



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ERIKA KUSHIKAWA SAEKI

**EFEITO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA BIOGÊNICAS
SOBRE OS FATORES DE VIRULÊNCIA E SISTEMA
QUORUM SENSING EM *Pseudomonas aeruginosa***

Londrina
2021

ERIKA KUSHIKAWA SAEKI

**EFEITO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA BIOGÊNICAS
SOBRE OS FATORES DE VIRULÊNCIA E SISTEMA
QUORUM SENSING EM *Pseudomonas aeruginosa***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção o título de Doutor em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Gerson Nakazato

Londrina
2021

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

S127e Saeki, Erika Kushikawa .
Efeito das nanopartículas de prata biogênicas sobre os fatores de virulência e Sistema *Quorum Sensing* em *Pseudomonas aeruginosa* / Erika Kushikawa Saeki. - Londrina, 2021.
120 f. : il.

Orientador: Gerson Nakazato.
Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2021.
Inclui bibliografia.

1. Antibiofilme - Tese. 2. Antivirulência - Tese. 3. Nanopartículas metálicas - Tese. 4. Percepção de quorum - Tese. I. Nakazato, Gerson. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 579

ERIKA KUSHIKAWA SAEKI

**EFEITO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA BIOGÊNICAS
SOBRE OS FATORES DE VIRULÊNCIA E SISTEMA
QUORUM SENSING EM *Pseudomonas aeruginosa***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito final à obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Gerson Nakazato
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a. Dr^a. Renata K. T. Kobayashi
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a. Dr^a. Sueli Fumie Yamada Ogatta
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Dr^a. Doroti de Oliveira Garcia
Instituto Adolfo Lutz – CLR IAL de Marília

Prof^a. Dr^a. Lizziane Kretli Winkelströter Eller
Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE

Londrina-PR, 07 de junho de 2021.

Dedico esta tese a minha mãe **Olga Kushikawa Saeki**, por todo amor, dedicação e educação. Que me ensinou a importância da honestidade, amor e perseverância.

Ao **Renan Luiz Barros de Souza**, marido, amigo e companheiro de muitos anos. Por todo amor, compreensão e paciência.

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Estadual de Londrina (UEL)**, ao **Programa de Pós-Graduação em Microbiologia** e aos **Professores**, que contribuíram para a minha formação, aprimoramento e competência na área da Microbiologia, além da oportunidade e apoio técnico-científico.

Ao **Instituto Adolfo Lutz (IAL)** e **Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo (SES)** pela oportunidade de desenvolver a tese de doutorado.

À Diretora Técnica de Saúde II **Mariza Menezes Romão** pelo incentivo e autorização para ingressar no doutorado, conciliando com as atividades do Centro de Laboratório Regional IAL de Presidente Prudente.

Ao Prof. Dr. **Gerson Nakazato** pela excelente orientação, paciência e acolhimento no seu laboratório e grupo de pesquisa. Muito obrigada pela oportunidade, confiança e amizade.

À Profa. Dra. **Renata Katsuko Takayama Kobayashi** pela amizade e acolhimento no grupo de pesquisa. Obrigada pelos conhecimentos compartilhados e pelo aceite para participação da banca de defesa.

Aos Professores Dra. **Sueli Fumie Yamada Ogatta**, Dra. **Lucy Megumi Yamauchi Lioni**, Dr. **Eliandro Reis Tavares** e alunos do Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos (NIP5) por ceder equipamentos e insumos, além de compartilhar os conhecimentos necessários para a realização dos ensaios de Biologia Molecular que foram realizados nesta tese. À Dra. **Sueli Fumie Yamada Ogatta**, em especial, **eu agradeço** pelo aceite em participar desta banca de defesa.

À Pesquisadora Dra. **Doroti de Oliveira Garcia** do Centro de Laboratório Regional Instituto Adolfo Lutz de Marília pela concessão dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* obtidos de pacientes com fibrose cística utilizados neste estudo. Muito obrigada pela colaboração científica, confiança, amizade e pelo aceite para participação da banca de defesa.

À Profa. Dra. **Lizziane Kretli Winkelströter Eller** da Universidade do Oeste Paulista pela colaboração científica, contribuição técnica e pelo aceite para participação da banca de defesa.

As pesquisadoras Dra. **Regina Lúcia Baldini** da Universidade de São Paulo (USP) e Dra. **Laurence G. Rahme** da Universidade de Harvard pela concessão das cepas de referência *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 e PA14.

À pesquisadora Dra. **Laís Anversa** do Centro de Laboratório Regional Instituto Adolfo Lutz de Bauru pela concessão dos isolados ambientais de *P. aeruginosa* obtidos de água de abastecimento público utilizados neste estudo.

À amiga **Anna Carolina Leonelli Pires de Campos**, amiga de longa data, desde 2006 durante a graduação. Obrigada por me apresentar ao NIP3 e ao Prof. Dr. Gerson e a Profa. Dra. Renata. Obrigada por todos os momentos que já compartilhamos juntas.

Aos amigos **Maria Rita Alaniz Porto** e **Pedro Henrique Shigueo Matsubara** pelo acolhimento e hospedagem em Londrina para eu executar os ensaios de Biologia Molecular durante o ano de 2019. Obrigada pela recepção, pela disponibilidade, pela amizade e pelo carinho. Eu serei eternamente grata.

