomponent antibiotic substances produced by fermentation: Implications for regulatory authorities, critically ill patients and generics. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.43, n.1, p.1-6, agosto 2013.

Burlage, R.S., and Tillmann, J. Biosensors of bacterial cells. **Journal of Microbiological Methods**, v.138., p.2-11, julho 2017.

Campos-García, J., Metabolism of acyclic terpenes by *Pseudomonas*. In: Ramos, J.L., and Filloux, A., *Pseudomonas: Molecular Microbiology, Infection and Biodiversity*, 6. New York, NY: Springer, 2010, p.235–254.

Cardozo, V.F., Oliveira, A.G., Nishio, E.K., Perugini, M.R., Andrade, C.G., Silveira, W.D., Durán, N., Andrade, G., Kobayashi, R.K., and Nakazato, G. Antibacterial activity of extracellular compounds produced by a *Pseudomonas* strain against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, jun 12:12, 2013.

Chen, Y., Shen, X., Peng, H., Hu, H., Wang, W., and Zhang, X. Comparative genomic analysis and phenazine production of *Pseudomonas chlororaphis*, a plant growth-promoting rhizobacterium. **Genomics Data**, v.4, p.33-42, janeiro 2015.

Chin-A-Woeng, T.F., Bloemberg, G.V., van der Bij, A.J., van der Drift, K.M., Schripsema, J., Kroon, B., Scheffer, R.J., Keel, C., Bakker, P.A., and Tichy, H.-V. Biocontrol by phenazine-1-carboxamide-producing *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 of tomato root rot caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. **Molecular Plant–Microbe Interactions**, v.11, n.11, p.1069–1077, novembro 1998.

Chin-A-Woeng, T.F.C., Thomas-Oates, J.E., Lugtenberg, B.J.J., and Bloemberg, G.V. Introduction of the *phzH* gene of *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 extends the range of biocontrol ability of phenazine-1-carboxylic acid producing *Pseudomonas* spp. strains. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.14, p.1006–1015, agosto 2001.

Cronin, D., Moenne-Loccoz Y., Fenton A., Dunne C., Dowling, D.N. and O’Gara, F. Role of 2,4-diacetylphloroglucinol in the interactions of the biocontrol pseudomonad strain F113 with the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.1357–1361, abril 1997.

Cui, Q., Lv, H., Qi, Z., Jiang, B., Xiao, B., Liu, L., Ge, Y., and Hu, X. Cross-Regulation between the *phz1* and *phz2* operons maintain a balanced level of phenazine biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Plos One**, v.11, n.1., abril 2016.

Curutiu, C., Lazar, V., and Chifiriuc, M.C. Pesticides and antimicrobial resistance: from environmental compartments to animal and human infections. In: Grumezescu, A.M., **New Pesticides and Soil Sensors**, Oxford: Academic Press, 2017, dezembro p.373-392.

Czitrom, V. One-factor-at-a-time versus designed experiments. **The American Statistician**, v.53, n.2, p.126-131, janeiro 1999.

Dantas, G., M. O. Sommer, R. D. Oluwasegun, and G. M. Church. Bacteria subsisting on antibiotics. **Science**, v.320, n.5872, p.100–103, abril 2008.

Delaney, S.M., Mavrodi, D.V., Bonsall, R.F., and Thomashow, L.S. *phzO*, a gene for biosynthesis of 2-hydroxylated phenazine compounds in *Pseudomonas aureofaciens* 30-84. **Journal of Bacteriology**, v.183, p.318–327, janeiro 2001.

Díaz, M.A., Kamalanathan, I.D., and Martin, P.J. Comparative study of the production of rhamnolipid biosurfactants by *B. thailandensis* E264 and *P. aeruginosa* ATCC 9027 using foam fractionation. **Process Biochemistry**, v.51, n.7., p.820-827, abril 2016.

El-Sheekh, M.M., Khairy, H.M., Gheda, S.F., and El-Shenody, R.A. Application of Plackett–Burman design for the high production of some valuable metabolites in marine alga *Nannochloropsis oculata*. **The Egyptian Journal of Aquatic Research**, v.42, n.1, p.57-64, março 2016.

Fedorenko, V., Genilloud, O., Horbal, L., Marcone, G. L., Marinelli, F., Paitan, Y., Ron, E. Z. Antibacterial discovery and development: from gene to product and back. **BioMed Research International**, 591349, agosto 2015.

Frimmersdorf, E., Horatzek, S., Pelnikevich, A., Wiehlmann, L., Schomburg, D., and Schomburg, D. How *Pseudomonas aeruginosa* adapts to various environments: a metabolomic approach. **Environmental Microbiology**, v.12, n.6, p.1734–1747, juno 2010.

Gao, H., Zhang, J., Lai, H., and Xue, Q. Degradation of asphaltenes by two *Pseudomonas aeruginosa* strains and their effects on physicochemical properties of crude oil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.122, p.12-22, abril 2017.

García-Contreras, R., Nuñez-López, L., Jasso-Chávez, R., Kwan, B. W., Belmont, J. A., Rangel-Vega, A., et al. Quorum sensing enhancement of the stress response promotes resistance to quorum quenching and prevents social cheating. **Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology**, v.9, p.115–125, janeiro 2015.

García-Valdés, E., Lalucat, J. *Pseudomonas*: molecular phylogeny and current taxonomy, In:

Kahlon, R.S., ***Pseudomonas: molecular and applied biology***. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2016, p.1-23.

Gil-Chávez, G.J., Villa, J. A., Ayala-Zavala, J.F., Heredia, J.B., Sepulveda, D., Yahia, E. M. and González-Aguilar, G. A. Technologies for extraction and production of bioactive compounds to be used as nutraceuticals and food ingredients: an overview. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.12, p.5–23, janeiro 2013.

Gionco B. Analysis of differential gene expression of an environmental strain of *Pseudomonas aeruginosa* producing an organometallic compound bioactive and their activity against multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. **University of Londrina, Doctorate Thesis**, 2016.

Glasser, N. R., Kern, S. E., and Newman, D. K. Phenazine redox cycling enhances anaerobic survival in *Pseudomonas aeruginosa* by facilitating generation of ATP and a proton-motive force. **Molecular Microbiology**, v.92, n.2, p.399–412, março 2014.

Gokulan, K., Khare, S., Cerniglia, C. Metabolic pathways: production of secondary metabolites of bacteria. In: Batt, C.A. and Tortorello, M.L., **Encyclopedia of Food Microbiology**, Second edition, Oxford: Academic Press, 2014, p.561-569.

Gorantla, J.N., Nishanth Kumar, S., Nisha, G.V., Sumandu, A.S., Dileep, C., Sudaresan, A., Sree Kumar, M.M., Lankalapalli, R.S., and Dileep B.S. Purification and characterization of antifungal phenazines from a fluorescent *Pseudomonas* strain FPO4 against medically important fungi. **Journal of Medical Mycology**, v.24, n.3, p.185-192, abril 2014.

Greenhagen, B.T., Shi, K., Robinson, H., Gamage, S., Bera, A.K., Ladner, J.E., and Parsons, J.F. Crystal structure of the pyocyanin biosynthetic protein PhzS. **Biochemistry**, v.47, p.5281–5289, maio 2008.

Grewal, S., Bhagat, M., Vakhlu, J. Antimicrobial protein produced by *Pseudomonas aeruginosa* JU-Ch 1, with a broad spectrum of antimicrobial activity. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.3, n.4, p.332-337, outubro 2014.

Gross, H., and Loper, J.E. Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. **Natural Product Reports**, v.26, n.11, p.1408–1446, novembro 2009.

Gudiña, E.J., Rangarajan, V., Sen, R., and Rodrigues, L.R. Potential therapeutic applications of biosurfactants. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.34, n.12, p.667-675, dezembro 2013.

Guttenberger, N., Blankenfeldt, W., and Breinbauer, R. Recent developments in the isolation, biological function, biosynthesis, and synthesis of phenazine natural products. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. Available online, doi:10.1016/j.bmc.2017.01.002, janeiro 2017.

Hassett, D. J., Sutton, M. D., Schurr, M. J., Herr, A. B., Caldwell, C. C., and Matu, J. O. *Pseudomonas aeruginosa* hypoxic or anaerobic biofilm infections within cystic fibrosis airways. **Trends in Microbiology**, v.17, p.130–138, fevereiro 2009.

He, J., Baldini, R.L., Deziel, E., Saucier, M., Zhang, Q., Liberati, N.T., Lee, D., Urbach, J.,

Goodman, H.M., and Rahme, L.G. The broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.101, n.8, p.2530–2535, fevereiro 2004.

Hibbing, M.E., Fuqua, C., Parsek, M.R., and Peterson, S.B. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. **Nature Reviews. Microbiology**, v.8, n.1, p.15–25, janeiro 2010.

Jain, R. and Pandey, A. Phenazine-1-carboxylic acid producing polyextremophilic *Pseudomonas chlororaphis* (MCC2693) strain, isolated from mountain ecosystem, possesses biocontrol and plant growth promotion abilities. **Microbiological Research**, v.190, p.63-71, setembro 2016.

Jullesson, D., David, F., Pflieger, B., and Nielsen, J. Impact of synthetic biology and metabolic engineering on industrial production of fine chemicals. **Biotechnology Advances**, v.33, n.7, p.1395-1402, fevereiro 2015.

Kahlon, R.S. *Pseudomonas*: genome and comparative genomics. In: Kahlon, R.S., ***Pseudomonas: Molecular and Applied Biology***, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2016, p.127-191.

Kennedy, K.R., Ravindra N.P., Veena, V., Lakshmi, B.S., Lakshmi, P., Krishna, R., and Sakthivel, N. 5-Methyl phenazine-1-carboxylic acid: A novel bioactive metabolite by a rhizosphere soil bacterium that exhibits potent antimicrobial and anticancer activities. **Chemico-Biological Interactions**, v.231, p.71-82, março 2015.

Kerbaui, G., Vivan, A.C., Simões, G.C., Simionato, A.S., Pelisson, M., Vespero, E.C., et al. Effect of a metalloantibiotic produced by *Pseudomonas aeruginosa* on *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)-producing K. pneumonia. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v.17, n.4, p.389-397, fevereiro 2016.

Khuri, A.I., and Mukhopadhyay, S. Response surface methodology. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics**, v.2, n.2, p.128-149, março 2010.

Kiran, B., Pathak, K., Kumar, R., and Deshmukh, D. Statistical optimization using Central Composite Design for biomass and lipid productivity of microalga: A step towards enhanced biodiesel production. **Ecological Engineering**, v.92, p.73-81, julho 2016.

Koca, S., Aksoy, D., Cabuk, A., Celik, P., Sagol, E., Toptas, Y., et al. Evaluation of combined lignite cleaning processes, flotation and microbial treatment, and its modelling by Box Behnken methodology. **Fuel**, v.192, p.178-186, março 2017.

Kola, A., Mekala, M., and Goli, V. Experimental design data for the biosynthesis of citric acid using Central Composite Design method. **Data in Brief**, v.12, p.234-241, abril 2017.

Krause, J., and Tobin, G. Discovery, Development, and Regulation of Natural Products. In: Kulka, M., **Using Old Solutions to New Problems - Natural Drug Discovery in the 21st Century**, InTech, 2013. Available online doi:10.5772/564242013.

- Krupa, A., Abigail, M., Santhosh, C., Grace, A., and Vimala, R. Optimization of process parameters for the microbial synthesis of silver nanoparticles using 3-level Box–Behnken Design. **Ecological Engineering**, v.87, p.168-174, fevereiro 2016.
- Kumar, A., Bisht, B.S., Joshi, V.D., and Dhewa, T. Review on bioremediation of polluted environment: a management tool. **International Journal of Environmental Sciences**, v.1, n.6, p.1079–1093, março 2011.
- Kung, V. L., Ozer, E. A., and Hauser, A. R. The accessory genome of *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.74, n.4, p.621-641, dezembro 2010.
- Lam, K.S. New aspects of natural products in drug discovery. **Trends in Microbiology**, v.15, n.6, p.279-289, abril 2007.
- Laursen, J.B. and Nielsen, J. Phenazine natural products: biosynthesis, synthetic analogues, and biological activity. **Chemical Reviews**, v.104, n.3, p.1663-1686, março 2004.
- Lee, J., and Zhang, L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. **Protein and Cell**, v.6, p.26–41, setembro 2015.
- Li, W., Estrada de los Santos, P., Matthijs, S., Xie, G.L., Busson, R., Cornelis, P., et al. Promysalin, a salicylate-containing *Pseudomonas putida* antibiotic, promotes surface colonization and selectively targets other *Pseudomonas*. **Chemistry & Biology**, v.18, n.10, p.1320-1330, outubro 2011.
- Liang, X., He, C.Q., Ni, G., Tang, G.E., Chen, X.P., and Lei, Y.R. Growth and Cd accumulation of *Orychophragmus violaceus* as affected by inoculation of Cd tolerant bacterial strains. **Pedosphere**, v.24, n.3, p.322–329, junho 2014.
- Liste-Calleja, L., Lecina, M., and Cairó, J.J. HEK293 cell culture media study towards bioprocess optimization: Animal derived component free and animal derived component containing platforms. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.117, n.4, p.471-477, abril 2014.
- Liu, H., He, Y., Jiang, H., Peng, H., Huang, X., Zhang, X., et al. Characterization of a phenazine-producing strain *Pseudomonas chlororaphis* GP72 with broad spectrum antifungal activity from green pepper rhizosphere. **Current Microbiology**, v.54, n.4, p.302–306, abril 2007.
- Liu, H., Wang, Q., Sun, Y., Zhou, K., Liu, W., Lu, Q., et al. Isolation of a non-fermentative bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*, using intracellular carbon for denitrification and phosphorus-accumulation and relevant metabolic mechanisms. **Bioresource Technology**, v.211, p.6-15, julho 2016.
- Lopes, L.P., Oliveira, A.G., Beranger, J.P., Góis, C.G., Vasconcellos, F.C., San Martin, J.A., et al. Activity of extracellular compounds of *Pseudomonas* sp. against *Xanthomonas axonopodis* in vitro and bacterial leaf blight in eucalyptus. **Tropical Plant Pathology**, v.37, n.4, p.233-238, agosto 2012.

Masekesa, T.R., Gasura, E., Ngadze, E., Icishahayo, D., Kujeke, G.T., Chidzwondo, F., Robertson, I. Efficacy of Zeatin, Kinetin and Thidiazuron in induction of adventitious root and shoot from petiole explants of sweetpotato cv. Brondal. **South African Journal of Botany**, v.104, p.1-5, outubro 2016.

McDaniel, C. T., Panmanee, W., and Hassett, D. J. An overview of infections in cystic fibrosis airways and the role of environmental conditions on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and viability. In: Wat, D., **Cystic Fibrosis in the Light of New Research**, InTech, 2015, p.171–198.

Martins, V.V., Pitondo-Silva, A., Melo Manço, L., Falcao, J.P., Freitas, SdS., da Silveira, W.D., Stehling, E.G. Pathogenic potential and genetic diversity of environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Apmis**, v.122, n.2, p.92–100, fevereiro 2014.

Masakorala, K., Yao, J., Cai, M., Chandankere, R., Yuan, H., and Chen, H. Isolation and characterization of a novel phenanthrene (PHE) degrading strain *Pseudomonas* sp. USTB-RU from petroleum contaminated soil. **Journal of Hazardous Materials**, v.263, n.2, p.493-500, outubro 2013.

Mathee, K., Narasimhan, G., Valdes, C., Qiu, X., Matewish, J. M., Koehrsen, M., et al. Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.105, n.8, p.3100-3105, fevereiro 2008.

Mathimani, T., Uma, L., and Prabakaran, D. Optimization of direct solvent lipid extraction kinetics on marine trebouxiphycean alga by central composite design – Bioenergy perspective. **Energy Conversion and Management**, v.142, p.334-346, março 2017.

Matsuoca, C.G., Lopes-Santos, L., Oliveira, J.P., Oliveira, A.G., Spago, F.R., and Andrade, G. The control of *Lactobacillus* sp. by extracellular compound produced by *Pseudomonas aeruginosa* in the fermentation process of fuel ethanol industry in Brazil. **Journal of Sustainable Bioenergy Systems**, v.3, p.194-201, setembro 2013.

Mavrodi, D.V., Bonsall, R.F., Delaney, S.M., Soule, M.J., Phillips, G., and Thomashow, L.S. Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Journal of Bacteriology**, v.183, p.6454–6465, novembro 2001.

Mavrodi, D.V., Blankenfeldt, W. and Thomashow, L.S. Phenazine compounds in fluorescent *Pseudomonas* spp.: biosynthesis and regulation. **Annual Review of Phytopathology**, v.44, p.417–446, maio 2006.

Mavrodi, D.V., Peever, T.L., Mavrodi, O.V., Parejko, J.A., Raaijmakers, J.M., Lemanceau, P., Thomashow, L.S. Diversity and Evolution of the Phenazine Biosynthesis Pathway. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, n.3, p.866–879, fevereiro 2010.

Mesaros, N., Nordmann, P., Plesiat, M., Roussel-Delvallez, J., Van Eldere, Y. Glupczynski, Y., et al. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. **Clinical Microbiology and Infection**, v.13, n.6, p.560–578, janeiro 2007.

Meyer, A.F., Lipson, D.A., Martin, A.P., Schadt, C.W., and Schmidt, S. K. Molecular and

metabolic characterization of cold-tolerant alpine soil *Pseudomonas* sensu stricto. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.1, p.483–489, janeiro 2004.

Moradali, M.F., Ghods, S., Rehm, B.H.A. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.7, n.39, fevereiro 2017.

Morimoto, K., and Sato, Y. Anti-influenza virus activity of high-mannose binding lectins derived from genus *Pseudomonas*. **Virus Research**, v.223, p.64-72, setembro 2016.

Mujtaba, G., Rizwan, M., and Lee, K. Removal of nutrients and COD from wastewater using symbiotic co-culture of bacterium *Pseudomonas putida* and immobilized microalga *Chlorella vulgaris*. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v.49, p.145-151, maio 2017.

Mulet, M., Lalucat, J., and García-Valdés, E. DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. **Environmental Microbiology**, v.12, p.1513–1530, junho 2010.

Mulet, M., García-Valdés, E., and Lalucat, J. Phylogenetic affiliation of *Pseudomonas putida* biovar A and B strains. **Research in Microbiology**, v.164, n.4, p.351-359, fevereiro 2013.

Munhoz, L.D., Pistore, J., Oliveira, I.M., Perez, M.O., Simionato, A.S., Goya, E.T., et al. Control of bacterial stem rot on tomato by extracellular bioactive compounds produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain. **Cogent Food & Agriculture**, 3:1282592, janeiro 2017.

Murate, L.S., Oliveira, A.G., Higashi, A.Y., Barazetti, A.R., Simionato, A.S., Santos C., Cavalari, G., et al. Activity of secondary bacterial metabolites in the control of citrus canker. **Agricultural Sciences**, v.6, p.295-303, março 2015.

Nansathit, A., Apipattarakul, S., Phaosiri, C., Pongdontri, P., Chanthai, S. and Ruangviriyachai, C. Synthesis, isolation of phenazine derivatives and their antimicrobial activities. **Walailak Journal of Science and Technology**, v.6, n.1, p.79-91, 2009.

Nathwani, D., Raman, G., Sulham, K., Gavaghan, M., and Menon, V. Clinical and economic consequences of hospital-acquired resistant and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections: a systematic review and meta-analysis. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, 3:32, outubro 2014.

Nielsen, J., and Keasling, J.D. Engineering cellular metabolism. **Cell**, v.164, n.6, p.1185-1197, março 2016.

Nguyen, A.T., Jones, J.W., Ruge, M.A., Kane, M.A., and Oglesby-Sherrouse, A.G. Iron depletion enhances production of antimicrobials by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v.197, p.2265–2275, abril 2015.

Oliveira, A.G. Biological control of citrus canker through microbial metabolic products. **University of Londrina, Master Thesis**, Brasil. 2007.

Oliveira, A.G., Murate, L.S., Spago, F.R., Lopes, L.P., de Oliveira, J.P., Barrera, J.A., et al. Evaluation of the antibiotic activity of extracellular compounds produced by the *Pseudomonas* strain against the *Xanthomonas citri* pv. *citri* 306 strain. **Biological Control**,

v.56, n.2, p.125-131, fevereiro 2011.

Oliveira, A.G., Andrade, G., and Oliveira, M.Y. Process of production, purification and obtaining of a microbial secondary metabolite, belonging to the family of indolinones, produced by a wild strain of *Pseudomonas aeruginosa*. **BR 1020140171738**, 2014.

Oliveira, A.G., Spago, F.R., Simionato, A.S., Pérez, M.O., Silva, C.S., Barazetti, A.R., et al. Bioactive organocopper compound from *Pseudomonas aeruginosa* inhibits the growth of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Frontiers in Microbiology**, 7:113, fevereiro 2016.

Opperman, M., and Shachar-Hill, Y. Metabolic flux analyses of *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates. **Metabolic Engineering**, v.38, p.251-263, setembro 2016.

Özen A., and Ussery D.W. Defining the *Pseudomonas* genus: where do we draw the line with *Azotobacter*? **Microbial Ecology**, v.63, n.2, p.239-248, fevereiro 2012.

Ozer, E.A., Allen, J.P., and Hause, A.R. Characterization of the core and accessory genomes of *Pseudomonas aeruginosa* using bioinformatic tools Spine and AGent. **BMC Genomics**, 15:737, agosto 2014.

Papenfort, K., and Bassler, B. L. Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v.14, n.9, p.576–588, agosto 2016.

Parsons, J.F., Greenhagen, B.T., Shi, K., Calabrese, K., Robinson, H., and Ladner, J.E. Structural and functional analysis of the pyocyanin biosynthetic protein PhzM from *Pseudomonas aeruginosa*. **Biochemistry**, v.46, p.1821–1828, janeiro 2007.

Parvin, W., Othman, R., Jaafar, H., Rahman, M., and Yun, W.M. Chromatographic detection of phytohormones from the bacterial strain UPMP3 of *Pseudomonas aeruginosa* and UPMB3 of *Burkholderia cepacia* and their role in oil palm seedling growth. **International Journal of Biotechnology Research**, v.3, n.5, p.73-80, setembro 2015.

Patil, S., Nikam, M., Patil, H., Anokhina, T., Kochetkov, V., and Chaudhari, A. Bioactive pigment production by *Pseudomonas* spp. MCC 3145: Statistical media optimization, biochemical characterization, fungicidal and DNA intercalation-based cytostatic activity. **Process Biochemistry**, v.58, p.298-305, maio 2017.

Peix, A., Ramírez, M.H., and Velázquez, E. Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. **Infection, Genetics and Evolution**, v.9, n.6, p.1132-1147, agosto 2009.

Pierson, L. S., and Pierson, E. A. Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.86, n.6, p.1659–1670, março 2010.

Pierson, L.S., and Thomashow, L.S. Cloning and heterologous expression of the phenazine biosynthetic locus from *Pseudomonas aureofaciens* 30-84. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.5, p.330–339, abril 1992.

Plackett, R.L., and Burman, J.P. The design of optimum multifactorial experiments.

Biometrika, v.33, p.305–325, juno 1946.

Press CM, Wilson M, Tuzun S, and Kloepper J.W. Salicylic acid produced by *Serratia marcescens* 90-166 is not the primary determinant of induced systemic resistance in cucumber or tobacco. **Molecular Plant-Microbe Interactions Journal**, v.10, p.761–768, agosto 1997.

Rajkumar, M., Ae, N., Prasad, M.N., and Freitas, H. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. **Trends in Biotechnology**, v.28, n.3, p.142–149, janeiro 2010.

Ramamoorthy, V., Viswanathan, R., Raguchander, T., Prakasam, V., and Samiyappan, R. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. **Crop Protection**, v.20, n.1, p.1-11, fevereiro 2001.

Rampazo, L.G.L. Evaluation of the effect of biological agents and their products into the incidence of citrus canker lesions. **University of Londrina, Master Thesis**, Brasil. p. 57, 2004.

Rasamiravaka, T., and El Jaziri, M. Quorum-sensing mechanisms and bacterial response to antibiotics in *P. aeruginosa*. **Current Microbiology**, v.73, n.5, p.747-753, julho 2016.

Recinos, D.A., Sekedat, M.D., Hernandez, A., Cohen, T.S., Sakhtah, H., Prince, A.S., et al. Redundant phenazine operons in *Pseudomonas aeruginosa* exhibit environment-dependent expression and differential roles in pathogenicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.109, p.19420–19425, novembro 2012.

Reddy, M.V., Mawatari, Y., Onodera, R., Nakamura, Y., Yajima, Y., and Chang, Y.C. Polyhydroxyalkanoates (PHA) production from synthetic waste using *Pseudomonas pseudoflava*: PHA synthase enzyme activity analysis from *P. pseudoflava* and *P. palleronii*. **Bioresource Technology**, v.234, p.99-105, março 2017.

Ren, H., Wang, B., Zhao, H. Breaking the silence: new strategies for discovering novel natural products. **Current Opinion in Biotechnology**, v.48, p.21-27, março 2017.

Saber, F.M.A, Abdelhafez, A.A., Hassan, E.A., and Ramadan, E.M. Characterization of fluorescent pseudomonads isolates and their efficiency on the growth promotion of tomato plant. **Annals of Agricultural Sciences**, v.60, n.1, p.131-140, juno 2015.

Sahu, P.K., Rao, N., Cecchi, T., Swain, S., Patro, C.S., and Panda, J. An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Available online doi:10.1016/j.jpba.2017.05.006, 2017.

Saikia, R., Singh, T., Kumar, R., Srivastava, J., Srivastava, A.K., Singh, K., and Arora, D.K. Role of salicylic acid in systemic resistance induced by *Pseudomonas fluorescens* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* in chickpea. **Microbiological Research**, v.158, n.3, p.203-213, 2003.

Sakhtah, H., Price-Whelan, A. and Dietrich L.E.P. Regulation of Phenazine Biosynthesis. In: Chincholkar, S.B., Thomashow, L., **Microbial Phenazines Biosynthesis, Agriculture and**

Health, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2013, p.19-42.

Salazar, D.E., and Gormley, G. Modern Drug Discovery and Development. In: Robertson, D., and Williams, G.H., **Clinical and Translational Science**, Second Edition, Oxford: Academic Press, 2017, p.719-743.

Santoyo, G., Orozco-Mosqueda, M.C., and Govindappa, M. Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. **Biocontrol Science and Technology**, v.22, p.855–872, maio 2012.

Schuster, M., and Greenberg, P. A network of networks: Quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal of Medical Microbiology**, v.296, p.73-81, fevereiro 2006.

Shanmugam, V., Ajit, N.S., Verma, R., and Sharma, V. Diversity and differentiation among fluorescent pseudomonads in crop rhizospheres with whole-cell protein profiles. **Microbiological Research**, v.163, n.5, p.571-578, setembro 2008.

Silva, F.C., Oliveira, A.G., Lopes-Santos, L., Oliveira, J.P., Torres, M.V., Simionato, A.S., et al. Evaluation of antibiotic activity produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain against *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. **Agricultural Sciences**, v.5, n.1, p.71-76, janeiro 2014.

Silby, M.W., Winstanley, C., Godfrey, S.A.C., Levy, S.B, and Jackson, R.W. *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. **FEMS Microbiology Reviews**, v.35, n.4, p.652–680, julho 2011.

Simionato, A.S., Navarro, M.O., Maria L.A. De Jesus, M.L., Barazetti, A.R., Silva, C.S, Simões, G.C., Balbi-Peña, M.I., et al. The effect of phenazine-1-carboxylic acid on mycelial growth of *Botrytis cinerea* produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV Strain. **Frontiers in Microbiology**, v.8, p.1-11, junho 2017.

Siriano, P.R., Galvão E., Costa I., Rocha, R., Silva A.B., Nunes, E.E., and Barros, E.V. Obtaining a protocol for extraction of phenolics from açai fruit pulp through Plackett–Burman design and response surface methodology. **Food Chemistry**, v.210, p.189-199, abril 2016.

Spaepen, S., and Vanderleyden, J. Auxin and plant-microbe interactions. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v.3, n.4, a001438, abril 2011.

Stanbury, P.F., Whitaker, A., and Hall, S.J. Media for industrial fermentations. In: **Principles of Fermentation Technology**, Third Edition. Butterworth-Heinemann, 2017, p.213-272.

Stintzi, A., Evans, k., Meyer, J.M., and Poole, K. Quorum-sensing and siderophore biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: lasRllasI mutants exhibit reduced pyoverdine biosynthesis. **FEMS Microbiology Letters**, v.166, n.2, p.341-345, setembro 1998.

Stover, C., Pham, X., Erwin, S. D. Mizoguchi, P., Warrenner, M. J., and Hickey, F.S.L. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. **Nature**, v.406, p.959–964, agosto 2000.

Streeter, K., and Katouli, M. *Pseudomonas aeruginosa*: A review of their pathogenesis and

prevalence in clinical settings and the environment. **Infection, Epidemiology and Medicine**, v.2, n.1, p.25-32, 2016.

Su, J.J., Zhou, Q., Zhang, H.Y., Li, Y.Q., Huang, X.Q. and Xu, Y.Q. Medium optimization for phenazine-1-carboxylic acid production by a *gacA qscR* double mutant of *Pseudomonas* sp. M18 using response surface methodology. **Bioresource Technology**, v.101, n.11, p.4089-4095, fevereiro 2010.

Sun, S., Zhou, L., Jin, K., Jiang, H., and He, Y.W. Quorum sensing systems differentially regulate the production of phenazine-1-carboxylic acid in the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* PA1201. **Scientific Reports**, 6:30352, julho 2016.

Tamano, K. Enhancing microbial metabolite and enzyme production: current strategies and challenges. **Frontiers in Microbiology**, 5:718, dezembro 2014.

Trubiano, J.A., and Padiglione, A.A. Nosocomial infections in the intensive care unit. **Anaesthesia and Intensive Care**, v.16, p.598–602, janeiro 2015.

Udumula, V., Endres, J.L., Harper, C.N., Jaramillo, L., Zhong, H.A., Bayles, K.W., and Conda-Sheridan, M. Simple synthesis of endophenazine G and other phenazines and their evaluation as anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.125, p.710-721, janeiro 2017.

Ullah, A., Heng, S., Hussain M.F., Fahad, S., and Yang, X. Phytoremediation of heavy metals assisted by plant growth promoting (PGP) bacteria: A review. **Environmental and Experimental Botany**, v.117, p.28-40, setembro 2015.

Upadhyay, A. and Srivastava, S. Phenazine-1-carboxylic acid is a more important contributor to biocontrol *Fusarium oxysporum* than pyrrolnitrin in *Pseudomonas fluorescens* strain Psd. **Microbiological Research**, v.166, n.4, p.323-335, maio 2011.

Vasiee, A., Behbahani, B.A., Yazdi, F.T., Moradi, S. Optimization of the production conditions of the lipase produced by *Bacillus cereus* from rice flour through Plackett-Burman Design (PBD) and response surface methodology (RSM). **Microbial Pathogenesis**, v.101, p.36-43, dezembro 2016.

Venil, C.K., Zakaria, Z.A., and Ahmad, W.A. Bacterial pigments and their applications. **Process Biochemistry**, v.48, n.7, p.1065-1079, julho 2013.

Vijayakumar, S., and Saravanan, V. Biosurfactants - Types, sources and applications. **Research Journal of Microbiology**, v.10, p.181-192, junho 2015.

Wang, W., Preville, P., Morin, N., Mounir, S., Cai, W., and Siddiqui, M.A. Hepatitis C viral IRES inhibition by phenazine and phenazine-like molecules. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.10, p.1151–1154, june 2000.

Wang, Y., Kern, S. E., and Newman, D. K. Endogenous phenazine antibiotics promote anaerobic survival of *Pseudomonas aeruginosa* via extracellular electron transfer. **Journal of Bacteriology**, v.192, n.1, p.365–369, janeiro 2010.

Weller, D.M. *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years. **Phytopathology**, v.97, p.250–256, fevereiro 2007.

Williams, P. Quorum sensing. **International Journal of Medical Microbiology**, v.296, p.57-59, abril 2006.

Williams, P., and Camara, M. Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. **Current Opinion in Microbiology**, v.12, p.182–191, fevereiro 2009.

Winstanley, C., O'Brien, S., and Brockhurst, M. A. *Pseudomonas aeruginosa* evolutionary adaptation and diversification in cystic fibrosis chronic lung infections. **Trends in Microbiology**, v.24, p.327–337, março 2016.

Woo, P.C.Y., Lau, S.K.P., Teng, J.L.L., Tse, H. and Yuen, K.Y. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. **Clinical Microbiology and Infection**, v.14, p.908–934, setembro 2008.

Wood, T. L., and Wood, T. K. The HigB/HigA toxin/antitoxin system of *Pseudomonas aeruginosa* influences the virulence factors pyochelin, pyocyanin, and biofilm formation. **MicrobiologyOpen**, v.5, p.499–511, março 2016.

Woodley, J.M., Breuer, M., Mink, D. A future perspective on the role of industrial biotechnology for chemicals production. **Chemical Engineering Research and Design**, v.91, n.10, p.2029-2036, julho 2013.

Xiong, Z., Niu, J., Liu, H., Xu, Z., Li, J., and Wu, Q. Synthesis and bioactivities of Phenazine-1-carboxylic acid derivatives based on the modification of PCA carboxyl group. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v.27, n.9, p.2010-2013, março 2017.

Xu, S., Pan, X., Luo, J., Wu, J., Zhou, Z., Liang, X., et al. Effects of phenazine-1-carboxylic acid on the biology of the plant-pathogenic bacterium *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.117, p.39-46, janeiro 2015.

Yamamoto, S., Kasai, H., Arnold, D.L., Jackson, R.W., Vivian, A., and Harayama, S. Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. **Microbiology**, v.146, p.2385–2394, outubro 2000.

Ye, Z., Wang, W., Yuan, Q., Ye, H., Sun, Y., Zhang, H., and Zeng, X. Box–Behnken design for extraction optimization, characterization and in vitro antioxidant activity of *Cicer arietinum* L. hull polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v.147, p.354-364, abril 2016.

Yu, D., Yong, Y.C., Liu, C., Fang, Y., Bai, L., and Dong, S. New applications of genetically modified *Pseudomonas aeruginosa* for toxicity detection in water. **Chemosphere**, v.184, p.106-111, maio 2017.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Otimizar o processo de produção de metabólitos secundários de *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar o processo de produção implementado pelo Laboratório de Ecologia Microbiana (LEM) na produção de fenazina-1-ácido carboxílico (PCA), fenazina-1-carboxiamida (PCN), 2-carboxi-2-heptano-indol-3-ona (IDC) e um composto organometálico antimicrobiano (OAC) por *P. aeruginosa* cepa LV.

Otimizar a concentração dos componentes do meio de cultura pertencentes á patente do protocolo de produção do LEM, a fim de maximizar a produção de PCA, PCN, IDC e OAC em culturas em meio líquido.

Avaliar os efeitos de componentes alternativos em meio de cultivo para a produção de PCA, PCN, IDC e OAC por *P. aeruginosa* cepa LV.

Estabelecer novas condições de cultivo para a produção de PCA, PCN, IDC e OAC por *P. aeruginosa* cepa LV empregando a metodologia de superfície de resposta.

4 ARTIGO

AUMENTO DA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS BIOATIVOS ALVO PRODUZIDOS POR *Pseudomonas aeruginosa* LV STRAIN

ENHANCED PRODUCTION OF TARGET BIOACTIVE METABOLITES PRODUCED BY *Pseudomonas aeruginosa* LV STRAIN

RESUMO

Pseudomonas aeruginosa cepa LV produz em seu metabolismo secundário fenazina-1-ácido carboxílico (PCA), fenazina-1-carboxiamida (PCN), 2-carboxi-2-heptano-indol-3-ona (IDC) e um composto antibiótico organometálico (OAC). Esses compostos possuem um alto potencial para serem implementados nos mais diferentes setores biotecnológicos e seus processos de produção têm sido previamente estabelecidos e patenteados. No entanto, para cada composto, a concentração obtida no meio de cultura é inferior a 6 mg L^{-1} . Portanto, para aumentar seus rendimentos, foi realizada uma otimização do sistema de produção. Metodologia experimental um fator por vez bem como dois planejamentos fatoriais sucessivos foram utilizados para avaliar os efeitos de 13 variáveis na produção final dos metabólitos. Em seguida, o nível ótimo das variáveis foi determinado utilizando metodologia de superfície de resposta (MSR). Além disso, um dos meios otimizados foi utilizado para determinar as condições adequadas de temperatura e pH inicial empregando um planejamento fatorial completo de três níveis. Estabelecidas as condições ótimas, as produções de IDC, PCA, PCN e OAC representaram aumentos (em porcentagem) de 269, 602, 5286 e 84, respectivamente, em relação ao meio básico de cultura (MBC). Posteriormente, a concentração inibitória mínima (CIM) de OAC contra a cepa LV foi estimada em $15 \mu\text{g mL}^{-1}$, indicando que a concentração obtida ($11,11 \pm 1,05 \text{ mg L}^{-1}$) era provavelmente a máxima possível. Portanto, essas novas condições de produção devem ser implementadas para a produção de IDC, PCA e PCN pela cepa LV.