À amiga **Heloísa Moreira Martins** por todo comprometimento e dedicação para padronizarmos o ensaio de qPCR. Pelos dias e noites incansáveis na espera de uma corrida de eletroforese perfeita. Pela amizade e carinho de sempre. Pelos dias de lutas e dias de glórias..rs.. Obrigada por tudo! Você com certeza faz parte desta conquista.

À amiga **Larissa Ciappina de Camargo** pelas companhias de congresso e longas filosofias sobre a vida. É sempre muito bom encontrá-la. Obrigada pela grande amizade!

À amiga **Sara Scandoreiro** por compartilhar todo o conhecimento possível. Obrigada pela recepção no Laboratório NIP3 e por todos os momentos compartilhados. Obrigada pela amizade e por sempre estar disponível.

As amigas da pós-graduação que mesmo não permanecendo em Londrina, acolherem-me com muito carinho. As amigas, **Érica Pelegrin Figueiredo** e **Meiriele da Silva das Neves** que tiveram toda paciência e disponibilidade para o trabalho com as nanopartículas de prata.

A todos os alunos do laboratório NIP3. Obrigada pelo acolhimento. O espírito de equipe é evidente e faz toda a diferença nos dias de hoje. Desejo muito sucesso a todos vocês!

Às alunas e orientadas do Programa de Aprimoramento Profissional (PAP) do Curso de Especialização em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública do Instituto Adolfo Lutz, **Isabela Alves de Souza**, **Amanda Yaeko Yamada** e **Larissa Amianti de Araujo**, no qual participaram na realização dos ensaios fenotípicos para pesquisa de fatores de virulência em *P. aeruginosa*. Obrigada pela contribuição e dedicação. Vocês são ótimas profissionais e desejo muito sucesso a vocês!

A todos os funcionários do IAL de Presidente Prudente que me apoiaram em todo o processo. Em especial, agradeço a **Tatiana Pechin Casati Fava**, **Rita de Cássia Chagas**, **Lusinete Bernardo da Costa Silva** e **Zenaide Martins Gonzaga** que conduziram brilhantemente o Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas durante as minhas ausências no laboratório.

Ao **Renan Luiz Barros de Souza**, marido, companheiro de todos os momentos. Obrigada por me dar força e coragem para enfrentar todos os desafios. Pelo amor, apoio e compreensão na vida pessoal e em toda carreira científica.

À **Melinda Kushikawa Barros**, filha, que se encontra no meu ventre e me acompanhou na etapa de finalização da escrita desta tese. Muito Obrigada por completar e iluminar nossa família abençoada. Estamos ansiosos pela sua chegada.

À minha mãe, **Olga Kushikawa Saeki**, pelo amor, carinho, dedicação e educação. Você sempre será meu maior exemplo de resiliência.

À família Barros de Souza, à minha sogra **Regina Célia Barros** e sogro **Luiz Paulo de Souza e Maria do Carmo Machado** pelo apoio familiar e incentivo.

Aos cunhados **Soraia Barros e Renato Barros, Regiane Sgorlon e Fábio Sgorlon, Paula Regina Barros de Souza e João Paulo Goulart Figueiredo** pelo apoio familiar e incentivo.

Aos sobrinhos **Sofia Barros, Henrique Barros, Alice Barros, Taís Sgorlon e Beatriz Sgorlon** que mesmo a distância faz dos nossos dias mais felizes e nos deixa cheios de saudades.

Ao meu pai **Hiroshi Saeki** (*in memoriam*) e avós **Nobuyuki Kushikawa** (*in memoriam*) e **Toshiko Kushikawa** (*in memoriam*) por todo ensinamento e momentos vivenciados.

E principalmente a **DEUS** pela vida, família abençoada, saúde, conhecimento, proteção e por tudo que conquistei. Por me direcionar nos momentos de alegria, e principalmente nos momentos de aflição e tristeza. Obrigada por tudo dar tão certo na minha vida!

SAEKI, Erika Kushikawa. **Efeito das nanopartículas de prata biogênicas sobre os fatores de virulência e sistema *quorum sensing* em *Pseudomonas aeruginosa***. 2021. 120 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

RESUMO

O estudo dos compostos com atividade antivirulência para o controle da patogenicidade bacteriana estão em destaque na literatura atual. Dentre estes compostos, as nanopartículas de prata são cada vez mais pesquisadas para o controle da disseminação das infecções por *P. aeruginosa*. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito das nanopartículas de prata biogênicas (bio-AgNP) nos fatores de virulência e Sistema *Quorum Sensing* (QS) em *Pseudomonas aeruginosa*. As bio-AgNPs foram sintetizadas pelo método de redução da prata iônica pelo fungo *Fusarium oxysporum* e os ensaios foram realizados com isolados clínicos e ambientais de *P. aeruginosa* e com as cepas de referência PAO1 e PA14. A identificação dos isolados foi realizada por métodos bioquímicos e moleculares e foram determinadas as concentrações inibitórias mínimas (CIM) e bactericidas mínimas (CBM). Os ensaios para avaliar a produção de fatores de virulência (motilidade, ramnolipídeos, protease alcalina, elastase e piocianina) e capacidade de formação de biofilmes foram realizados. O ensaio de RT-qPCR foi realizado para determinar o efeito da bio-AgNP nos genes reguladores de QS (*lasI*, *lasR*, *rhlI*, *rhlR*, *pqsA* e *mvfR*). As CIM variaram de 15,62-62,50 μM , e a CBM foi de 125 μM para PAO1 e PA14. Os resultados mostraram que as concentrações subinibitórias (1/2 CIM) de bio-AgNP (7,81 a 31,25 μM) aumentaram significativamente ($p < 0,050$) as motilidades *swarming*, *swimming* e *twitching*, em 40,0%, 40,0% e 46,7% nos isolados clínicos e ambientais, respectivamente. Observou-se que a bio-AgNP aumentou significativamente ($p < 0,050$) a capacidade de formação de biofilmes em um isolado de paciente com fibrose cística. O tratamento com as concentrações subinibitórias de bio-AgNPs em PAO1 não afetou a produção de protease e biofilme. Entretanto, houve redução significativa ($p < 0,05$) na motilidade e na produção de ramnolipídeos e elastase. Na cepa PA14 houve estímulo na motilidade *swarming* e *twitching*, além da produção de elastase, piocianina e formação de biofilme. Os tratamentos com bio-AgNPs também aumentaram a expressão ($p < 0,05$) dos genes controladores do sistema QS em *P. aeruginosa* PAO1 e PA14. Conclui-se que o tratamento com concentrações subinibitórias de bio-AgNPs favoreceu o aumento fenotípico na maioria dos fatores de virulência testados. As cepas PAO1 e PA14 apresentaram diferentes respostas ao tratamento com as bio-AgNPs. A exposição bacteriana as baixas concentrações de bio-AgNPs pode promover o aumento na expressão dos genes reguladores do Sistema QS em *P. aeruginosa*. Por isso, a aplicação das bio-AgNP na terapia antibiofilme e antivirulência precisa ser avaliada com cautela, para que os compostos sejam utilizados na concentração adequada, o sistema QS seja definitivamente interrompido e os fatores de virulência sejam controlados.

Palavras-chave: antibiofilme; antivirulência; nanopartículas metálicas; nanotecnologia; percepção de quorum.

SAEKI, Erika Kushikawa. **Effect of biogenic silver nanoparticles against the virulence and quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa***. 2021. 120 p. Thesis (Doctorate degree in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

ABSTRACT

The study of compounds with antivirulence activity to control bacterial pathogenicity are highlighted in the current literature. Among these compounds, silver nanoparticles are increasingly being researched to control the spread of *P. aeruginosa* infections. This study aimed to assess the effects of biogenic silver nanoparticles (bio-AgNPs) on virulence factors and quorum sensing (QS) in *Pseudomonas aeruginosa*. Bio-AgNPs were synthesized by *Fusarium oxysporum* through reduction of ionic silver. Clinical and environmental isolates, as well as reference strains (PAO1 and PA14), were tested. Isolates were identified by biochemical and molecular methods. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC), production of virulence factors (motility, rhamnolipids, alkaline protease, elastase, and pyocyanin), and biofilm formation were assessed. RT-qPCR was performed to determine the effect of bio-AgNPs on PAO1 and PA14 QS regulatory genes (*lasI*, *lasR*, *rhlI*, *rhlR*, *pqsA*, and *mvfR*). MICs ranged from 15.62 to 62.50 μM , and the MBC for PAO1 and PA14 was 125 μM . Subinhibitory concentrations (1/2 MIC) of bio-AgNPs (7.81–31.25 μM) significantly increased ($p < 0.05$) swarming, swimming, and twitching motilities in clinical and environmental isolates, by 40.0, 40.0, and 46.7%, respectively. Bio-AgNPs significantly enhanced ($p < 0.05$) biofilm formation in an isolate from a patient with cystic fibrosis. Treatment of PAO1 with bio-AgNPs did not affect protease or biofilm production. However, there was a significant reduction ($p < 0.05$) in motility and rhamnolipid and elastase production. In PA14, bio-AgNPs enhanced swarming and twitching motilities as well as elastase, pyocyanin, and biofilm production. Bio-AgNP treatments increased the expression ($p < 0.05$) of QS regulatory genes in PAO1 and PA14. It was concluded that treatment with subinhibitory concentrations of bio-AgNPs increased the phenotypic expression of most of the tested virulence factors. PAO1 and PA14 showed different responses to bio-AgNP treatment. The results suggest that bacterial exposure to low concentrations of bio-AgNPs may enhance expression of QS regulatory genes in *P. aeruginosa*. Therefore, the application of bio-AgNP in antibiofilm and antivirulence therapy needs to be evaluated with caution, so that the compounds are used in the appropriate concentration, the QS system is definitively interrupted and the virulence factors are controlled.