Palavras-chave: Otimização, delineamento Box-Behnken, metodologia de superfície de resposta, metabólitos secundários

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa LV strain produces phenazine-1-carboxylic acid – PCA, phenazine-1-carboxamide – PCN, 2-carboxi-2-heptano-indol-3-ona – IDC, and an organocopper antibiotic compound – OAC. These secondary metabolites showed potential to many biotechnological applications and their production process was established and patented previously. However, to each compound the concentration obtained in the culture medium is less than 6 mg L^{-1} . Therefore, in order to increase their concentrations, a basic system optimization was carried out. One-factor-at-a-time experiments and two successive factorial designs were applied to evaluate the effects of thirteen variables on the final metabolite

concentrations. The optimum levels of these variables were determined using response surface methodology (RSM). In addition, a three-level of full factorial design was used to determine suitable conditions of temperature and initial pH. Under optimum established conditions the production of IDC, PCA, PCN and OAC increased 42, 38, 250 and 0.84 folds, respectively, with respect to the basic culture medium (BCM). Also, the minimum inhibitory concentration of OAC against LV strain was $15 \mu\text{g mL}^{-1}$, indicating that the concentration obtained ($11.11 \pm 1.05 \mu\text{g mL}^{-1}$) was likely the maximum possible. The optimized culture conditions should be implemented in the production of IDC, PCA, PCN and OAC by LV strain.

Key words: Optimization, Box-Behnken design, response surface methodology, secondary metabolites, chromatography.

1. Introduction

Pseudomonas aeruginosa is a Gram-negative γ -proteobacterium widely distributed in nature. This specie is able to use distinct organic compounds as nutrients and grow in very different environments such as soil, marshes, plants and animal tissues (Stover et al. 2000). *P. aeruginosa* is known as an opportunistic human pathogen that causes lung infections in patients with cystic fibrosis and immunocompromised patients (Johansen et al. 1998). Nevertheless, it also can be useful in diverse biotechnological applications. It has been reported the capacity of *P. aeruginosa* to produce biosurfactants (Hua et al. 2009), metabolites with antimicrobial activity (Kerbaui et al. 2016), lipases (Chaudhry et al. 2015), and remove branched chain alkanes from crude oil-contaminated water (Nie 2016).

P. aeruginosa LV strain, isolated from a citrus canker lesion of orange fruits (*Citrus sinensis* cv. Valence) at Astorga, PR, Brazil (Rampazo 2004), produces different kinds of phenazines, including phenazine-1-carboxylic acid (PCA) and phenazine-1-carboxamide (PCN). These compounds are secondary metabolites with broad-antibiotic spectrum activity against bacteria, fungi and nematodes (Wen et al. 2016). PCA is a compound produced by plant growth-promoting rhizosphere (PGPR) pseudomonads and its effectiveness in biological control of pathogens was demonstrated in several studies (Jain and Pandey 2016, Xu et al. 2015, Upadhyay and Srivastava 2011). In addition, PCA can be transformed in PCN by enzymatic process regulated by *phzH* gene (Jin et al. 2015). Also, PCN showed biocontrol potential and, as antifungal with a bigger activity when compared with PCA (Chin-A-Woeng et al. 1998).

Additionally, LV strain produces both 2-carboxy-2-heptano-indol-3-ona (IDC) and an organocopper antibiotic compound (OAC) with antimicrobial activity (Kerbaux et al. 2016). The IDC exhibited anticancer activity in *in vitro* experiments and ability to promote plant growth (unpublished data). The OAC structure molecular was not identified and the antibiotic activity was observed against *Xanthomonas citri* cv. *citri* (Oliveira et al. 2011), *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)-producing (Kerbaux et al. 2016) and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains (Cardozo et al. 2013). Recently, Gionco (2016) reported inhibitory capacity of OAC on five multiresistant isolates of *Acinetobacter baumannii*, an important multiresistant pathogen related with hospital infections.

The secondary metabolites production process of LV strain was established and patented (Andrade 2008), but the compounds production is obtained in low concentrations. This fact represents high production costs limiting the viability of the application for both pilot-scale and field experiments. Therefore, in this study the objective was determine the new culture conditions to enhanced the production of the metabolites of interest produced by the LV strain, using response surface methodology (RSM).

2. Materials and methods

2.1 Bacterial strain

P. aeruginosa LV strain is deposited in the Culture Collection of the Microbial Ecology Laboratory, Londrina State University, Brazil and kept in glycerol stocks (40%) and stored at -20°C.

2.2 Preparation of standards

2.2.1 Growth condition and metabolites production

The production of metabolites was according to patented procedure PI0803350-1 (Andrade 2008). The LV strain was activated on agar plates in nutrient agar plus copper chloride (%w/v): peptone 0.5; meat extract 0.3; CuCl₂.2H₂O 0.01, and agar 15; pH 7.0, and incubated at 28 °C per 24 hours. Aliquots of 50 µL cell suspension in log phase (O.D._{590 nm} = 0.09 = 10⁸ CFU mL⁻¹) was inoculated into fermentation vessels (Thermo Scientific Nalgene polycarbonate carboy, 10 L) containing 5.0 L of nutrient broth named as basic culture medium (BCM) (%w/v): peptone 2.0; meat extract 1.2; CuCl₂.2H₂O, 0.005; with pH 6.8 and sterilized (121°C, 20 psi, 20 min.). The fermentation vessels were kept in room at 28°C

during 10 days with micro-filtered air continuously supplied. The culture was centrifuged (4.500g, 20 min., 4°C), cell-free culture supernatant was concentrated in a rotary evaporator at 70°C (Rotavapor R 215, Büchi) and 250 mL aliquots of supernatant concentrated were used to extract and purify the metabolites of interest.

2.2.2 Preparation of standards for HPLC analysis

The extraction and purification process of IDC, PCA, PCN, and OAC was performed as previously described (Oliveira et al. 2016). The metabolites were extracted from the cell-free culture supernatant concentrated using two volumes of dichloromethane (250 mL of supernatant and 500 mL of dichloromethane) the extraction was conducted five times. The dichloromethane was evaporated in rota-evaporator under reduced pressure at 40 °C and the product obtained was designated the dichloromethane phase (DP). DP was fractionated using the mobile phase (v/v): hexane (F1); dichloromethane (F2); and ethyl acetate (F3). Fractionation was performed again on F3 fraction using the following phase (v/v): hexane (F3a); hexane-dichloromethane (F3b); dichloromethane (F3c); dichloromethane- ethyl acetate (1:1; F3d). Then F3d fraction was mixed with Silica gel 60 (0.04–0.063mm, Merck) and purified by flash chromatography. The column (50 x 0.8cm) was coupled to a low pressure pump and washed using a mobile phase (v/v) with different proportions of petroleum ether/ dichloromethane/ ethanol (68.5:30:1.5 and 50:40:10). Approximately 1 mL of the eluate was collected in tubes and monitored by TLC. Similar fractions were combined on the basis of TLC analysis and six combined fractions were obtained (F3d.1 to F3d.6). The F3d.3 fraction was again purified by flash chromatography as described above, except the mobile phase was: petroleum ether/dichloromethane/ethanol (68.5:30:1.5), ethyl acetate and ethyl acetate/ethanol (1:1). Fractions of approximately 1 mL were collected in tubes and monitored by TLC. Similar fractions were combined on the basis of TLC analysis, and eight combined fractions were obtained (F3d.3.1 to F3d.3.8). The F3d.3.4 fraction was again purified by flash chromatography as described above, except for the column size (20x0.6cm). Standard stock solutions (4 mg mL⁻¹) were prepared by dissolving appropriate weighed amount of PCA, PCN, OAC and IDC in acetonitrile.

2.2.3 Calibration curves for HPLC analysis

A series of standard solutions were prepared at known concentrations (100, 50, 25, 12.5, 6.25 and 3.125 µg mL⁻¹) by two fold serial dilution of the stock standard solutions. Samples were filtered with 0.22 µm membranes (Macherey-Naguel, reference number 729022, pore

0.2 μm , diameter 15 mm) and the HPLC analysis was carried out using an Agilent Technologies 1260 Infinity equipped with an online vacuum degasser, a QuatPump, an automated injection valve, a UV–VIS detector, and Agilent ChemStation software. The analysis was performed using C18 reversed-phase column (250 mm \times 4.6 mm i.d., 5 μm , Agilent, USA) with modification of a previously described chromatographic method for phenazine derivatives (Dietrich et al. 2006). A 10 μL of sample was taken for HPLC analysis eluted with a mix of 0.1% acetic acid: pure water (A) to acetonitrile (B) at flow rate of 1 mL min^{-1} under the following conditions: 0-2 min, 1-15% B; 2-22 min, 15-83% B; 22-24 min, 83-1% B. Those conditions were kept for 3 min (until 27 min from onset). The detection of OAC, PCA and PCN was at $\lambda = 250$ nm, and IDC was $\lambda = 230$ nm. Running was monitored at 215, 230, 250, 262, 280, 290, 316 and 360 nm with a bandwidth of 4 nm in all cases. The chromatograms for separation of these compounds at 250 nm are shown in Fig 1A. Retention times for IDC, PCA, PCN, and OAC averaged (in min.) 22.4, 19.84, 17.63, and 14.46, respectively. Two analyses were utilized for each point on the calibration curves and all curves had $r^2 > 0.99$. The detection limits were (in $\mu\text{g mL}^{-1}$): PCA, 1.01; PCN, 1.40; OAC 1.61; and IDC, 1.47.

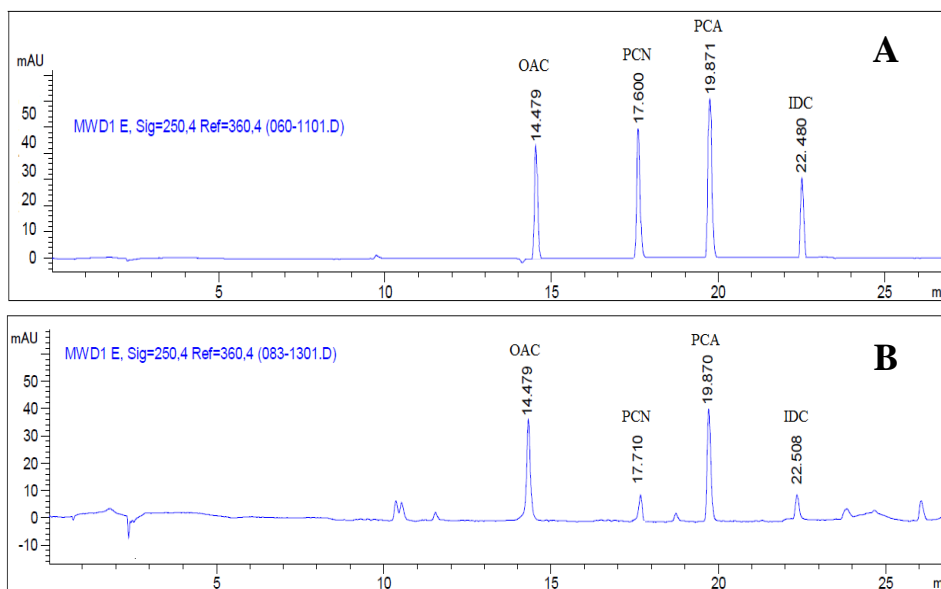


Fig. 1 HPLC chromatogram of a 10 μL aliquot sample. A. Solution in acetonitrile containing ($\mu\text{g mL}^{-1}$): OAC, 30; PCN, 3; PCA, 10; and IDC, 100. B. Sample extracted from BCM (8 days, 4 times concentrated). Detection at $\lambda = 250$ nm.

2.3 Fermentation profiles in the current production system (CPS)

IDC, PCA, PCN and OAC were produced in 10 L fermentation vessels as described in section 2.2.1, also 500 mL shake flask containing 100 mL of BCM incubated at 28°C with an orbital shaker (170 rpm) per 10 days and 2 mL of culture were taken periodically and stored at -20°C and was used to metabolite quantification.

2.4 Preparation of samples for HPLC analysis and metabolite quantification.

The culture was centrifuged (8,000g, 4°C) and free-cell supernatant was acidified with 1M HCL to pH 4.0 – 4.1 and centrifuged again under the same conditions. The metabolites were extracted three times from 2.0 mL of acidified cell-free supernatant using two volumes of dichloromethane (DM). Finally, the DM was removed by a rotary evaporator as described above. The dried solid was solubilized with 0.5 mL of acetonitrile and filtered (0.2 µm, Macherey-Naguel, reference number 729022). A 10 µL aliquot was taken for HPLC analysis as described above and samples were diluted with acetonitrile when necessary (Fig 1B).

2.5 Optimization of the CPS

2.5.1 One-factor-at-a-time (OFAT).

The effects of the inoculum size (% v/v: 0.01, 1, 2, and 4), peptone (g L⁻¹: 1, 2, 5, 10 and 20), meat extract (g L⁻¹: 0.6, 1.2, 2.4 and 5) and CuCl₂.2H₂O (mg L⁻¹: 0, 5, 15, 30 and 50), on the concentrations of IDC, PCA, PCN, and OAC were evaluated. LV strain was cultured in 500 mL flasks containing 100 mL of culture medium as described above, with a tested single factor being changed. The fermentation was carried out on a rotary shaker (Lab Companion IS-971R) per 8 days at 28°C and 170 rpm. All treatments were performed in triplicate and expressed as means ± standard deviation. In order to determine statistical significant difference between treatments (p < 0.05), one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test was performed (Statgraphics Centurion version XVI).

2.5.2 Optimization by Box-Behnken design (BBD).

A three-level Box-Behnken design (BBD) was employed (Box and Behnken 1960). The ranges of values for peptone (g L⁻¹: 2, 13 and 24), meat extract (g L⁻¹: 1, 4 and 7) and CuCl₂.2H₂O (mg L⁻¹: 0, 15 and 30) were selected based on the OFAT experiments. A 15-run BBD, including three replicates for the center point, was applied. Statgraphics Centurion version XVI was used to predict the optimal concentrations of each variable for maximum

IDC, PCA, PCN, and OAC production. A second-order polynomial model was fitted to relate relationship between independent variables and response (Eq. 1). For the three factors, the response function (Y_i) divided into the linear, quadratic and interaction terms as below:

$$Y_i = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \sum_{j>i}^k \beta_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \varepsilon \quad (1)$$

Where Y_i is the predicted response, X_i and X_j represents coded independent variables, β_0 is the population value of the average of all the response values, β_i is the i th linear coefficient, β_{ii} is the i th quadratic coefficient, and β_{ij} is the ij th interaction coefficient. Subscripts i and j takes values from 1 to the number of variables (k).

The relation between the coded level and the actual values of each independent variable was described as:

$$x_i = \frac{X_i - X_0}{\delta X} \quad (2)$$

Where x_i is the coded value and X_i the actual value of an independent variable, X_0 is the value of X_i at the center point and δX is the step change of the variable. All experiments were performed in duplicate. Regression analysis and analysis of variance (ANOVA) was used for fitting the models represented by equation (1) and also to examine the statistical significance of the model terms. The adequacy of the models were determined using model analysis and R^2 (coefficient of determination) analysis. F-Value was determined to check the significance of all the fitted equation at 5% level of significance.

2.5.3 Experimental validation

Four optimum formulations were selected. The resultant experimental values of the responses were quantitatively validated with the predicted values. Additionally, the optimized variables values that yielded the maximum responses were experimentally compared by culturing LV strain in optimized and BCM. The production, extraction and HPLC analysis of IDC, PCA, PCN and OAC was carried out as described above. All treatments were performed in triplicate and expressed as means \pm standard deviation.

2.5.4 Minimum inhibitory concentrations (MIC)

The MIC of OAC against LV strain was determined using a two-fold serial dilution method ($120 - 0.234 \text{ mg L}^{-1}$) in a 96 wells microplate where $50 \mu\text{L}$ of LV strain cells suspension in log phase (10^6 CFU mL^{-1}) cultured in nutrient broth were mixed with $50 \mu\text{L}$ of OAC. The effect of the initial pH (6.8, 7.8 and 8.8) on the MIC value was also evaluated and was considered as positive control a LV cells suspension without OAC and the negative control was a non-inoculated nutrient broth. The microplates were incubated at 28°C for 72 h and the bacterial growth was evaluated each 24 h by measuring the optical density (OD) at $\lambda = 590 \text{ nm}$. To reveal was added in each well $50 \mu\text{L}$ of 2,3,5-triphenyl-2H-tetrazolium chloride (TTC) solution [2 mg mL^{-1}] and after 2 h was observed the color development of the cells was alive. The MIC was obtained by mean values of four independent experiments and it was recorded as the lowest concentration that completely inhibited bacterial growth.

2.6 Establishment and optimization of new production conditions

2.6.1 Growth condition and metabolites production.

The LV strain was inoculated on Petri dishes containing (%w/v): peptone, 0.5; meat extract, 0.3 and agar, 1.5; pH 7.0 and incubated at 28°C per 48 h. Subsequently, a single colony of LV strain in log phase was inoculated in 500 mL shake flask containing 100 mL of BCM, pH 6.8 and incubated at 28°C per 18 h in orbital shaker (170 rpm) and used as inoculum. An initial inoculum size of 1% was used for each experiment related to screening and optimization.

2.6.2 Identifying the significant variables – first screening.

Eleven variables were selected based on both data from published studies (Chincholkar et al. 2013, Spaepen and Vanderleyden 2011, Su et al. 2010, Huang et al. 2009, Yuang et al. 2008, van Rij et al. 2004, Chin-A-Woeng et al. 2001) and own previous studies. All the variables were investigated at two levels: high (+) and low (-) (Table 1). A PBD with 12 assays (carried out in duplicate) was designed and five center points were added for estimating the experimental error (Plackett and Burman 1946). The experimental sequence of the design was randomized in order to minimize the effects of the uncertainties of systematic errors. The effects of each independent variable on the final concentrations of IDC, PCA and PCN were determined as the difference between the average value of the response for the experiments at the high level (+) and the average value for the experiments at the low level (-) using the Yates algorithm (Cavalitto and Mignone 2007).

$$E_i = \frac{\sum R_+}{n} - \frac{\sum R_-}{n} \quad (3)$$

Where E_i is the effect of the independent variable “i”, R_+ and R_- are response at the high (+) and low (-) levels, respectively, and “n” is the number of experiments at each level.

Table 1. Coded and real levels in Plackett–Burman design – first screening

Independent variables	Units	Code	Code levels	
			-	+
Peptone	g L^{-1}	A	1	2
Meat Extract	g L^{-1}	B	0.5	1
Soybean protein	g L^{-1}	C	2	10
Yeast extract	g L^{-1}	D	0	1
Glucose	g L^{-1}	E	2	10
Ethanol	mL L^{-1}	F	2	10
Salt solution ^a	mL L^{-1}	G	0	1
KH_2PO_4	g L^{-1}	H	0	0.5
Tryptophan	mg L^{-1}	I	0	0.05
Temperature	$^{\circ}\text{C}$	J	26	30
Initial pH		K	6	8

^a In g L^{-1} : $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 2.46; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.28; H_3BO_3 , 1.86; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.22; $\text{Na}_2\text{Mo}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.0024; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.034.

Subsequently, the experimental error (σ_{cp}) was estimated from data at central point by using equation 4.

$$\sigma_{\text{cp}} = \sqrt{\frac{\text{SSE}_{\text{cp}}}{a}} \quad (4)$$

Where, SSE_{cp} is the sum of the squared differences between each observation at central point, and “a” is the total number of central points. Finally, the minimum significant factor effect (MIN) was calculated by multiplying “ σ_{cp} ” with the student t-value at an alpha level of 0.2. An effect was considered as significant when the absolute value of E_i was larger than MIN value.

2.6.2 Identifying the significant variables – Second screening.

From the analyses of the data obtained in the first screening, salt solution and tryptophan were discarded, peptone and meat extract were fixed at central point and low level, respectively. Then, a second PBD for seven variables with 12 randomized assays was designed. Table 2 shows the factors under investigation as well as the level of each factor used in the experimental design. The effects of each independent variable on the final concentrations of IDC, PCA and PCN were calculated by the equation 3. Experimental error was estimated by calculating the variance among the dummy variables (V_{Eff}) as (Prajapati et al. 2014):

$$V_{Eff} = \frac{\sum E_d^2}{n} \quad (5)$$

Where E_d is the effect for the dummy variables and “n” is the number of dummy variables used in the experiment. The standard error (σ_d) of dummy variables, that is the square root of V_{Eff} , was used to determine the significance level of each effect as mentioned above.

2.6.3 Optimization by central composite design (CCD).

Soybean protein, glucose, yeast extract, and KH_2PO_4 concentrations were chosen to design, model and optimize the production of IDC, PCA and PCN by RSM (Table 3). The RSM study was performed at Statgraphics Centurion Software Version XVI, and a five-level three-factor central composite design (CCD) was used to investigate the significance of the effect of each independent variable (Box and Wilson 1951). Thirty experiments were proposed by experimental design including 12 axial points, 12 face centered points and 6 replications at center point. The standard error was estimated by calculating the experimental error among the center points (code 0). The data were used to develop a mathematical model of second degree correlating each answer with the independent variables by the Eq. 1.

Table 2. Coded and real levels in Plackett–Burman design – second screening

Independent variables	Units	Code	Code levels	
			-	+
KH ₂ PO ₄	g L ⁻¹	A	0	0.5
Soybean protein	g L ⁻¹	B	2	10
Yeast extract	g L ⁻¹	C	0	1.0
Glucose	g L ⁻¹	D	0	6.0
Ethanol	mL L ⁻¹	E	0	6.0
Temperature	°C	F	28	32
Initial pH		G	7.0	8.0
Dummy I		H	-1	+1
Dummy II		I	-1	+1
Dummy III		J	-1	+1
Dummy IV		K	-1	+1

Table 3. Coded levels and actual values of the independent variables.

Independent variables	Units	Code	Coded level				
			-2	-1	0	+1	+2
Soybean protein	g L ⁻¹	X ₁	0	5	10	15	20
Glucose	g L ⁻¹	X ₂	0	5	10	15	20
Yeast Extract	g L ⁻¹	X ₃	0	0.3	0.6	0.9	1.2
KH ₂ PO ₄	g L ⁻¹	X ₄	0	0.3	0.6	0.9	1.2

2.6.4 Three-level full factorial design.

In many studies, temperature, pH and the interactions are mentioned as a key factors which may affect biomass productivity but also the biosynthesis of metabolites produced by microorganisms (Akkermans et al. 2017, Gonçalves et al. 2017, Wu et al. 2017, Lee et al. 2014). Three-level of full factorial design was chosen to obtain a clear view of the interactions between these parameters. Temperature (28, 32, and 37°C) and initial pH (6.8, 7.4 and 8.0) values were chosen according to the results obtained in screening experiments. All treatments were performed in triplicate and expressed as means ± standard deviation.

2.6.4 Validation.

Two optimum formulations were selected and validated as mentioned in section 2.5.3.

3. Results and discussion

3.1 Fermentation profiles in the CPS

The fermentation profiles in the CPS for both shake flask and fermentation vessels are shown in Fig 2A and B, respectively. The OAC presence was observed in both culture conditions in a late stationary phase. The maximum OAC concentration in shake flask ($6.02 \pm 0.18 \text{ mg L}^{-1}$, OD_{590} of 0.15) and fermentation vessels ($4.25 \pm 0.35 \text{ mg L}^{-1}$, OD_{590} of 0.10) was recorded after 240 h. The PCA was detected after 24 h of culturing in the final phase of growth, significant differences between the final concentrations obtained in shake flask ($0.96 \pm 0.08 \text{ mg L}^{-1}$, OD_{590} of 0.14) and fermentation vessels ($2.97 \pm 0.69 \text{ mg L}^{-1}$, OD_{590} of 0.17) were observed. In shake flasks, the PCN concentration was always lower than 0.35 mg L^{-1} (estimated value based on detection limit) and the maximum IDC concentration was $2.51 \pm 0.10 \text{ mg L}^{-1}$ after 240 h. Instead, in fermentation vessels the IDC concentration was always lower than 0.37 mg L^{-1} (estimated value based on detection limit) and the PCN concentration ranged between (mg L^{-1}) 0.63 ± 0.25 (72 h) and 0.81 ± 0.17 (240 h) (Fig 2A and B). Those differences were probably associated with a low temperature control in the air system and mixing conditions which should formed limited oxygen areas in the fermentation vessels (dead zones). Some Authors observed that 20% of dissolved oxygen (DO) influenced *Pseudomonas* M18G strain growth, and optimized aeration and agitation conditions, increased the PCA concentration (Li et al. 2010). In addition, van Rij et al. (2004) reported the increased of PCN levels at 1% of DO by *P. chlororaphis* PCL1391.

3.2 OFAT experiments

OFAT experiments were performed to evaluate the effects of inoculum size and $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, peptone, and meat extract concentrations on metabolite production in 500 mL shake flasks with 100 mL of culture medium (Figs 3A and B). The inoculum size of 1%v/v increased PCA and PCN production (Fig 3A) and the presence of $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in the culture medium did not affect IDC and PCN production, and decreased PCA level. The OAC was not detected in culture medium without $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and also when the concentration was higher than 30 mg L^{-1} (Fig 3B). Peptone and meat extract showed significant effect on IDC, PCA

and PCN production, OAC was not detected when the peptone concentration was higher than 2 g L^{-1} (Fig 3C) and meat extract higher than 1.6 g L^{-1} (Fig 3D).

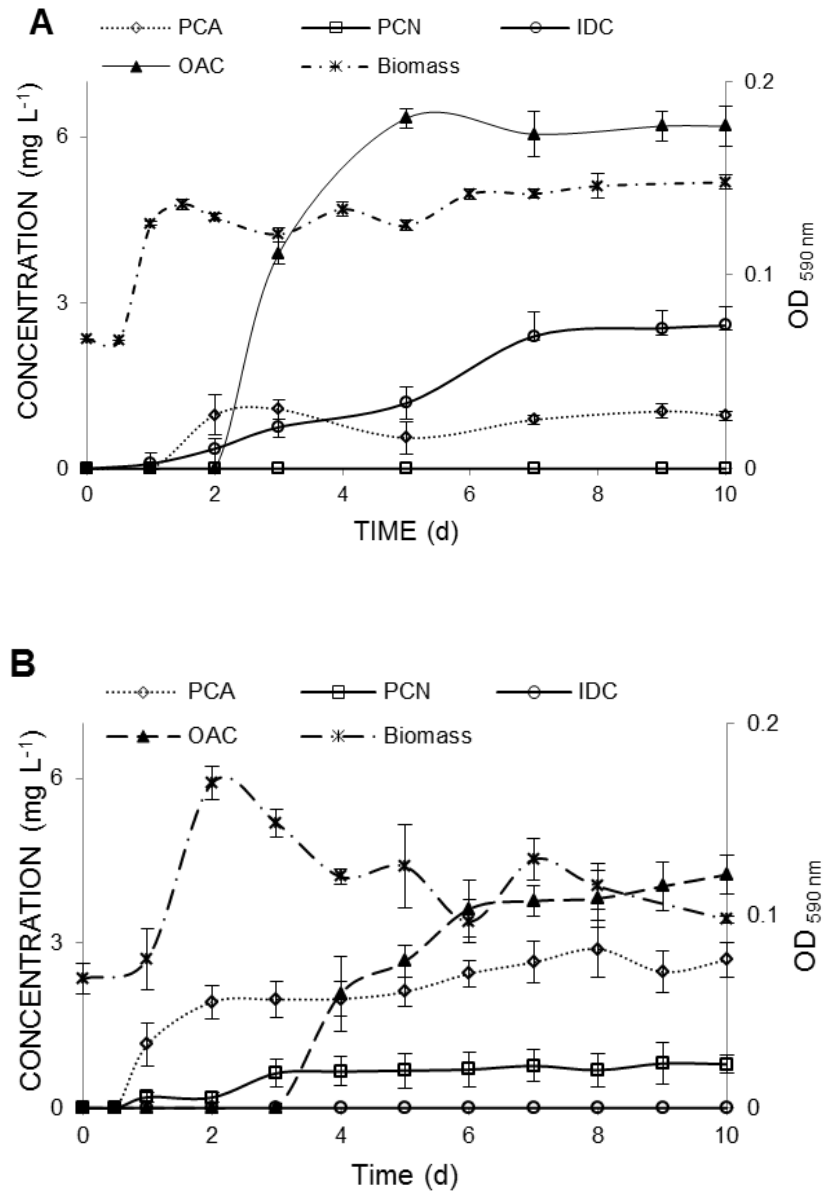


Fig. 2 Fermentation profiles in current production system. (A) 0.5 L shake flask with 100 mL of BCM, (B) 10 L fermentation vessels with 5 L of BCM.

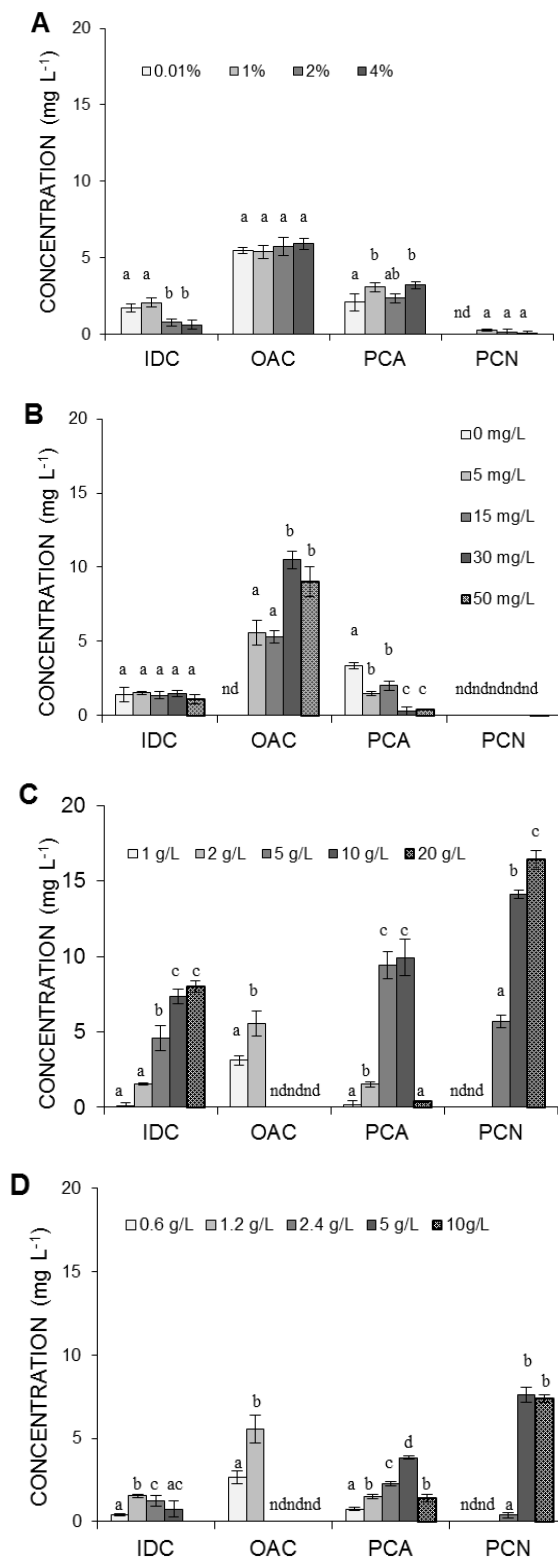


Fig. 3 Effect of inoculum size (A), $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (B), peptone (C), and meat extract (D) concentrations on IDC, OAC, PCA and PCN production. Bars with the same letter are not significantly different ($\alpha = 0.05$) according to Tukey's least significant difference test. Not detected (n.d).

3.3 IDC, PCA and PCN optimization by RSM

In order to optimize the IDC, PCA and PCN production, a BBD with three factors and three levels was performed. The design consisted of 12 factorial points and three central points in a random run order (Table 4). The central points (runs 6, 9, 12) were used to calculate the pure error sum of squares. Neglecting the statistically insignificant terms ($p > 0.05$), the following quadratic regression equation was obtained to describe the IDC (Eq. 6.), PCA (Eq. 7.) and PCN (Eq. 8.) production:

$$Y_1 = 8.495 + 2.4662 X_1 - 0.8368 X_2 - 4.3538 X_1^2 - 0.38 X_1 X_2 + 0.4512 X_2 X_3 \quad (6)$$

$$Y_2 = 6.5034 - 1.0575 X_1 - 0.92 X_2 - 0.595 X_3 - 4.5819 X_1^2 - 0.6919 X_2^2 + 0.44 X_2 X_3 \quad (7)$$

$$Y_3 = 18.3133 + 3.78 X_1 - 0.9012 X_2 + 1.8788 X_3 - 7.6654 X_1^2 - 3.24 X_1 X_2 - 1.8829 X_2^2 - 0.8725 X_2 X_3 - 1.3979 X_3^2 \quad (8)$$

Where Y_1 , Y_2 and Y_3 are IDC, PCA and PCN concentrations (mg L^{-1}); X_1 , X_2 and X_3 represent the coded variables (Eq. 2) of peptone, meat extract and $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, respectively.

The analysis of variance (ANOVA) was carried to test model and the independent variables (data not shown). The adjusted R-square was 0.98, 0.92 and 0.90 to IDC, PCA and PCN respectively, these high enough values indicating that the response should explained by the models obtained (Box and Draper 1987)). The quadratic regression models (Eq. 6, 7 and 8) were significant to predict the IDC, PCA and PCN concentrations.

These results of the regression models, and the actual and predicted values of each dependent variable based on BBD experimental are shown in Table 4. Different combinations of the three factors yielded IDC, PCA and PCN concentrations ranging from (in mg L^{-1}) 0.98, “not detected”, “not detected” and 9.23, 8.53 and 18.67, respectively. Additionally, 3D response surface curves based on the regression models were plotted (Fig 4A, B and C). The optimal concentrations of the independent variables and the maximal concentrations predicted of the dependents variables were determined, thus, the following medium culture compositions were obtained (%w/v): peptone 17 and meat extract 1.0 for IDC production. Peptone 11.7 and meat extract 1.2 to PCA production; and peptone 16.7, meat extract 2.8 and $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.0064 to PCN production.

Table 4. Box-Behnken design (BBD) with the values of the independent variables in natural and coded units in culture of studied LV strain. X_1 = peptone (g L^{-1}), X_2 = meat extract (g L^{-1}), X_3 = $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (mg L^{-1}), Y_1 = IDC, Y_2 = PCA, Y_3 = PCN, Y_4 = OAC.

Standard	Run	Independent Variables			Dependent Variables (mg L^{-1})							
		X_1	X_2	X_3	Y_1^a	Y_1^p	Y_2^a	Y_2^p	Y_3^a	Y_3^p	Y_4^a	Y_4^p
6	1	24 (+1)	4 (0)	0 (-1)	7.17	6.86	1.11	1.13	14.00	15.08	ND	--
9	2	13 (0)	1 (-1)	0 (-1)	9.20	9.68	8.53	7.66	18.54	16.94	ND	--
10	3	13 (0)	7 (+1)	0 (-1)	6.84	7.10	4.15	4.94	15.32	16.88	ND	--
8	4	24 (+1)	4 (0)	30 (+1)	6.09	6.51	0.44	0.37	9.93	10.98	ND	--
4	5	24 (+1)	7 (+1)	15 (0)	5.26	5.31	ND	ND	11.05	8.40	ND	--
13	6	13 (0)	4 (0)	15 (0)	8.21	8.51	6.64	6.66	18.67	18.30	ND	--
11	7	13 (0)	1 (-1)	30 (+1)	9.23	8.97	6.37	5.59	16.49	14.93	ND	--
12	8	13 (0)	7 (+1)	30 (+1)	8.67	8.19	3.75	4.62	9.78	11.38	ND	--
14	9	13 (0)	4 (0)	15 (0)	8.73	8.51	6.41	6.66	17.92	18.30	ND	--
5	10	2 (-1)	4 (0)	0 (-1)	1.81	1.39	3.61	3.68	8.22	7.17	ND	--
3	11	2 (-1)	7 (+1)	15 (0)	0.98	1.14	2.51	1.66	7.84	7.32	2.61	--
15	12	13 (0)	4 (0)	15 (0)	8.59	8.51	6.92	6.66	18.30	18.30	ND	--
1	13	2 (-1)	1 (-1)	15 (0)	2.11	2.06	2.34	3.15	ND	2.64	5.43	--
7	14	2 (-1)	4 (0)	30 (+1)	1.80	2.12	2.08	2.06	4.85	3.77	4.72	--
2	15	24 (+1)	1 (-1)	15 (0)	7.91	7.75	0.53	1.38	16.17	16.69	ND	--

^aActual value, ^pPredicted value, ND.:not detected.

Further experiments were performed to validate the models and specific culture medium for production of IDC (IDCM), PCA (PCAM), and PCN (PCNM) were prepared and the concentrations of the independent variables were established in optimal levels as predicted by the model (Fig 5A, B, C and D). The results were compared with both predicted values and actual values obtained in BCM (Table 5). The concentrations of IDC ($9.27 \pm 0.69 \text{ mg L}^{-1}$, OD_{590} of 0.28), PCA ($6.74 \pm 0.26 \text{ mg L}^{-1}$, OD_{590} of 0.26) and PCN ($18.85 \pm 0.65 \text{ mg L}^{-1}$, OD_{590} of 0.26) obtained in shake flasks under optimal conditions represented (%) 91, 87, and 96 of the predicted values and confirmed the validation of the response model.