Keywords: anti-biofilm; anti-virulence; metallic nanoparticles; nanotechnology; quorum sensing.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 – Imagens dos tipos de motilidade realizados por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 em ágar <i>swarming</i> , ágar <i>swimming</i> e ágar <i>twitching</i> , respectivamente.	22
Figura 2 – Representação esquemática dos diferentes sistemas de secreção encontrados na cepa <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1.....	24
Figura 3 – Esquema do ciclo de vida da formação de biofilmes bacterianos..	26
Figura 4 – Esquema resumido do Sistema <i>Quorum Sensing</i>	27
Figura 5 – Estrutura química das moléculas de sinalização do Sistema <i>Quorum Sensing</i>	29
Figura 6 – <i>Quorum sensing</i> em <i>Vibrio fischeri</i>	30
Figura 7 – Representação esquemática dos Sistemas <i>Quorum Sensing</i> em <i>P. aeruginosa</i> (<i>las</i> , <i>rhl</i> e <i>pqs</i>) e sua respectiva regulação.	33
Figura 8 – Mecanismos propostos para resistência aos antimicrobianos em <i>P. aeruginosa</i>	39
Figura 9 – Mecanismos antibacterianos de nanopartículas de prata.....	40

ARTIGO 1

Figura 1 – Estrutura química dos sinalizadores de QS.....	57
Figura 2 – <i>Quorum Sensing</i> em <i>Vibrio fisheri</i>	58

ARTIGO 2

Figura 1 – Eletroforese em gel de agarose (1,0%) dos isolados de <i>P. aeruginosa</i> que apresentaram produtos de PCR amplificados para o gene <i>oprL</i> (209 pb).....	65
Figura 2 – Caracterização por microscopia eletrônica de transmissão (MET) de bio-AgNP sintetizado por <i>Fusarium oxysporum</i> (300.000×).	66
Figura 3 – Motilidade em <i>P. aeruginosa</i> na ausência (controle) e na presença de nanopartículas de prata biogênicas (bio-AgNP).....	67
Figura 4 – Capacidade de formação de biofilmes em cepas de referência (PAO1 e PA14) e isolados de <i>P. aeruginosa</i> na ausência e presença de nanopartículas de prata biogênicas (bio-AgNP).....	68

ARTIGO 3

Figura 1 – Curva de crescimento de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 (A) e PA14 (B) em concentrações subinibitórias de bio-AgNP.....	98
Figura 2 – Efeito das nanopartículas de prata biogênicas na motilidade <i>swarming</i> , <i>swimming</i> e <i>twitching</i> em <i>P. aeruginosa</i> PAO1 e PA14	99
Figura 3 – Efeito das nanopartículas de prata biogênicas nos fatores de virulência de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 e PA14.....	100
Figura 4 – Expressão relativa dos genes reguladores do Sistema <i>Quorum Sensing</i> após tratamento com nanopartículas de prata biogênicas	101

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1 – Exemplos de fatores de virulência e seus efeitos no hospedeiro.	23
Tabela 2 – Sistema <i>Quorum sensing</i> e os fenótipos relacionados em bactérias Gram-negativas.	31
Tabela 3 – Sistema <i>Quorum sensing</i> de <i>P. aeruginosa</i> e os fatores de virulência relacionados.	34

ARTIGO 1

Tabela 1 – Sistema <i>Quorum Sensing</i> e seus fenótipos relacionados em bactérias Gram-negativas.	58
Tabela 2 – Sistema <i>Quorum Sensing</i> e seus fenótipos relacionados em bactérias Gram-positivas.	59
Tabela 3 – Plantas como inibidores de QS.	59

ARTIGO 2

Tabela 1 – Cepas e isolados bacterianos de <i>P. aeruginosa</i> (isolados ambiental, não-FC e FC), concentração inibitória mínima e $\frac{1}{2}$ CIM de bio-AgNP utilizados neste estudo.	64
Tabela 2 – Motilidades <i>swarming</i> , <i>swimming</i> e <i>twitching</i> em cepas de referência (PAO1 e PA14), isolados ambientais e clínicos na presença e ausência de nanopartículas de prata biogênicas (bio-AgNP) a $\frac{1}{2}$ CIM.	66

ARTIGO 3

Tabela 1 – Lista de genes e seus respectivos iniciadores utilizados no ensaio de RT-qPCR.	97
Tabela 2 – Formação do biofilme em <i>P. aeruginosa</i> após o tratamento com diferentes concentrações subinibitórias de nanopartículas de prata.	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
<	Menor
>	Maior
±	Mais ou menos para indicar desvio padrão
≤	Menor e igual
≥	Maior e igual
β	Beta
α	Alfa
°C	Graus Celsius
°GL	Grau Gay Lussac
3OC ₁₂ -AHL	N-(3-oxododecanoil)-L-homoserina lactona
μL	Microlitros
μM	Micromolar
AMB	Ácido antimetabólito L-2-amino-4metoxi-trans-3-butenóico
Ag ⁰	Prata metálica
Ag ⁺	Íon prata
AgNO ₃	Nitrato de prata
AHL	N-acil homoserina lactona
AI-2	Autoindutor furanosil borato diéster
AgNP	Nanopartícula de prata
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AuNP	Nanopartícula de ouro
bio-AgNP	Nanopartícula de prata biogênica ou biológica
BR	Brasil
C ₄ -AHL	N-butiril-L-homoserina lactona
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
CBM	Concentração bactericida mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CLR-IAL-PP	Centro de Laboratório Regional Instituto Adolfo Lutz de Presidente Prudente
CIM	Concentração inibitória mínima
COVID-19	<i>Coronavirus disease 2019</i>

CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
CuO	Óxido de cobre
DE	Alemanha
DNA	Ácido desoxirribonucleico
eDNA	Ácido desoxirribonucleico extracelular
ESBL	Beta-lactamase de espectro ampliado
EUA	Estados Unidos da América
FC	Fibrose cística
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IQS	2-(2-hidroxifenil)-tiazol-4-carbaldeído
LasI	Molécula sinal sintase
LasR	Regulador transcricional
LecA	Lectina A
LecB	Lectina B
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolissacarídeo
LuxI	Molécula sinal sintase
LuxR	Proteína transcricional reguladora
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
mg	Miligrama
MHA	Ágar Mueller Hinton
MHB	<i>Mueller-Hinton broth</i> ou caldo Mueller Hinton
min	Minuto
mM	Milimolar
Mpb	Mega pares de bases
mvfR	Proteína reguladora
NIP3	Núcleo Integrado de Pesquisa 3
nm	nanômetro
NPs	nanopartículas
OMS	Organização Mundial da Saúde
$p < 0,05$	Probabilidade menor que 5%
PAO1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> cepa de referência PAO1

PA14	<i>P. aeruginosa</i> cepa de referência PA14
PAPI-1	Ilha de patogenicidade 1
PAPI-2	Ilha de patogenicidade 2
pb	pares de bases
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> ou tampão fosfato-salino
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> ou reação em cadeia da polimerase
<i>Pel</i>	exopolissacarídeo <i>pel</i>
<i>Psl</i>	exopolissacarídeo <i>psl</i>
PQS	2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona
pqsABCDE	Molécula sinal sintase
QQ	<i>Quorum Quenching</i>
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real (quantitativo)
QS	<i>Quorum Sensing</i>
QSI	Inibidores de <i>Quorum Sensing</i>
RhII	Molécula sinal sintase
RhIR	Proteína reguladora
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> ou espécie reativa de oxigênio
RT-qPCR	Transcrição reversa acoplada à reação em cadeia da polimerase em tempo real
s	Segundo
SARS-CoV-2	Coronavírus-2 da síndrome respiratória aguda grave
sub-CIM	Concentração subinibitória mínima
T1SS	Sistema de secreção tipo 1
T2SS	Sistema de secreção tipo 2
T3SS	Sistema de secreção tipo 3
TiO ₂	Dióxido de titânio
TSA	Ágar tripton de soja
<i>toxA</i>	exotoxina A
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UCBPP-PA14	<i>P. aeruginosa</i> cepa de referência PA14
UFC	Unidade formadora de colônia
ZnO	Óxido de zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	18
2.1	OBJETIVO GERAL	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3	REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1	<i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	19
3.1.1	Taxonomia, características fenotípicas e genotípicas	19
3.1.2	Fatores de virulência e patogenicidade	20
3.1.3	Formação de biofilmes	24
3.2	SISTEMA <i>QUORUM SENSING</i>	27
3.2.1	<i>Quorum sensing</i> em bactérias Gram-negativas.....	30
3.2.2	<i>Quorum Sensing</i> em <i>P. aeruginosa</i>	32
3.3	INIBIDORES DE <i>QUORUM SENSING</i>	34
3.4	NANOTECNOLOGIA E ÁREAS DE APLICAÇÃO.....	36
3.4.1	Nanopartículas de prata (AgNP).....	39
3.4.2	Nanopartículas de prata como inibidores do Sistema <i>Quorum Sensing</i>	41
4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1	ARTIGO 1	56
5.2	ARTIGO 2	62
5.3	ARTIGO 3	72
6	CONCLUSÃO	102
	APÊNDICE A – ARTIGO ORIGINAL: Análise comparativa dos fatores de virulência dos isolados clínicos e ambientais de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	103
	APÊNDICE B – ARTIGO ORIGINAL: Pesquisa fenotípica dos fatores de virulência em <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isolados de água de abastecimento público	113

1 INTRODUÇÃO

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria de grande importância clínica e ambiental. Encontra-se amplamente distribuído no meio ambiente, e pode facilmente infectar um hospedeiro suscetível e causar uma infecção. Uma das maiores preocupações é que com o decorrer dos anos, houve o aumento da sua resistência aos antimicrobianos disponíveis e utilizados para os tratamentos terapêuticos.

Segundo a Organização Mundial da Saúde, a bactéria *P. aeruginosa* encontra-se entre os principais microrganismos que necessitam de pesquisas para o desenvolvimento de novos fármacos para o controle da disseminação da multirresistência.

Além da multirresistência aos antimicrobianos, esta bactéria é também conhecida por apresentar inúmeros fatores de virulência que são responsáveis por infecções graves em pacientes hospitalizados com queimaduras e/ou portadores de fibrose cística. Estes fatores de virulência são controlados pelo Sistema *Quorum Sensing* (QS), conhecido como o processo de comunicação celular que regula todo o processo de expressão dos genes de virulência.

Diante disso, buscam-se novas alternativas para o controle da disseminação de *P. aeruginosa* multirresistentes. Um dos mecanismos de controle recentemente estudados é a terapia antivirulência que visa desarmar os microrganismos, sem afetar o seu crescimento, através da inibição do sistema QS e bloqueio da sua virulência.

Diversos compostos nanometálicos são descritos na literatura que possivelmente desempenham esta atividade anti-QS. Dentre estes compostos, destacam-se as nanopartículas de prata, amplamente conhecidas pela sua capacidade antimicrobiana contra diversos microrganismos e muito utilizadas na área Biomédica como carreadores de várias moléculas terapêuticas, aplicação em instrumentos cirúrgicos e incorporados em curativos.