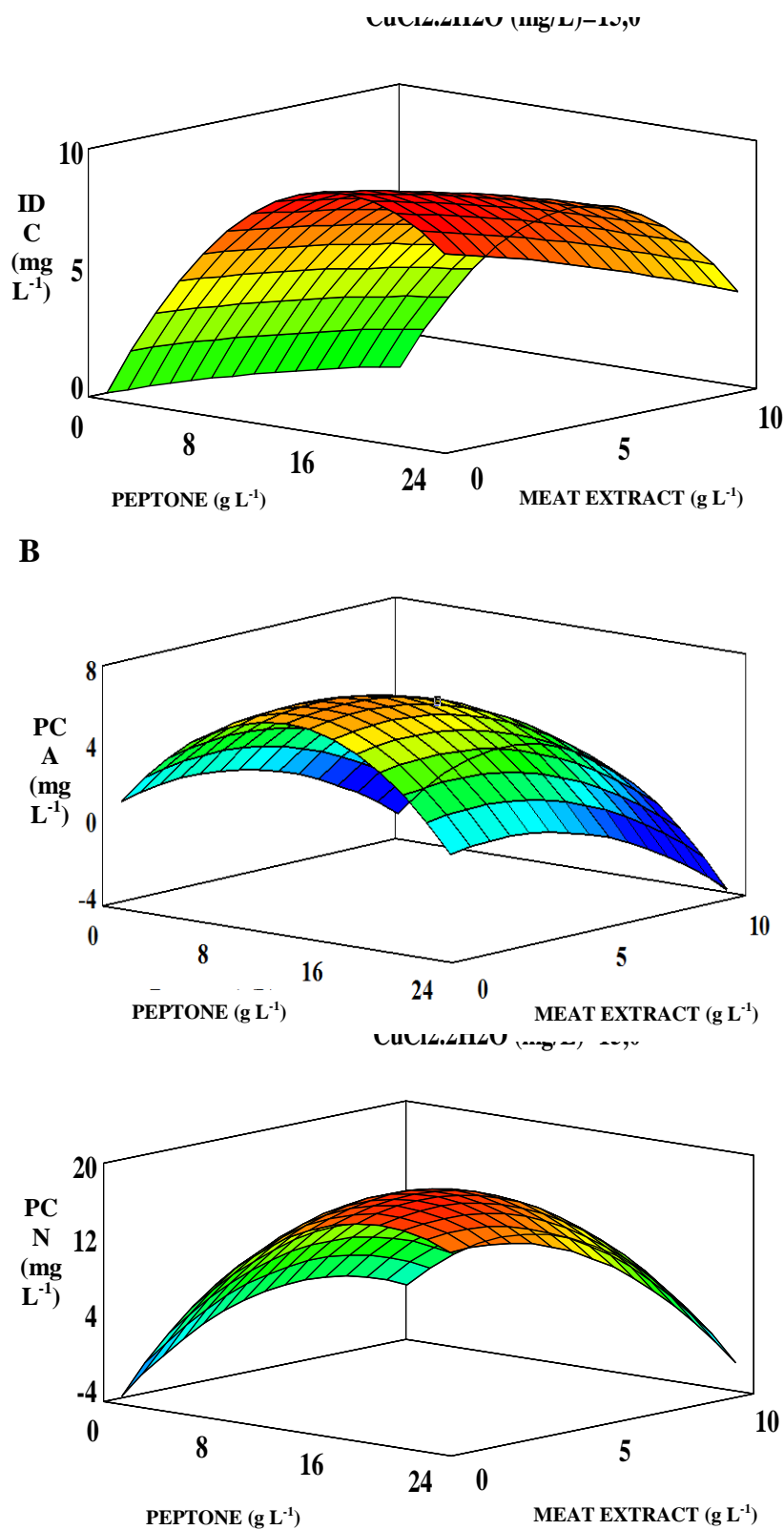


Fig. 4 Response surface plot (3D) showing the effects of two studied independent variables (peptone and meat extract) on IDC (A), PCA (B), and PCN (C) production. $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ was kept constant at a central point (15 mg L^{-1}).

Table 5. IDC, OAC, PCA and PCN concentrations in two current production systems and four optimized production protocols obtained in the present study. S.F (shake flasks). F.V (Fermentation vessel).

Compound	Concentrations (mg L ⁻¹)					%Variation	
	Basic Culture Medium		Optimized Culture Medium			S.F (100 mL)	F.V (5 L)
	S.F (100 mL)	F.V (5 L)	Predicted Value	S.F (100 mL)	F.V (5 L)		
IDC	2.51 ± 0.10	< 0.37	10.23	9.27 ± 0.69	< 0.37	269	---
OAC	6.02 ± 0.18	4.38 ± 1.92	---	11.11 ± 1.05	9.31	84	213
PCA	0.96 ± 0.08	2.97 ± 1.09	7.72	6.74 ± 0.26	5.80	602	95
PCN	< 0.35	0.71 ± 0.31	19.65	18.85 ± 0.65	4.40	>5286	519

Additionally, the concentrations of IDC, PCA and PCN increased in 2.7, 6.0 and 52.9 fold in respect to BCM, respectively. On the other hand, in fermentation vessels OAC, PCA and PCN concentrations increased with respect to BCM and the concentrations were much lower than obtained in shake flasks. As was previously mentioned, was not possible to control temperature, air flow and agitation, which are decisive factors in the scale-up of fermentation processes (Cuello et al. 2017).

The according to the results obtained in the experimental validation, the final concentration of IDC was not significantly different in the culture media IDCM, PCAM and PCNM (Fig 5A). Also, PCN concentrations were not significantly different in PCAM and PCNM (Fig 5C). Then, PCAM was selected as the final optimized culture medium not only for PCA production, and also for PCN and IDC production. The fermentation profiles for both PCAM and OACM are showed in Fig 6A and B, respectively. The time required for the production of each compound was established: eight days to IDC and OAC production, one day to PCA and three days to PCN production.

3.4 OAC production and minimal inhibitory concentration (MIC).

OAC was not detected in the most of RSM optimization experiments (Table 4), because the OAC concentration was not enhanced with peptone and meat extract concentrations higher than found in BCM (Fig 3C and D). Also, OAC was detected after 4 days of culture at the stationary phase (Fig 6B).

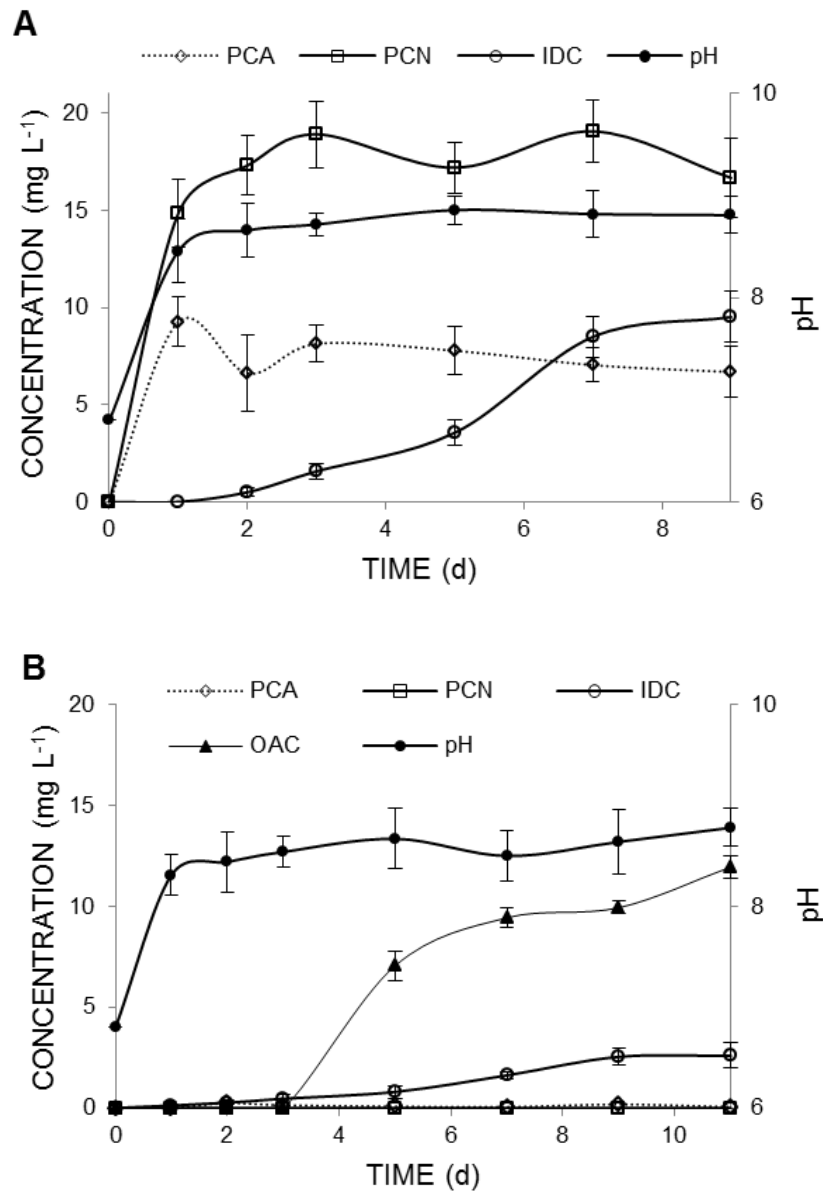


Fig. 6 Fermentation profiles in 0.5 L shake flask with 100 mL of optimized culture medium. (A) PCAM (%w/v: peptone, 1.17 and meat extract, 0.12), (B) OACM (%w/v: peptone, 0.2, meat extract, 0.12 and $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.03).

The highest OAC concentration ($11.11 \pm 1.05 \text{ mg L}^{-1}$, OD_{590} of 0.12) was obtained in OFAT experiments using BCM plus 25 mg L^{-1} of $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Fig 3C and Table 5). The results suggested that OAC biosynthesis by LV strain is likely triggered by starvation conditions. It is known that cells respond with different stress conditions such as low levels of carbon, nitrogen or phosphorus source, including amino acid starvation, triggering the alternative sigma factor RpoS synthesis, the primary regulator of stationary phase genes (Navarro et al. 2010). In Gram-negative bacteria RpoS controls genes that prepare the cell for

survival in crude settings affecting the production of exotoxin A, pyocyanin and pyoverdine by *P. aeruginosa* (Suh et al. 1999).

The reduction of nutrient concentration should increasing the OAC production, and two additional culture medium (in g L⁻¹: peptone 0.6, meat extract 0.36, and peptone, 1.2, meat extract, 0.72) plus 30 mg L⁻¹ of CuCl₂.2H₂O were tested under the same culture conditions. The final concentrations of OAC obtained (1.67 and 2.52 mg L⁻¹, OD₅₉₀ of 0.10 and 0.11, respectively) were lower than those obtained using BCM supplemented with 25 mg L⁻¹ of CuCl₂.2H₂O (11.11 ± 1.05 mg L⁻¹, OD₅₉₀ of 0.12). The results suggested that the low level of OAC produced could be related with the inhibitory effect against LV strain once the OAC showed a high antibiotic effect against many Gram negative bacteria (Munhoz et al. 2017, Murate et al. 2015, Oliveira et al. 2016, Silva et al. 2014).

The MIC of OAC for LV strain was determined in different initial pH (6.8, 7.8 and 8.8) due to the fact that it increases quickly from 6.8 to 8.8 during the first days of culture (Fig 6B), and it has been demonstrated that pH may affect the antibacterial activity of natural compounds and hence MIC values (Li et al. 2014, Olaimat and Holley 2013). At an initial pH value of 8.8, a 50% decline in the MIC value was observed at 24 and 48 h when compared to that at initial pH values of 6.8 and 7.8. This can be explained by the fact that the growth rate of LV strain (expressed as O.D. versus incubation time for positive control samples) was considerably reduced at initial pH 8.8 (Table 6).

Table 6. MIC values of OAC against LV strain at different pH.

Time (h)	MIC (µg mL ⁻¹)			OD _{590nm} (Positive Control)		
	pH 6.8	pH 7.8	pH 8.8	pH 6.8	pH 7.8	pH 8.8
0	---	---	---	0.066 ± 0.008 ^{a*}	0.068 ± 0.009 ^a	0.063 ± 0.006 ^a
24	7.5	7.5	3.75	0.167 ± 0.022 ^a	0.148 ± 0.014 ^a	0.078 ± 0.016 ^b
48	15	15	7.5	0.138 ± 0.013 ^a	0.144 ± 0.019 ^a	0.153 ± 0.020 ^a
72	15	15	15	0.130 ± 0.008 ^a	0.137 ± 0.014 ^a	0.144 ± 0.013 ^a

* Means of OD_{590nm} at each sampling time in the same row with the same letters are not significantly different (p > 0.05).

No difference was observed when compared the MIC in a different pH during the experiment. The MIC values changed during the time, increasing of 7.5 to 15 µg mL⁻¹ in 48 h and 72 h of incubation in any pH. The antibiotic-producing bacteria is innate resistant to the antibiotics produce by itself (Opal and Pop-Vicas, 2015), and the LV strain needs to increase

its resistance to the new environmental stresses generated by OAC. In Gram-negative bacteria, the entrance to the stationary phase is a highly regulated process governed by RpoS involving production of cell envelopes for an effective protection against many stress conditions factors such as oxidative stress, heat shock, osmotic stress, antibiotics presence and pH changes (Navarro et al. 2010). During the process the inner membrane has a highly ordered structure to reduce fluidity (Nystrom 2004), contributing to an intrinsic resistance and increasing the antibiotic resistance (Wang et al. 2015, Alvarez-Ortega et al 2011).

The maximum MIC value of OAC found was between 7.5 and 15 mg L⁻¹ and the high concentration observed in the culture was 11.11 ± 1.05 µg mL⁻¹ in OACM which was the same of MIC. The results suggested that to increase the OAC production we have find different ways as chemical synthesis, random mutation and screening or metabolic engineering tools, which is a key role in a production of many natural compounds (Nielsen and Keasling 2016, Tamano 2014).

3.5 Identifying the significant variables – first and second screening

The PBD was used for screening because it was proved a powerful and useful mathematical tool to reduce the number of input variables in the optimization processes conducting by a small number of experimental trials. The matrix applied in the first screening, the interpretation of the coded levels and the results are shown in Table 7. A considerable fluctuation in the results was observed, where a total IDC, PCA and PCN concentrations ranged from “not detected” to 16.77, 73.02 and 64.49 mg L⁻¹, respectively. Improvement of 0.8 (IDC), 9.8 (PCA) and 2.4 (PCN) times were found with respect to PCNM (Table 5). The results confirm that other factors were required to increase the production of these compounds by LV strain. The main effects of each independent variables on each response, and their statistical significance ($p < 0.2$) were calculated by using the equations 1 and 2, respectively, and the results were represented by Pareto charts (Fig 7A, B and C).

Tryptophan has been reported as main precursor in the biosynthesis of indole-3-acetic acid (IAA) (Spaepen and Vanderleyden 2011) and, their biosynthesis starts with chorismate in the shikimate pathway, a common pathway of the biosynthesis of phenazines (Guttenberger et al. 2017). The addition of tryptophan in the culture medium could induce the production of both phenazines and IDC. However, when tryptophan was added in the culture media no significant effect was observed (Fig 7A, B and C).

Table 7. Plackett-Burman design: first screening. A: peptone (g L⁻¹); B: meat extract (g L⁻¹); C: soybean protein (g L⁻¹); D: yeast extract (g L⁻¹); E: glucose (g L⁻¹); F: ethanol (mL L⁻¹); G: Salt solution (mL L⁻¹); H: KH₂PO₄ (g L⁻¹); I: tryptophan (g L⁻¹); J: temperature (°C); K: initial pH.

Run	Independent variables											Dependent variables		
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	IDC (mg L ⁻¹)	PCA (mg L ⁻¹)	PCN (mg L ⁻¹)
1	2(+1)	0.5(-1)	10(+1)	0(-1)	2(-1)	2(-1)	1(+1)	0.5(+1)	0.05(+1)	26(-1)	8(+1)	12.46	3.84	42.78
2	2(+1)	1(+1)	2(-1)	1(+1)	2(-1)	2(-1)	0(-1)	0.5(+1)	0.05(+1)	30(+1)	6(-1)	7.04	51.22	9.66
3	1(-1)	1(+1)	10(+1)	0(-1)	10(+1)	2(-1)	0(-1)	0(-1)	0.05(+1)	30(+1)	8(+1)	13.33	7.60	42.44
4	2(+1)	0.5(-1)	10(+1)	1(+1)	2(-1)	10(+1)	0(-1)	0(-1)	0(-1)	30(+1)	8(+1)	16.77	63.37	46.18
5	2(+1)	1(+1)	2(-1)	1(+1)	10(+1)	2(-1)	1(+1)	0(-1)	0(-1)	26(-1)	8(+1)	5.06	0.28	60.59
6	2(+1)	1(+1)	10(+1)	0(-1)	10(+1)	10(+1)	0(-1)	0.5(+1)	0(-1)	26(-1)	6(-1)	12.85	1.51	ND
7	1(-1)	1(+1)	10(+1)	1(+1)	2(-1)	10(+1)	1(+1)	0(-1)	0.05(+1)	26(-1)	6(-1)	2.25	ND	6.23
8	1(-1)	0.5(-1)	10(+1)	1(+1)	10(+1)	2(-1)	1(+1)	0.5(+1)	0(-1)	30(+1)	6(-1)	8.74	32.60	64.49
9	1(-1)	0.5(-1)	2(-1)	1(+1)	10(+1)	10(+1)	0(-1)	0.5(+1)	0.05(+1)	26(-1)	8(+1)	ND	11.42	12.89
10	2(+1)	0.5(-1)	2(-1)	0(-1)	10(+1)	10(+1)	1(+1)	0(-1)	0.05(+1)	30(+1)	6(-1)	ND	6.49	1.33
11	1(-1)	1(+1)	2(-1)	0(-1)	2(-1)	10(+1)	1(+1)	0.5(+1)	0(-1)	30(+1)	8(+1)	ND	73.02	19.46
12	1(-1)	0.5(-1)	2(-1)	0(-1)	2(-1)	2(-1)	0(-1)	0(-1)	0(-1)	26(-1)	6(-1)	ND	6.00	4.13
13-17	1.5(0)	0.75(0)	6(0)	0.5(0)	6(0)	6(0)	0.5(0)	0.25(0)	0.025(0)	29.5(0)	7(0)	11.74±2.10	52.80±4.77	79.69±5.16

ND.: not detected

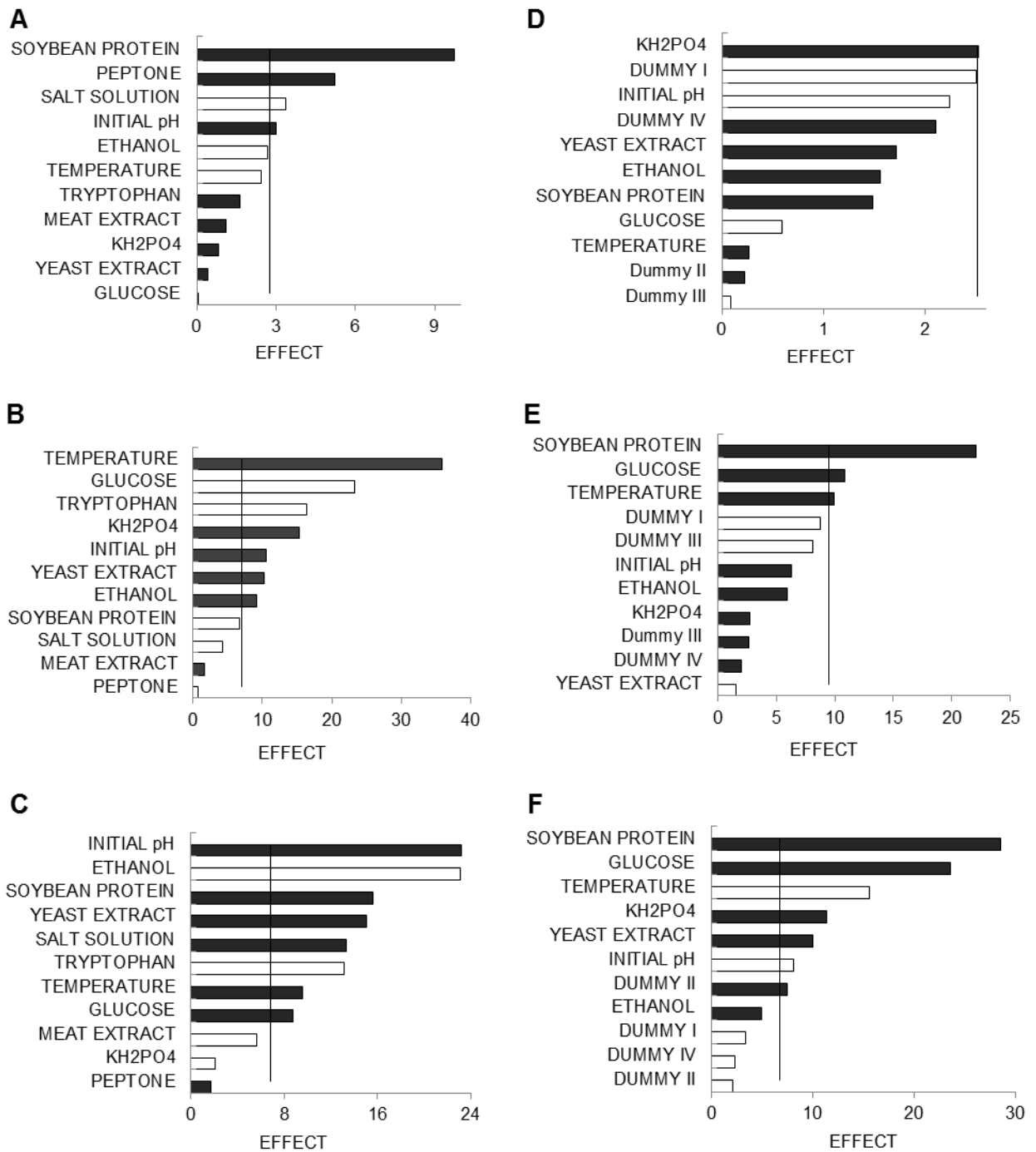


Fig. 7 Pareto charts representing the estimated effects of the independent variables on the final concentrations in the responses. The vertical line on the plot judges the effects that are statistically significant ($p < 0.20$). The bars extending beyond the line correspond to the effects that are statistically significant. At first screening the critical values of minimum significant factor effects were 2.77 (A), 12.33 (B), and 6.81 (C), while at second screening these values were 2.52 (D), 16.70 (E), and 6.72 (F) for IDC, PCA and PCN, respectively. Positive and negative effects are represented by black and white color bars, respectively.

Also, when increased the concentration of meat extract no significant effects on IDC, PCA and PCN concentrations were observed. The concentrations of both culture medium components were fixed at low levels in further experiments. On the other hand, peptone concentration and addition of salts in the culture medium showed only significant positive effects on IDC and PCN concentrations, respectively. Because of this, and because these components are expensive, and the addition of salts makes the culture media manufacturing process more complex, and even less desirable, they were also kept at low levels in further experiments.

The ethanol showed a negative effect on PCA, and enhanced PCN, and no effects on IDC was observed. On the other hand, glucose showed positive, negative, and no effect on PCA, PCN, and IDC, respectively. Hence, aiming to achieve a better understanding of the effects of these two parameters on responses, their intervals were resizing from 2 to 10% in the first screening to 0 to 6% in second. The temperature and yeast extract enhanced PCA and PCN, and no effect on IDC was observed. When the initial pH increased the three compounds also enhanced. Therefore, higher values of these three parameters were explored. The addition of KH_2PO_4 increased PCA and not IDC and PCN concentrations. Finally, soybean protein positively affected IDC and PCA, and little effect on PCN was observed.

In second experiment, the factor ranges were selected based on the analysis of significant effects ($p < 0.2$) found in the first screening. The experimental design matrix and output responses are shown in Table 8. Four dummy factors were introduced to measure the experimental error and to identify variables which may affecting the system (Prajapati et al. 2014). In the seven real factors, only ethanol did not show effect on all response variables (Fig 7D, E and F). Additionally, IDC production was increased when KH_2PO_4 was added (Fig 7D) and no significant effects on the others responses was noticed. Soybean protein and glucose enhanced PCA (Fig 7E) and PCN (Fig 7F), and temperature and initial pH increased PCA and not PCN.

The maximum concentrations of IDC, PCA and PCN decreased by (in %) 22.7, 26.1 and 14.2, respectively, with regard to the results obtained in the first screening. The decline observed was related with some changes made in the amount of peptone and glucose, which enhanced the biosynthesis of compounds in the first screening. Surprisingly, there was an increase in all the minimum concentrations (Tables 7 and 8). This could indicate that those variables that were eliminated (e.g. salt solution) or resized (e.g. ethanol, pH and temperature), from the first to the second screening, were limiting the synthesis of these compounds.

Table 8. Plackett -Burman design: second screening. A: KH_2PO_4 (g L^{-1}); B: soybean protein (g L^{-1}); C: yeast extract (g L^{-1}); D: glucose (g L^{-1}); E: ethanol (mL L^{-1}); F: temperature ($^\circ\text{C}$); G: pH initial; H: dummy I; I: dummy II; J: dummy III; K: dummy IV.

Run	Independent variables											Dependent variables		
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	IDC	PCA	PCN
1	0.5(+1)	10(+1)	0.5(-1)	6(+1)	6(+1)	32(+1)	7(-1)	-1	-1	+1	-1	10.57	53.63	51.04
2	0.5(+1)	2(-1)	1.5(+1)	6(+1)	6(+1)	28(-1)	7(-1)	-1	+1	-1	+1	12.96	32.90	55.36
3	0(-1)	10(+1)	1.5(+1)	6(+1)	0(-1)	28(-1)	7(-1)	+1	-1	+1	+1	7.52	26.63	54.60
4	0.5(+1)	10(+1)	1.5(+1)	0(-1)	0(-1)	28(-1)	8(+1)	-1	+1	+1	-1	9.04	34.29	47.40
5	0.5(+1)	10(+1)	0.5(-1)	0(-1)	0(-1)	32(+1)	7(-1)	+1	+1	-1	+1	9.52	40.86	26.44
6	0.5(+1)	2(-1)	0.5(-1)	0(-1)	6(+1)	28(-1)	8(+1)	+1	-1	+1	+1	6.76	10.33	0.77
7	0(-1)	2(-1)	0.5(-1)	6(+1)	0(-1)	32(+1)	8(+1)	-1	+1	+1	+1	5.08	33.88	3.25
8	0(-1)	2(-1)	1.5(+1)	0(-1)	6(+1)	32(+1)	7(-1)	+1	+1	+1	-1	6.59	10.24	1.68
9	0(-1)	10(+1)	0.5(-1)	6(+1)	6(+1)	28(-1)	8(+1)	+1	+1	-1	-1	3.34	49.29	53.38
10	0.5(+1)	2(-1)	1.5(+1)	6(+1)	0(-1)	32(+1)	8(+1)	+1	-1	-1	-1	4.58	29.71	18.21
11	0(-1)	10(+1)	1.5(+1)	0(-1)	6(+1)	32(+1)	8(+1)	-1	-1	-1	+1	10.31	54.90	17.72
12	0(-1)	2(-1)	0.5(-1)	0(-1)	0(-1)	28(-1)	7(-1)	-1	-1	-1	-1	5.41	10.05	0.33

When compared the results among first and second screening, contradictory effects were observed in specific responses. For e.g. glucose concentration decreased PCA production in the first screening (Fig 7B), and increased in the second (Fig 7E). Temperature and initial pH enhanced PCN in the first PBD (Fig 7C), and decreased in the second (Fig 7F). Such contradictions may be present in two-level factorial designs, since the main effects can be heavily confounded with two-factor interactions (Cavazzuti 2013). This could also explain the fact of having registered a positive effect of dummy II on PCN concentrations (Fig 7F), that is, probably the known variables interacted to affect the effect of this factor on the response. In this case, two-level factorial designs are only useful to identify the key input variables affecting the process and not to determine specific amounts in the culture media composition.

The ethanol was discarded in the subsequent experiment, and four nutritional requirements (soybean protein, glucose, yeast extract and KH_2PO_4) were analyzed and optimized by RSM. The physical factors, temperature and initial pH, were fixed at low levels, and studied by three-level full factorial design in further experiments.

3.6 Optimization by central composite design (CCD)

To maximizing the production of IDC, PCA and PCN compounds by LV strain, the levels of soybean protein, glucose, yeast extract and KH_2PO_4 , were determined. Multiple regression analyses were performed in order to fit the experimental concentrations (Table 9) by the Eq. 1. Based on the repeated experiments at central point (Runs 3, 9, 13, 20, 25 and 30) the coefficients of variation to IDC, PCA and PCN were calculated in (in %) 4.3, 5.9 and 4.0, respectively, and low values indicated the reproducibility of the experiments.

The determination coefficients (R^2) were estimated in 0.82, 0.84 and 0.97, indicating that the models were able to explain more than 82, 84 and 97% of the responses observed of IDC, PCA, and PCN, respectively. The F-values were 4.98, 5.44 and 31.96 to IDC, PCA and PCN models were greater than the F-value of 2.42 indicating that all regression were significant at 95% confidence. As shown in Fig 8A, B and C, the model predictions and values showed good agreement which validate the model.

The culture media composition obtained for IDC, PCA and PCN production had the same amount of meat extract and peptone and changed soybean protein, glucose, and yeast extract (Fig. 9) and shows the high influence of soybean protein in the biosynthesis of those compounds evaluated.

Table 9. Central Composite Design (CCD) matrix with the values of the independent variables in natural units. (In g L^{-1}): X_1 = soybean protein, X_2 = glucose, X_3 = Yeast Extract, X_4 = KH_2PO_4 . (In mgL^{-1}):, Y_1 = IDC, Y_2 = PCA, Y_3 = PCN.

Run	Independent Variables				Dependent Variables					
	X_1	X_2	X_3	X_4	Y_1^a	Y_1^p	Y_2^a	Y_2^p	Y_3^a	Y_3^p
1	15	15	0.3	0.3	11.36	11.66	26.67	31.49	49.30	49.31
2	15	5	0.3	0.9	11.41	10.05	25.39	25.60	49.69	54.03
3	10	10	0.6	0.6	12.22	12.24	34.51	37.06	58.60	58.74
4	10	5	0.9	0.3	12.28	12.66	30.73	30.39	43.90	41.02
5	15	5	0.9	0.9	11.65	10.07	15.57	20.41	35.72	33.62
6	5	15	0.9	0.9	7.59	6.97	7.73	15.23	20.45	23.76
7	15	15	0.3	0.9	11.30	9.94	21.06	23.05	39.00	37.24
8	5	5	0.3	0.9	5.80	4.74	6.74	5.50	31.50	29.49
9	10	10	0.6	0.6	12.57	12.24	36.10	37.06	55.35	58.74
10	10	10	0.6	0.0	14.90	13.35	42.47	34.34	52.00	52.49
11	5	15	0.9	0.3	8.09	8.59	10.58	15.82	27.95	25.70
12	10	10	0	0.6	10.40	11.53	32.82	30.53	44.70	43.68
13	10	10	0.6	0.6	11.35	12.24	37.75	37.06	58.68	58.74
14	10	10	1.2	0.6	10.49	11.51	34.15	24.01	24.95	23.38
15	10	20	0.6	0.6	6.86	7.55	32.06	19.77	31.80	28.45
16	0	10	0.6	0.6	3.12	3.18	1.68	-6.72	12.83	7.94
17	5	5	0.9	0.9	6.96	5.80	1.78	2.40	17.30	19.39
18	20	10	0.6	0.6	8.64	10.49	30.00	25.62	45.70	45.88
19	10	0	0.6	0.6	7.01	8.47	17.58	17.44	42.55	43.32
20	10	10	0.6	0.6	12.01	12.24	38.56	37.06	62.44	58.74
21	5	5	0.3	0.3	7.73	8.91	10.30	14.81	36.15	39.70
22	15	15	0.9	0.3	10.82	10.59	19.86	28.07	36.60	39.11
23	5	15	0.3	0.9	7.50	6.45	10.17	15.79	14.31	17.84
24	15	15	0.9	0.9	10.80	9.43	18.94	20.40	31.50	32.85
25	10	10	0.6	0.6	12.14	12.24	40.12	37.06	58.27	58.74
26	5	5	0.9	0.3	9.52	9.40	5.78	10.94	20.10	23.79
27	10	5	0.3	0.3	14.04	12.69	36.36	35.30	67.70	62.08
28	10	10	0.6	1.2	4.32	8.02	21.65	17.35	39.10	36.02
29	5	15	0.3	0.3	8.35	8.64	15.02	17.15	23.00	25.60
30	10	10	0.6	0.6	12.90	12.24	34.96	37.06	57.00	58.74

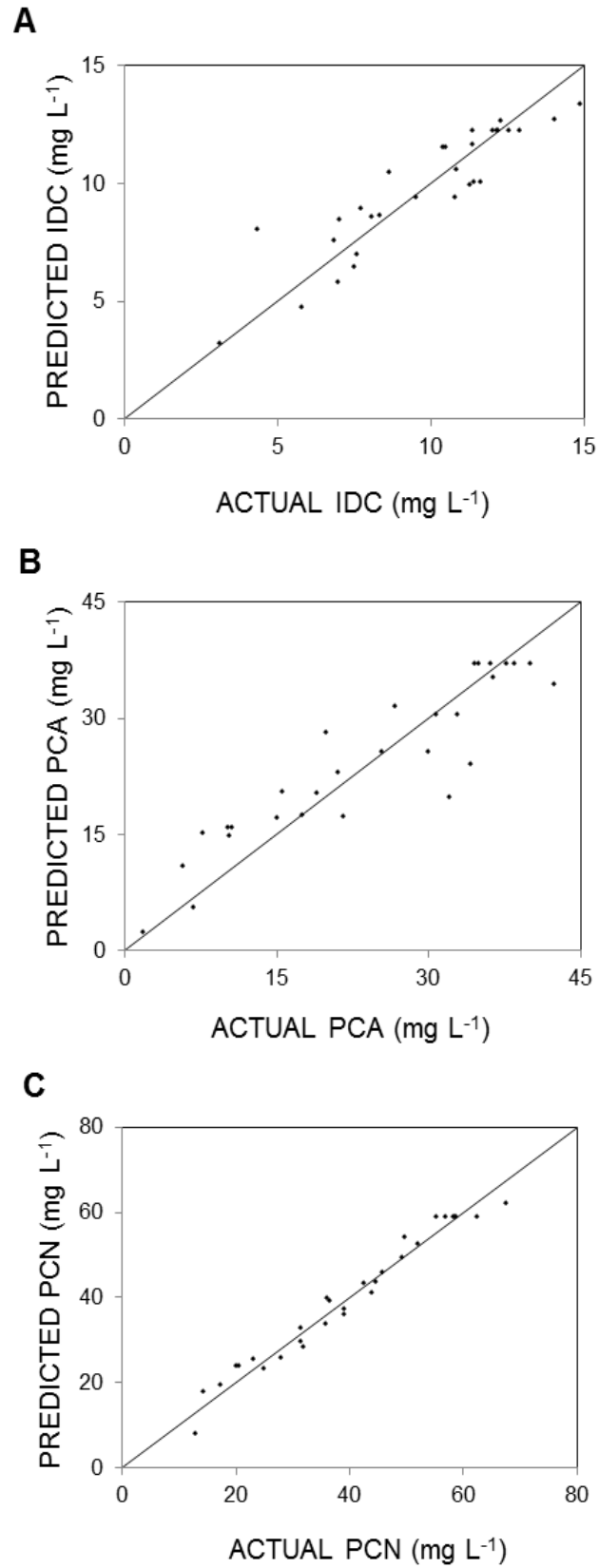


Fig. 8 Correlation between actual values and values predicted by the models for IDC (A), PCA (B) and PCN (C).