No Centro de Laboratório Regional Instituto Adolfo Lutz de Presidente Prudente (CLR-IAL-PP-V), nós trabalhamos com *P. aeruginosa* isolados de pacientes com e sem fibrose cística e isolados ambientais (águas de abastecimento público). Diante da colaboração científica entre o IAL e a Universidade Estadual Londrina, no qual o Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada/ Núcleo Integrado de Pesquisa 3 (NIP3) trabalha há anos com nanopartículas metálicas, vimos a

possibilidade de testar o efeito das nanopartículas de prata sobre o sistema QS, formação de biofilmes e fatores de virulência desta bactéria, visando obter novos conhecimentos sobre as aplicações de AgNPs e potencial atividade anti-QS.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito das nanopartículas de prata biogênicas (bio-AgNP) nos fatores de virulência e Sistema *Quorum Sensing* em *Pseudomonas aeruginosa*.

2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar biologicamente e caracterizar as nanopartículas de prata;
- Determinar a concentração inibitória mínima de bio-AgNP em *P. aeruginosa* obtidos de isolados clínicos, ambientais e cepas de referência PAO1 e PA14;
- Determinar a concentração bactericida mínima de bio-AgNP em cepas de referência PAO1 e PA14;
- Verificar o efeito de concentrações sub-CIM de bio-AgNP sobre os fatores de virulência (motilidades, produção de ramnolipídeos, atividades de protease alcalina e elastase B, e produção piocianina);
- Avaliar a formação de biofilmes após tratamento com concentrações sub-CIM de bio-AgNP;
- Analisar a interferência de bio-AgNP na expressão gênica do Sistema *Quorum Sensing* em concentrações sub-CIM e sua atuação como inibidores do Sistema.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *Pseudomonas aeruginosa*

3.1.1 Taxonomia, características fenotípicas e genotípicas

O gênero *Pseudomonas* foi descrito pela primeira vez por Migula em 1894 e após muitos estudos, foi descrito *P. aeruginosa* como a espécie representativa do gênero (PALLERONI, 2010). *P. aeruginosa* pertence à família Pseudomonadaceae, é uma bactéria Gram-negativa, móvel, aeróbica, não fermentadora de glicose e não formadora de esporos (FIGUEREDO et al., 2021; PANG et al., 2019). O nome *Pseudomonas* é derivado de duas palavras gregas: *Pseudo* que significa “falso” e *monas* que significa “unidade única”; *aeruginosa* “azul esverdeado” é do latim aerūgō que significa “cobre enferrujado” (DIGGLE; WHITELEY, 2020).

É considerado um microrganismo não fastidioso que não requer condições especiais de cultivo. Por isso, cresce bem na maioria dos meios não seletivos (ágar Mueller-Hinton, ágar Nutriente, ágar Luria-Bertani, ágar Sangue, etc). Além disso, alguns meios de cultura podem ser utilizados especificamente para o crescimento seletivo de *Pseudomonas* (ágar Cetrimide, meio King-A e meio King-B) (BEHZADI; BARÁTH; GAJDÁCS, 2021).

Entre as características fenotípicas de *P. aeruginosa*, destacam-se o odor característico (descrito como semelhante a suco de uva), não fermentadores de lactose em ágar MacConkey, formação de β -hemólise em ágar sangue e a secreção de pigmentos como a pioverdina (amarelo-verde à fluorescente), piocianina (azul esverdeado), piorrubina (castanho-avermelhado) e piomelanina (marrom-preto) (BEHZADI; BARÁTH; GAJDÁCS, 2021; PRABHURAJESHWAR, 2019).

Devido a sua versatilidade metabólica, é capaz de crescer em ambientes aquáticos, no solo e causar infecções em plantas e animais, sendo também responsável por várias doenças humanas, especialmente em pacientes imunocomprometidos ou com queimaduras, sendo um dos principais agentes de infecções relacionadas à assistência à saúde (AZAM; KHAN, 2019; CILLÓNIZ; DOMINEDÒ; TORRES, 2019).

Quanto as suas características genotípicas, esta bactéria possui um genoma relativamente extenso (5,5–7,0 Mpb) quando comparado a outras bactérias como *Bacillus subtilis* (4,2 Mpb), *Escherichia coli* (4,6 Mpb) e *Mycobacterium tuberculosis* (4,4 Mpb). Este genoma codifica enzimas reguladoras importantes para o seu metabolismo, transporte e efluxo de compostos orgânicos (PANG et al., 2019; FRESCHI et al., 2019).

Em 2000, após a publicação do sequenciamento do genoma de *P. aeruginosa* PAO1 por Stover et al. (2000) houve maior compreensão sobre a patogenicidade e grande contribuição para o conhecimento da sua fisiologia. Este isolado foi obtido de uma ferida de um paciente australiano na década de 1950. O genoma de PAO1 consiste em um cromossomo circular de 6,3 Mpb.

O sequenciamento do genoma de *P. aeruginosa* PA14, isolado de paciente com queimadura, foi publicado em 2006 e consiste de 6,5 Mpb, revelando um alto grau de conservação dos genes em comparação ao PAO1. Observou-se que aproximadamente 91,7 % do genoma PA14 estão presentes na cepa PAO1, e que 95,8 % do genoma PAO1 estão presentes na PA14 (LEE et al., 2006; MIKKELSEN; MCMULLAN; FILLOUX, 2011). Entretanto, o genoma de PA14 contém duas ilhas de patogenicidade (PAPI-1 e PAPI-2) que estão ausentes em PAO1, e estas possuem vários genes adicionais implicados na virulência bacteriana (HE et al., 2004).