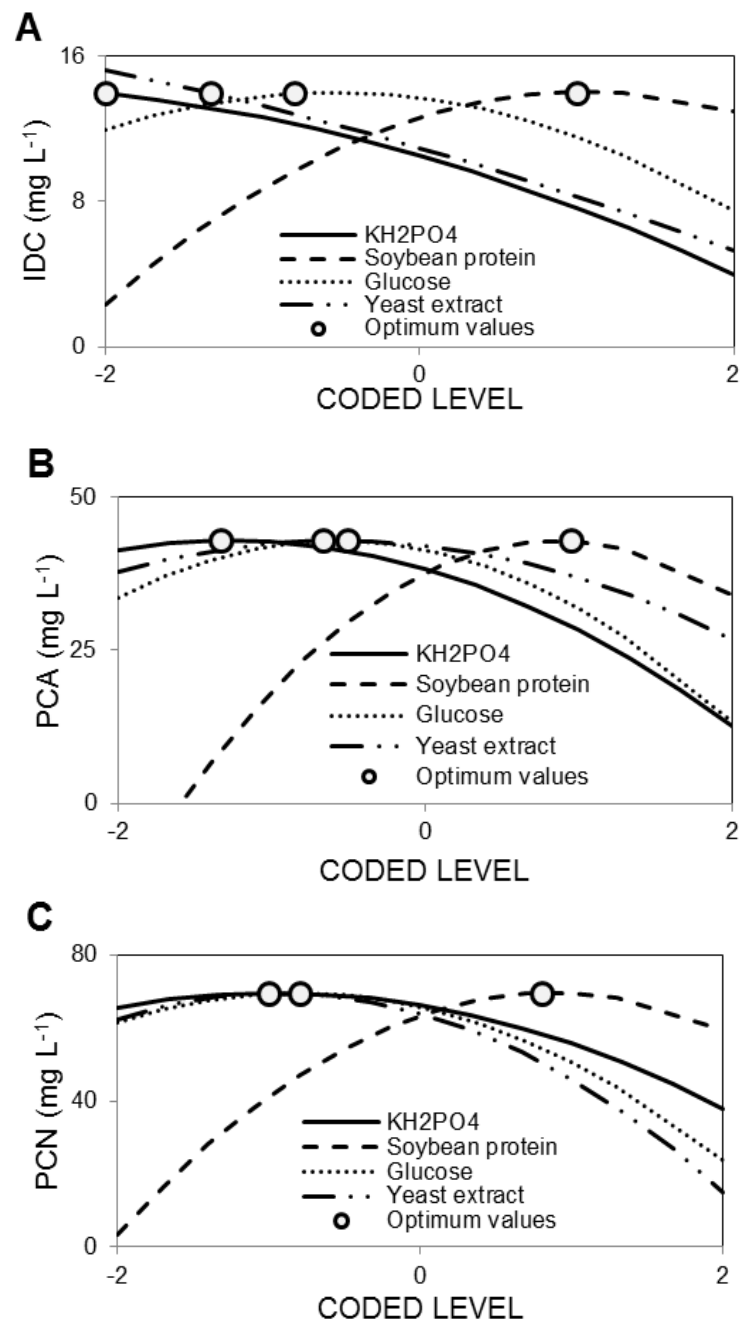


Fig. 9 Variables in each 2D representation were coded (Table 3 and Eq. 5) and positioned at the optimum values of the others. A. IDC_{M2} (%w/v: soybean protein, 1.4, glucose, 0.66 and yeast extract, 0.026), B. PCA_{M2} (% w/v: soybean protein, 1.45; glucose, 0.72; yeast extract, 0.043; and KH₂PO₄, 0.022), C. PCN_{M2} (%w/v: soybean protein, 1.44; glucose, 0.6; yeast extract, 0.032; and KH₂PO₄, 0.031). All the culture medium also containing (%w/v: meat extract, 0.05 and peptone, 0.15). The experiments were conducted for 8 days at 28°C, initial pH 6.8 and 170 rpm

3.7 Validation

The validation experiment was performed to confirm the applicability of the models (Fig 10). The concentrations were (mg L^{-1}): 13.67 ± 0.39 to IDC, 44.56 ± 3.65 to PCA and 60.98 ± 2.92 to PCN. The values corresponded to 101, 104 and 88% of the predicted concentrations, which proved the validity of each model. Concentrations of IDC, PCA and PCN did not show significant differences in all medium tested, once the amount of composition were very close and small variations as expected did not show any influence on the response (Fig 9). In fact, the maximum expected variations, with optimum values were 14, 5.6 and 6.1 (%) for IDC, PCA and PCN concentrations, respectively. In accordance with these results, two adjusted culture media (media A and B), changed only KH_2PO_4 concentration in the culture were selected.

3.8 Effect of temperature and initial pH on the production of IDC, PCA and PCN

The medium B was employed to evaluate the effect of temperature and initial pH on production of IDC, PCA and PCN by a 3^2 full factorial design (Figs 11A, B and C). The two factors were evaluated independently because the interaction of the factors affect the biomass production and metabolites biosynthesis of microorganisms (Dinarvand et al. 2017) and the same effects were observed on the production of IDC, PCA and PCN (Figs 7A, B, C, E and F). The concentrations at 28°C and initial pH 6.8 were (mg L^{-1}) 13.19 ± 1.14 for IDC, 42.21 ± 3.06 for PCA and 58.32 ± 1.81 for PCN, with reduction of 3.5, 2.1 and 4.4% on the maximum concentrations obtained in the validation phase (Eq. 5, 6 and 7). No differences ($p > 0.05$) were found among the values.

The IDC concentration ranged from 11.44 ± 0.88 (37°C , initial pH 7.4) to 14.83 ± 1.40 mg L^{-1} (28°C , initial pH 7.4) indicating that the temperature decreased IDC production (Fig 11A) and no difference was observed when compared with 28°C and initial pH 6.8. PCA production was strongly influenced by temperature, initial pH and the interaction of these factors (Fig 11B). At 32°C and initial pH 6.8, the maximum concentration of PCA was 1.8 fold the optimum value (81.76 ± 2.55 mg L^{-1}) in the validate phase. On the other hand, the PCN was not influenced by initial pH, and decreased with changes in the temperature (Fig 11C). The gene expression pattern involved in the conversion of PCA in others phenazines is temperature-dependent and strain-specific manner at the different temperatures. Huang et al. (2009) demonstrated that the PCA ratio to produce pyocyanin (PYC) (1-hydroxy-5-methylphenazine) reached 105:1 at 28°C and 5:1 at 37°C in *P. aeruginosa* M18, while was only 1:2 at 37°C in *P. aeruginosa* PAO1. In addition, previous studies reported that decreases

in pH from 7 to 6 and decreases in growth temperature from 21 to 16 °C drastically affected the production of PCN by *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 (van Rij et al., 2004).

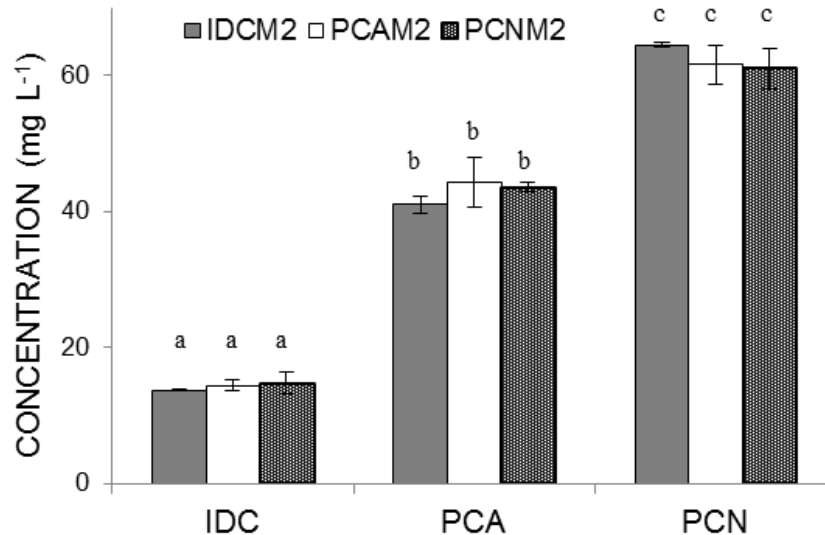


Fig. 10 Validation of the experimental design. Same conditions as in Fig. 9. Bars with the same letter are not significantly different ($\alpha = 0.05$).

3.9 Definition of culture media and fermentation time

The pH 6.8 level was chosen to determine the fermentation time of Medium A and B in two different temperature conditions 28 °C and 32 °C. The synthesis of IDC at 28°C was detected after five days of incubation (Fig 12A and B) and with 32 °C was detected after 3 days of incubation (Fig 12C and D). The maximum concentration was observed after eight days and no significant differences were observed when compared all incubation times. As expected, PCA and PCN production was influenced by temperature and the higher concentrations of PCA were recorded at 32°C while PCN was at 28°C.

The addition of KH_2PO_4 in the culture medium reduced PCA and increased PCN level. Earlier studies reported that the production of phenazines by *Pseudomonas* strains was significantly influenced by phosphate concentration. Ingledew and Campbell (1969), and Turner and Messenger (1986) found that phosphate deficiency enhanced PYC synthesis using *P. aeruginosa*. In contrast, van Rij et al. (2004) observed that *P. aeruginosa* and *P. chlororaphis* PCL1391, PYC and PCN production, increased in the medium contains intermediate level of phosphate. Different effects of physical and chemical factors on *Pseudomonas* strains were observed once the environmental conditions influence the metabolites production (Bhattachayya and Jha 2012). Recinos et al. (2012) found that the

expression of both *phz1* and *phz2* operons, which are involved in the biosynthesis of PCA and derivatives by *P. aeruginosa* (Cui et al. 2016, Blankenfeldt and Parsons 2014), and the expression was environment-dependent and played differential roles in the pathogenicity of *P. aeruginosa* PA14.

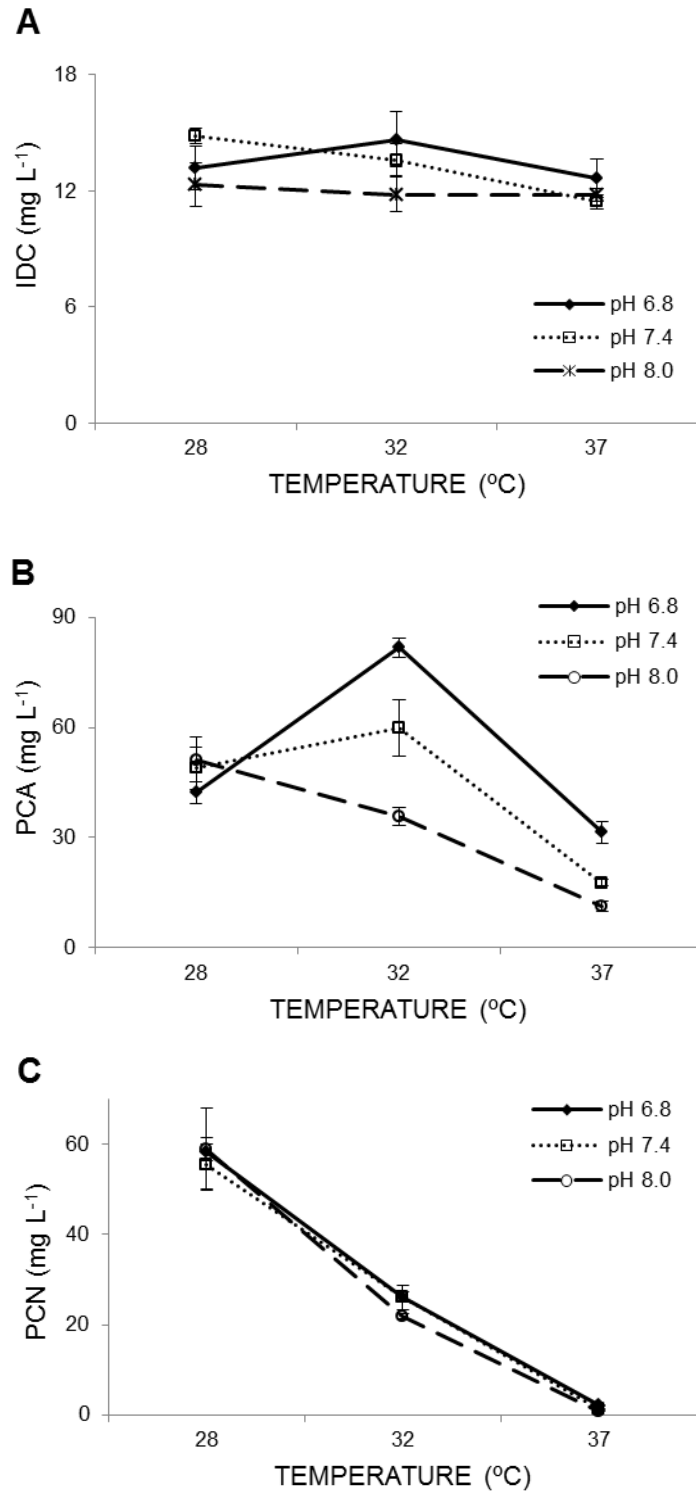


Fig. 11 Effect of temperature and initial pH on the final concentration of IDC (A), PCA (B) and PCN (C). Medium B was used. The samples were taken after 8 d.

The optimum concentrations obtained in this study are summarized in Table 10. Medium A at 28°C was selected to IDC production with an expected concentration of 15.50 mg L⁻¹ at 8 days of fermentation (Fig 12A), while at 32°C was selected to PCA production with an expected concentration of 113 mg L⁻¹ at 3 days of fermentation (Fig 12C). The Medium B at 28°C was selected to PCN production with an expected concentration of 177 mg L⁻¹ at 5 days of fermentation (Fig 12B). In shake flask, the concentration increased more than 5 (IDC), 117 (PCA) and 506 (PCN) fold when compared with the final concentrations in BCM. The increments were greater than 42 (IDC), 38 (PCA) and 250 (PCN) fold when compared with the current system production in 10 L fermentation vessels.

Table 10. IDC, PCA and PCN concentrations in current production system and optimized production protocols obtained in the present study. S.F (shake flasks). F.V (Fermentation vessel).

Compound	Concentrations (mg L ⁻¹)				Variation (%)	
	Basic Culture Medium		Optimized Culture Medium		S.F (100 mL)	F.V (5 L)
	S.F	F.V	S.F	F.V		
	(100 mL)	(5 L)	(100 mL)	(5 L)		
IDC	2.51 ± 0.10	< 0.37	15.61 ± 1.26	522	4119	
PCA	0.96 ± 0.08	2.97 ± 2.09	112.89 ± 2.87	11659	3701	
PCN	< 0.35	0.71 ± 1.01	177.31 ± 3.99	>52860	24873	

Several studies have been carried in order to increase phenazines concentrations using fermentation-based production from wild-type and mutant strains. PCN production by *P. Chlororaphis* strain PCL1391 yielded less than 40 mg L⁻¹ in shake flask with modified Vogel Bonner medium (MVB1)-glucose (van Rij et al. 2004). Tan et al. (2016) reported PCN concentrations greater than 900 mg mL⁻¹ by *P. Chlororaphis* strain P3 at optimized fermentation conditions, and greater than 2800 mg mL⁻¹ by mutation breeding of the P3 strain. For their part, PCA production by *P. aeruginosa* strain M18 yielded 20 mg L⁻¹ in shake flask using PPM medium and greater than 4000 mg mL⁻¹ at optimized conditions in fed-batch culture, after being subjected to many processes of genetic manipulation (current industrial strain) (Du et al. 2014, Li et al. 2010, Su et al. 2010, Zhou et al. 2010, Li et al. 2008, Ge et al. 2006). Similarly, Jin et al. (2015) modified the central biosynthetic and secondary metabolic pathways in *P. aeruginosa* strain PA1201 and reported a PCA concentration of 9882 mg L⁻¹ in fed-batch fermentation.

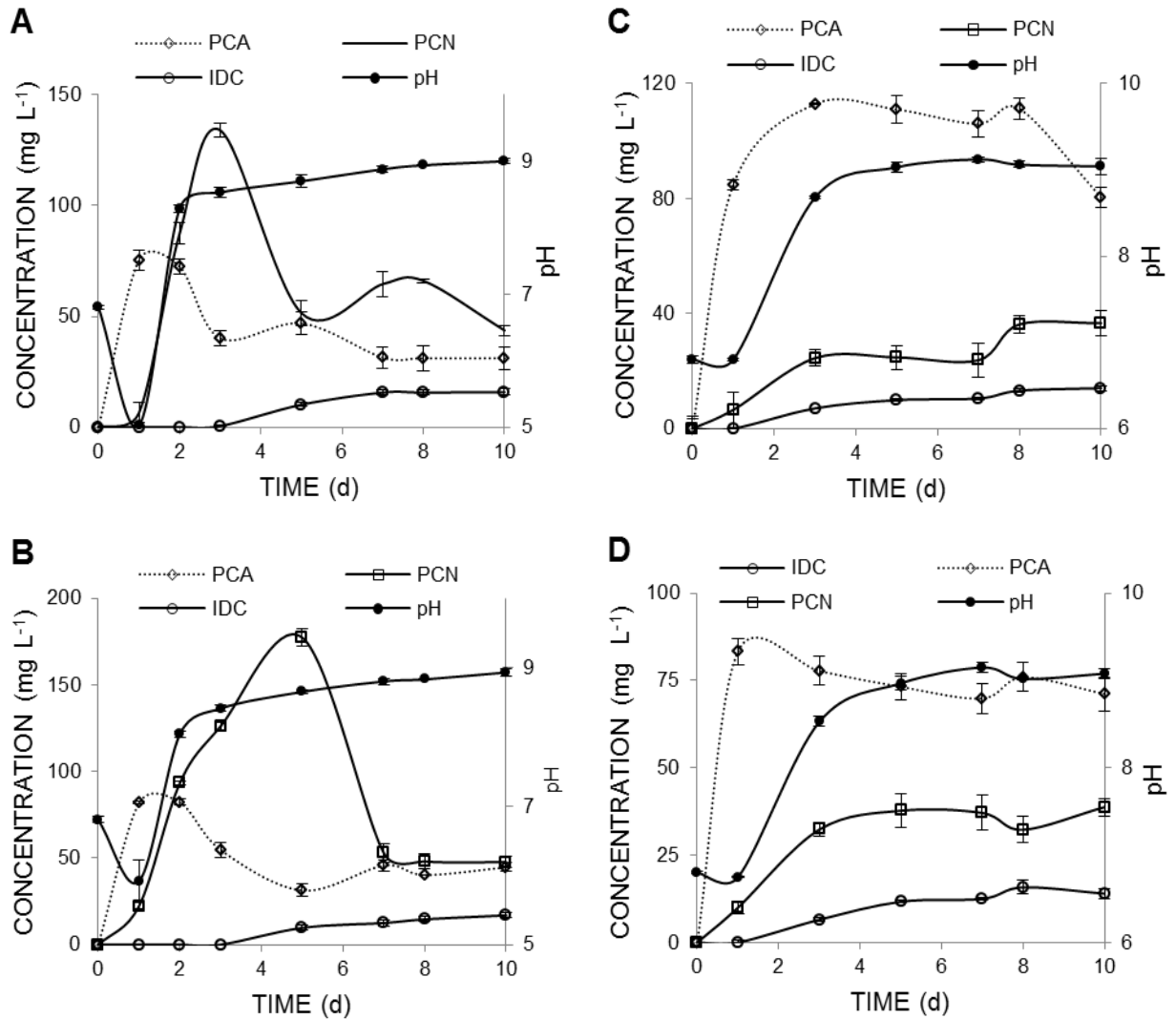


Fig. 12 Fermentation profiles. Medium A at 28°C (a); Medium B at 28°C (b); Medium A at 32°C (c); Medium B at 32°C (d).

4. Conclusion

Two culture conditions were optimized to produce IDC, PCA and PCN compounds by *P. aeruginosa* LV strain using screening experiments and RSM methodology. In shaker with 100 mL of culture medium was produced the same amount of IDC, PCA and PCN as in 4.2, 3.8 and 2.5 L in fermentation vessels, respectively. In addition, PCA and PCN decreased the obtaining time. Consequently, the supernatant downstream process under laboratory conditions (concentration, extraction and purification) improved the obtaining and decreased the cost. The OAC concentration did not increase more than MIC which is obvious. To increase the OAC production further studies need to carry.

5. References

- Akkermans S, Fernandez EN, Logist F, Impe JF (2017) Introducing a novel interaction model structure for the combined effect of temperature and pH on the microbial growth rate. *Int J Food Microbiol* 240: 85-96. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.06.011
- Alvarez-Ortega C, Wiegand I, Olivares J, Hancock R, Martínez JL (2011) The intrinsic resistome of *Pseudomonas aeruginosa* to β -lactams. *Virulence* 2:144-146, 2011.
- Andrade G (2008) Process of production, purification and obtaining of substances with antibiotic activity to control diseases caused by bacteria in plants. BR PI0803350-1A.
- Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP, Villar LS, Escaleira LA (2008) Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5):965-977. doi: org/10.1016/j.talanta.2008.05.019.
- Bhattacharyya PN, Jha DK (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J Microbiol Biotechnol* 28(4):1327–1350. doi: 10.1007/s11274-011-0979-9
- Blankenfeldt W, Parsons JF (2014) The structural biology of phenazine biosynthesis. *Curr Opin Struct Biol* 29:26-33. doi: 10.1016/j.sbi.2014.08.013
- Box G, Behnken D (1960) Some new three level designs for the study of quantitative variable. *Technometrics*, 2(4):455-475. doi: 10.2307/1266454
- Box G, Drapper N (1987) *Empirical model-building and response surfaces* New York: Wiley, pp 669.
- Box, G., and Wilson, K. On the experimental attainment of optimum conditions (1951) *J Roy Stat Soc B Met* 13(1):1-45.
- Cardozo VF, Oliveira AG, Nishio EK, Perugini MR, Andrade CG, Silveira WD, Durán N, Andrade G, Kobayashi RK, Nakazato G (2013) Antibacterial activity of extracellular

compounds produced by a *Pseudomonas* strain against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. *Ann Clin Microb Anti* 12:12. doi: 10.1186/1476-0711-12-12

Cavalitto SF, Mignone CF (2007) Application of factorial and Doehlert designs for optimization of protopectinase production by a *Geotrichum klebahnii* strain. *Process Biochem* 42(2):175-179. doi: 10.1016/j.procbio.2006.07.031

Cavazzuti M (2013) Response surface methodology. In: Cavazzuti M (ed) Optimization methods: from theory to design scientific and technological aspects in mechanics. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, pp 43-76.

Chaudhry H, Serge M, Jin-Feng L, Shi-Zhong Y, Ji-Dong G, Bo-Zhong M (2015) Significant enhancement of *Pseudomonas aeruginosa* FW_SH-1 lipase production using response surface methodology and analysis of its hydrolysis capability. *J Taiwan Inst Chem Eng* 52:7-13. doi:10.1016/j.jtice.2015.02.001

Chin-A-Woeng TF, Bloemberg GV, van der Bij AJ, van der Drift KM, Schripsema J, Kroon B, Scheffer RJ, Keel C, Bakker PA, Tichy HV (1998) Biocontrol by phenazine-1-carboxamide-producing *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 of tomato root rot caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Mol Plant Microbe Interact* 11(11):1069–1077. doi:10.1094/MPMI.1998.11.11.1069

Chin-A-Woeng TFC, Broek D, Voer G, van der Drift K, Tuinman S, Thomas-Oates JE, Lugtenberg BJ, Bloemberg GV (2001) Phenazine-1-carboxamide production in the biocontrol strain *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 is regulated by multiple factors secreted into the growth medium. *Mol Plant Microbe Interact*, 14(8):969-979. doi:10.1094/MPMI.2001.14.8.969

Chincholkar S, Patil S, Prashant S, Makarand R (2013) Fermentative production of bacterial phenazines. In: Chincholkar SB, Thomashow L (ed) Microbial phenazines biosynthesis, Agriculture and Health. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp.88-100.

Cuello JL, Hoshino T, Kuwahara S, Brown CL (2016) Scale-up bioreactor design and culture optimization. In: Eckert CA, Trinh CT (ed) *Biotechnology for biofuel production and optimization*. Elsevier, Amsterdam, pp 497-511.

Cui Q, Lv H, Qi Z, Jiang B, Xiao B, Liu L, Ge Y, Hu X (2016) Cross-Regulation between the *phz1* and *phz2* operons maintain a balanced level of phenazine biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Plos One* 11(1):e0144447. doi: 10.1371/journal.pone.0144447

Dietrich LEP, Price-Whelan A, Petersen A, Whiteley M, Newman DK (2006) The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 61:1308–1321. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05306.x

Dinarvand M, Rezaee M, Foroughi M (2017) Optimizing culture conditions for production of intra and extracellular inulinase and invertase from *Aspergillus niger* ATCC 20611 by response surface methodology (RSM). *Braz J Microbiol* 48(3):427-441. doi:10.1016/j.bjm.2016.10.026

Du X, Li Y, Zhou Q, Xu Y (2014) Regulation of gene expression. in *Pseudomonas aeruginosa* M18 by phenazine-1-carboxylic acid. *Appl Microbiol Biotechnol* 99(2):813-825. doi: 10.1007/s00253-014-6101-0

Ge YH, Pei DL, Li WW, Zhao YH, Xu YQ (2006) Insertional mutation of the gene contributes to alteration in biosynthesis of antifungal agents in *Pseudomonas* sp. M18. *Biol Control* 39 (2):186-192. doi: 10.1016/j.biocontrol.2006.07.010

Gionco B (2016) Analysis of differential gene expression of an environmental strain of *Pseudomonas aeruginosa* producing an organometallic compound bioactive and their activity against multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. Dissertation University of Londrina, Brazil.

Gonçalves L, Piccoli R, Peres A, Saúde A (2017) Predictive modeling of *Pseudomonas fluorescens* growth under different temperature and pH values. *Braz J Microbiol* 48(2):352-358. doi: 10.1016/j.bjm.2016.12.006

Guttenberger N, Blankenfeldt W, Breinbauer R (2017) Recent developments in the isolation, biological function, biosynthesis, and synthesis of phenazine natural products. *Bioorg Med Chem*. doi:10.1016/j.bmc.2017.01.002

Hua Y, Jing Q, Yan J, Jinshao Y, Hui P, Huaming Q, Na Z, Baoyan H (2009) Characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* S6 isolated from oil-containing wastewater. *Proc Biochem* 44(3):302-308. doi:10.1016/j.procbio.2008.11.003

Huang J, Xu Y, Zhang H, Li Y, Huang X, Ren B, Zhang X (2009) Temperature dependent expression of *phzM* and its regulatory genes *lasI* and *ptsP* in rhizosphere isolate *Pseudomonas* sp. strain M18. *Appl Environ Microbiol* 75(20):6568–6580. doi:10.1128/AEM.01148-09

Ingledeu WM, Campbell JJR (1969) A new resuspension medium for pyocyanine production. *Can J Microbiol* 15(6):595-598.

Jain R, Pandey A (2016) Phenazine-1-carboxylic acid producing polyextremophilic *Pseudomonas chlororaphis* (MCC2693) strain, isolated from mountain ecosystem, possesses biocontrol and plant growth promotion abilities. *Microbiol Res* 190:63-71. doi: 10.1016/j.micres.2016.04.017

Jin K, Zhou L, Jiang H, Sun S, Fang Y, Liu J, Zhang H, He YW (2015) Engineering the central biosynthetic and secondary metabolic pathways of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA1201 to improve phenazine-1-carboxylic acid production. *Metab Eng* 32:30-38, 2015.

Johansen HK, Kovesi TA, Koch C, Corey M, Hoiby N, Levison H (1998) *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* infection in cystic fibrosis patients treated in Toronto and Copenhagen. *Pediatr Pulmonol* 26:89-96. doi: 10.1002/(SICI)1099-0496(199808)26:2<89::AID-PPUL3>3.0.CO;2-C

Kerbaui G, Vivan AC, Simões GC, Simionato AS, Pelisson M, Vespero EC, Costa SF, Andrade CG, Barbieri DM, Mello JC, Morey AT, Yamauchi LM, Yamada-Ogatta SF, Oliveira AG, Andrade G (2016) Effect of a metalloantibiotic produced by *Pseudomonas aeruginosa* on *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae*. *Curr Pharm Biotechnol* 17(4):389-397. doi: 10.2174/138920101704160215171649.

Krause J, Tobin G (2013) Discovery, development, and regulation of natural products. In: Kulka M (ed) Using old solutions to new problems - Natural drug discovery in the 21st century, InTech. doi:10.5772/564242013.

Lee SH, Jung JY, Jeon CO (2014) Effects of temperature on microbial succession and metabolite change during saeu-jeot fermentation. Food Microbiol, 38:16-25. doi: 10.1016/j.fm.2013.08.004.

Li Y, Jiang H, Xu Y, Zhang X (2008) Optimization of nutrient components for enhanced phenazine-1-carboxylic acid production by *gacA*-inactivated *Pseudomonas* sp. M18G using response surface method. Appl Microbiol Biotechnol 77(6):1207–1217. doi: 10.1007/s00253-007-1213-4

Li Y, Jiang H, Du X, Huang X, Zhang X, Xu Y, Xu Y (2010) Enhancement of phenazine-1-carboxylic acid production using batch and fed-batch culture of inactivated *Pseudomonas* sp. M18G. Bioresour Technol 101(10):3649-3656. doi: 10.1016/j.biortech.2009.12.120

Li K, Xing R, Liu S, Qin Y, Yu H, Li P (2014) Size and pH effects of chitoooligomers on antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*. Int J Biol Macromol 64:302-305. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2013.11.037

Liste-Calleja L, Lecina M, Cairó JJ (2014) HEK293 cell culture media study towards bioprocess optimization: Animal derived component free and animal derived component containing platforms. J Biosci Bioeng 117(4):471-477. doi: 10.1016/j.jbiosc.2013.09.014

Lopes LP, Oliveira AG, Beranger JP, Góí CG, Vasconcellos FC, San Martin JA, Tardeli CG, Mello JC, Andrade G (2012) Activity of extracellular compounds of *Pseudomonas* sp. against *Xanthomonas axonopodis* in vitro and bacterial leaf blight in eucalyptus. Trop Plant Pathol 37(4):233-238. doi:10.1590/S1982-56762012000400001

Matsuoka CG, Lopes-Santos L, Oliveira JP, Oliveira AG, Spago FR, Andrade G (2013) The control of *Lactobacillus* sp. by extracellular compound produced by *Pseudomonas aeruginosa* in the fermentation process of fuel ethanol industry in Brazil. J Sustainable Bioener Syst 3:194-201. doi: 10.4236/jsbs.2013.33027

Munhoz LD, Pistore J, Oliveira IM, Perez MO, Simionato AS, Goya ET, Rezende MI, Balbi-Peña MI, Oliveira AG, Andrade G (2017) Control of bacterial stem rot on tomato by extracellular bioactive compounds produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain. *Cogent Food & Agriculture*, 3:1282592. doi:10.1080/23311932.2017.1282592.

Murate LS, Oliveira AG, Higashi AY, Barazetti AR, Simionato AS, Santos C, Cavalari G, Oliveira IM, Renan M, Torres MV, Pérez MO, Fogaça V, Nogueira MA, Palazzo JC, Pereira R, Andrade G (2015) Activity of secondary bacterial metabolites in the control of citrus canker. *Agri Sciences* 6:295-303. doi: 10.4236/as.2015.63030

Navarro JM, Tormo A, Martínez-García E (2010) Stationary phase in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 34(4):476-495. doi: 10.1111/j.1574-6976.2010.00213.x

Nie M, Nie H, He M, Lin Y, Wang L, Jin P, Zhang S (2016) Immobilization of biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* NY3 and their application in the removal of hydrocarbons from highly concentrated oil-containing wastewater on the laboratory scale. *J Environ Manage* 173:34-40. doi: 10.1016/j.jenvman.2016.02.045

Nielsen J, Keasling JD (2016) Engineering cellular metabolism. *Cell* 164(6):1185-1197. doi: org/10.1016/j.cell.2016.02.004

Nystrom T (2004) Stationary-phase physiology. *Ann Rev Microbiol* 58:161–181. doi: 10.1146/annurev.micro.58.030603.123818

Olaimat AN, Holley RA (2013) Effects of changes in pH and temperature on the inhibition of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* by Allyl isothiocyanate. *Food Control* 34(2):414-419. doi: 10.1016/j.foodcont.2013.05.014

Oliveira AG, Murate LS, Spago FR, Lopes LP, Oliveira JP, Barrera JA, Nogueira MA (2011) Evaluation of the antibiotic activity of extracellular compounds produced by the *Pseudomonas* strain against the *Xanthomonas citri* pv. *citri* 306 strain. *Biol Control* 56(2):125-131. doi: 10.1016/j.biocontrol.2010.10.008

Oliveira AG, Andrade G, Oliveira MY (2014) Process of production, purification and obtaining of a microbial secondary metabolite, belonging to the family of indolinones, produced by a wild strain of *Pseudomonas aeruginosa*. BR 1020140171738.

Oliveira AG, Spago FR, Simionato AS, Pérez MO, Silva CS, Barazetti AR, Santos C, Torres MV, Tischer CA, San Martin JA, Andrade CG, Novello CR, Mello JC, Andrade G (2016) Bioactive organocopper compound from *Pseudomonas aeruginosa* inhibits the growth of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Front Microbiol*, 7:113. doi:10.3389/fmicb.2016.00113.

Opal SM, Pop-Vicas A (2015) Molecular mechanisms of antibiotic resistance in bacteria. In: Benett JE, Dolin R, Blaser MJ (ed) *Principles and practice of infectious diseases* (8th edn), Mandell Douglas and Bennett's, Philadelphia, pp 235-251.

Plackett RL, Burman JP (1946) The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika* 33: 305–325. doi: 10.2307/2332195

Prajapati VS, Soni N, Trivedi UV, Patel KC (2014) An enhancement of red pigment production by submerged culture of *Monascus purpureus* MTCC 410 employing statistical methodology. *Biocatal Agric Biotechnol* 3(2):140-145. doi: 10.1016/j.bcab.2013.08.008

Rampazo LGL (2004) Evaluation of the effect of biological agents and their products into the incidence of citrus canker lesions. Dissertation, University of Londrina, Brasil.

Recinos DA, Sekedat MD, Hernandez A, Cohen TS, Sakhtah H, Prince AS, Price-Whelan A, Dietrich LE (2012) Redundant phenazine operons in *Pseudomonas aeruginosa* exhibit environment-dependent expression and differential roles in pathogenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(47):19420–19425. doi: 10.1073/pnas.1213901109

Silva FC, Oliveira AG, Lopes-Santos L, Oliveira JP, Torres MV, Simionato AS, Fontequê J, Spago FR, Palazzo JC, Barrera JA, Tardeli CG, Andrade G (2014) Evaluation of antibiotic activity produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain against *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. *Agri Sciences* 5(1):71-76. doi:10.4236/as.2014.51008.

Simionato AS, Navarro MO, Maria LA, De Jesus ML, Barazetti AR, Silva CS, Simões GC,

Balbi-Peña MI, Mello JC, Panagio LA, Almeida RS, Andrade G, Oliveira AG (2017) The effect of phenazine-1-carboxylic acid on mycelial growth of *Botrytis cinerea* produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV Strain. *Front Microbiol* 8:1-11. doi:10.3389/fmicb.2017.01102

Spaepen S, Vanderleyden J (2011) Auxin and plant-microbe interactions. *CSH Perspect Biol* 3(4):a001438. doi: 10.1101/cshperspect.a001438

Stover C, Pham X, Erwin SD, Mizoguchi P, Warren MJ, Hickey FSL (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406(6799):959–964. doi:10.1038/35023079

Su JJ, Zhou Q, Zhang HY, Li YQ, Huang XQ, Xu YQ (2010) Medium optimization for phenazine-1-carboxylic acid production by a *gacA qscR* double mutant of *Pseudomonas* sp. M18 using response surface methodology. *Bioresour Technol* 101(11):4089-4095. doi: 10.1016/j.biortech.2009.12.143

Suh SJ, Silo-Suh L, Woods DE, Hassett DJ, West SE, Ohman DE (1999) Effect of *rpoS* mutation on the stress response and expression of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 181(13):3890–3897.

Tamano K (2014) Enhancing microbial metabolite and enzyme production: current strategies and challenges. *Front Microbiol* 5:718. doi: 10.3389/fmicb.2014.00718

Tan J, Xiong X, Liand W, Peng H, Zhang X (2016) Breeding of a phenazine-1-carboxamid-producing strain by ARTP Mutation and its optimization of fermentation. *Biotechnol Bull* 32(1):174-179.

Turner JM (1986) Occurrence, biochemistry and physiology of phenazine pigment production. *Adv Microb Physiol*, 27(2):11-275. doi:10.1016/S0065-2911(08)60306-9

Upadhyay A, Srivastava S (2011) Phenazine-1-carboxylic acid is a more important contributor to biocontrol *Fusarium oxysporum* than pyrrolnitrin in *Pseudomonas fluorescens* strain Psd. *Microbiol Res* 166(4):323-335. doi: 10.1016/j.micres.2010.06.001

- van Rij ET, Wesselink M, Chin-A-Woeng TFC, Bloemberg GV, Lugtenberg BJJ (2004) Influence of environmental conditions on the production of phenazine-1-carboxamide by *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391. *Mol Plant Microbe Interac* 17(5):557-566. doi: 10.1094/MPMI.2004.17.5.557
- Wang B, Li B, Liang Y, Li Y, Gao L, Chen L, Duan K, Shen L (2016) Pleiotropic effects of temperature-regulated 2-OH-lauroyltransferase (PA0011) on *Pseudomonas aeruginosa* antibiotic resistance virulence and type III secretion system. *Microb Pathog* 91:5-17. doi: 10.1016/j.micpath.2015.11.003
- Wen LI, You-ping XU, Munyampundu JP, Xin XU, Xian-fei QI, Yuan GU, Xin-zhong CAI (2016) Functional identification of phenazine biosynthesis genes in plant pathogenic bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *J Integr Agri* 15(4):812-821, 2016. doi: 10.1016/S2095-3119(15)61176-5
- Wu H, Wang C, Chen P, He A, Xing F, Kong X, Jiang M (2017) Effects of pH and ferrous iron on the coproduction of butanol and hydrogen by *Clostridium beijerinckii* IB4. *Int J Hydrogen Energ* 42(10):6547-6555. doi:10.1016/j.ijhydene.2017.02.094
- Xu S, Pan X, Luo J, Wu J, Zhou Z, Liang X, He Y, Zhou M (2015) Effects of phenazine-1-carboxylic acid on the biology of the plant-pathogenic bacterium *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Pestic Biochem Physiol* 117:39-46. doi: 10.1016/j.pestbp.2014.10.006
- Yuan LL, Li YQ, Wang Yi, Zhang HH, Xu YQ (2008) Optimization of critical medium components using response surface methodology for phenazine-1-carboxylic acid production by *Pseudomonas* sp. M-18Q. *J Biosci Bioeng* 105(3):232-237. doi: 10.1263/jbb.105.232
- Zhou Q, Su J, Jiang H, Huang X, Xu Y (2010) Optimization of phenazine-1-carboxylic acid production by a *gacA/qscR*-inactivated *Pseudomonas* sp. M18GQ harboring *pME6032Phz* using response surface methodology. *Appl Microbial Biotechnol* 86(6):1761–1773. doi: 10.1007/s00253-010-2464-z.