Atualmente, estas duas cepas são as mais utilizadas em estudos laboratoriais, entretanto, a cepa é a principal referência para estudos genéticos e funcionais em *P. aeruginosa* (KLOCKGETHER et al., 2011).

3.1.2 Fatores de virulência e patogenicidade

A patogenicidade de *P. aeruginosa* está atribuída a diversos fatores de virulência que podem ser partes da estrutura celular do microrganismo ou que podem ser sintetizados e excretados ao meio ambiente (BEHZADI; BARÁTH; GAJDÁCS, 2021). O mecanismo de virulência a ser desenvolvido depende do meio ambiente ou condição de estresse que o microrganismo se encontra (LEE; ZHANG, 2015).

Dentre os que fazem parte da estrutura bacteriana, podemos citar: lipopolissacarídeos (LPS), flagelos, pili tipo IV e lectinas que são partes integrantes da parede celular de *P. aeruginosa* (ROCHA et al., 2019; SALEH; ABBAS;

ASKOURA, 2019). Estas estruturas geralmente são utilizadas na fase de colonização, persistência e no estabelecimento de infecções *in vivo* (STRATEVA; MITOV, 2011).

A infecção por *P. aeruginosa* geralmente se inicia após a quebra das primeiras barreiras de defesas que são: a pele (a partir de traumas, queimaduras graves ou dispositivos internos), interrupção do equilíbrio da microbiota por uso de antibióticos de amplo espectro, ou alteração dos mecanismos de defesa imunológica (por exemplo, tratamentos quimioterápicos, síndrome da imunodeficiência adquirida, diabetes mellitus, pacientes portadores de fibrose cística) (VAN DELDEN; IGLEWSKI, 1998).

O LPS é um componente predominante da membrana externa de *P. aeruginosa* no qual consiste em um domínio hidrofóbico conhecido como lipídeo A (ou endotoxina), um oligossacarídeo central não repetitivo e um polissacarídeo distal (ou antígeno O) (LAM et al., 2011). O LPS desempenha um papel importante na ativação das imunidades inata e adaptativa (ou adquirida); e, eventualmente, causa respostas de inflamação que contribuem para a maior morbidade e mortalidade nos indivíduos acometidos (HEINE; RIETSCHER; ULMER, 2001).

Os flagelos e o pili tipo IV são responsáveis pela motilidade de *P. aeruginosa*, sendo reconhecida como uma vantagem, pois permite o deslocamento de um ambiente para outro sem dificuldade (BEHZADI; BARÁTH; GAJDÁCS, 2021), além de contribuir para a adesão na fase de colonização (KEARNS, 2010; STRATEVA; MITOV, 2011). Este microrganismo é capaz de realizar três tipos de motilidade: *swarming*, *swimming* e *twitching*.

A motilidade *swarming* é caracterizada pela formação de padrões dendríticos na superfície do meio semissolidificado (0,5 a 0,7% de ágar) e a sua formação é dependente de densidade celular e fontes de carbono e nitrogênio no meio (OTTON et al., 2017).

Na motilidade *swimming* ocorre o envolvimento de rotação de um único flagelo polar em superfícies líquidas com baixa viscosidade (0,3% de ágar) (HA; KUCHMA; O'TOOLE, 2014; NEWMAN; FLOYD; FOTHERGILL, 2017).

Twitching é uma forma de movimento bacteriano como resultado de movimentos repetidos de extensão e retração do pili tipo IV sobre superfícies sólidas (1,0 % de ágar) ou com moderada viscosidade (BURROWS, 2012; OTTON et al.,

2017). Este tipo de motilidade pode ocorrer em superfícies orgânicas e inorgânicas, incluindo células epiteliais, plásticos, vidros e metais (WOLSKA; KOT, 2013).

A motilidade *twitching* é mediada apenas por pili tipo IV, enquanto a motilidade *swarming* normalmente envolve pili tipo IV, flagelos e uma classe de surfactantes conhecido como ramnolipídeos (KOHLENER et al., 2000). Já a motilidade *swimming* utiliza o flagelo para realização do movimento (HA; KUCHMA; O'TOOLE, 2014). Na Figura 1 estão representadas as imagens dos tipos de motilidades em *P. aeruginosa*.

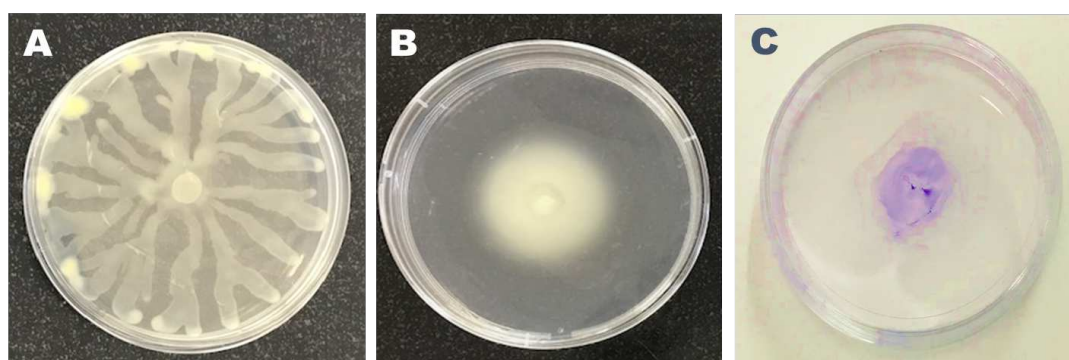


Figura 1 – Imagens dos tipos de motilidade realizados por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 em ágar *swarming*, ágar *swimming* e *twitching*, respectivamente. (A) Motilidade *swarming*. (B) Motilidade *swimming*. (C) Motilidade *twitching*. Fonte: próprio autor (2021).

As lectinas são proteínas que se ligam a carboidratos localizados na superfície da célula hospedeira. *P. aeruginosa* sintetiza duas lectinas solúveis denominados LecA e LecB. Ambas as proteínas estão presentes na membrana externa desses microrganismos e possuem função de adesinas (STRATEVA; MITOV, 2011). Algumas pesquisas demonstram a relação das lectinas com outros fatores de virulência, no qual podem também contribuir para a formação de biofilmes e atividade da protease (DIGGLE et al., 2006; SONAWANE; JYOT; RAMPHAL, 2006).

Entretanto, a maioria dos fatores de virulência associados a *P. aeruginosa* são sintetizados e secretados. Estes fatores atuam nas fases de invasão e infecção. A invasão normalmente depende da síntese de enzimas extracelulares e toxinas que quebram a barreira física e promove proteção contra a fagocitose por células de defesas. Dentre eles, podemos citar os pigmentos (piocianina e pioverdina), ramnolipídeos, elastases, proteases, exoenzimas, entre outros, que normalmente são regulados pelo sistema *quorum sensing* (STRATEVA; MITOV, 2011; ROCHA et

al., 2019; SALEH; ABBAS; ASKOURA, 2019). Os principais fatores de virulência de *P. aeruginosa* e seus efeitos no hospedeiro estão listados na tabela 1.

Tabela 1 - Exemplos de fatores de virulência e seus efeitos no hospedeiro.

Função na patogenicidade	Fatores de virulência	Efeitos no hospedeiro durante a infecção	Referência
Adesão	Flagelos e pili tipo IV	Responsável pela motilidade e pode atuar como adesinas ao epitélio celular.	Strateva; Mitov (2011)
	Lectinas	Proteínas de membrana externa que atuam na aderência das células.	Behzadi; Baráth; Gajdács (2021)
	Alginatos	Compõem a matriz extracelular de biofilmes junto com os outros polissacarídeos <i>PeI</i> e <i>PsI</i>	Brindhadevi et al. (2020)
Invasão	Piocianina	Formação de espécies reativas ao oxigênio, causando danos celulares.	Hall et al. (2016)
	Pioverdina	Causa danos nas mitocôndrias do hospedeiro e contribui para a formação de biofilmes.	Kang et al. (2018)
	Ramnolipídeos	Importante para a fase final da produção do biofilme e tolerância a células do sistema imune.	Peréz-Peréz et al. (2017)
	Elastase B	Destruição do tecido pulmonar, aumento da permeabilidade paracelular e ruptura da barreira epitelial.	Nomura et al. (2014)
	Exotoxina A	Morte celular.	Michalska; Wolf (2015)
	Exotoxina S	Inibe a função das células imunes inatas e neutrófilos.	Behzad; Baráth; Gajdács (2021)
	Exotoxina U	Morte celular e na indução de choque séptico.	Behzad; Baráth; Gajdács (2021)
Defesa contra o sistema imune	Protease alcalina	Degradação do sistema de complemento e citocinas.	Laarman et al. (2012)

Fonte: Próprio autor (2021). Levantamento de dados realizado no período de 2018 a 2021.

P. aeruginosa possui cinco tipos de Sistema de Secreção I, II, III, V e VI (Figura 2), nas quais os tipos I (T1SS), II (T2SS) e III (T3SS) estão envolvidos na virulência deste patógeno (BEHZAD; BARÁTH; GAJDÁCS, 2021). Devido a estes sistemas de secreção, *P. aeruginosa* é capaz de produzir e liberar uma variedade de exoproteínas compostas por toxinas e enzimas hidrolíticas, sendo considerado um microrganismo modelo para o estudo de secreção de proteínas (BLEVES et al., 2010). A partir deste mecanismo, a bactéria patogênica é capaz de transportar os fatores de virulência através de canais presentes na membrana e com isso, infectar seus hospedeiros com maior eficiência. Além disso, estes sistemas também são utilizados para colonização e sobrevivência em hospedeiros eucarióticos, causando

assim infecções agudas ou crônicas, e permitindo o escape do sistema imunológico (FILLOUX, 2011).

Basicamente, o sistema T1SS é responsável em transportar enzimas como as proteases alcalinas, enquanto que T2SS elastases e fosfolipases. Já o T3SS é responsável pelo transporte de exotoxinas (Exo S, T, U e Y) (BLEVES et al., 2010). O T3SS em *P. aeruginosa* é considerado o maior sistema de secreção vinculado a virulência uma vez que contribui para a citotoxicidade e infecções agudas no seu hospedeiro (HAUSER, 2009).

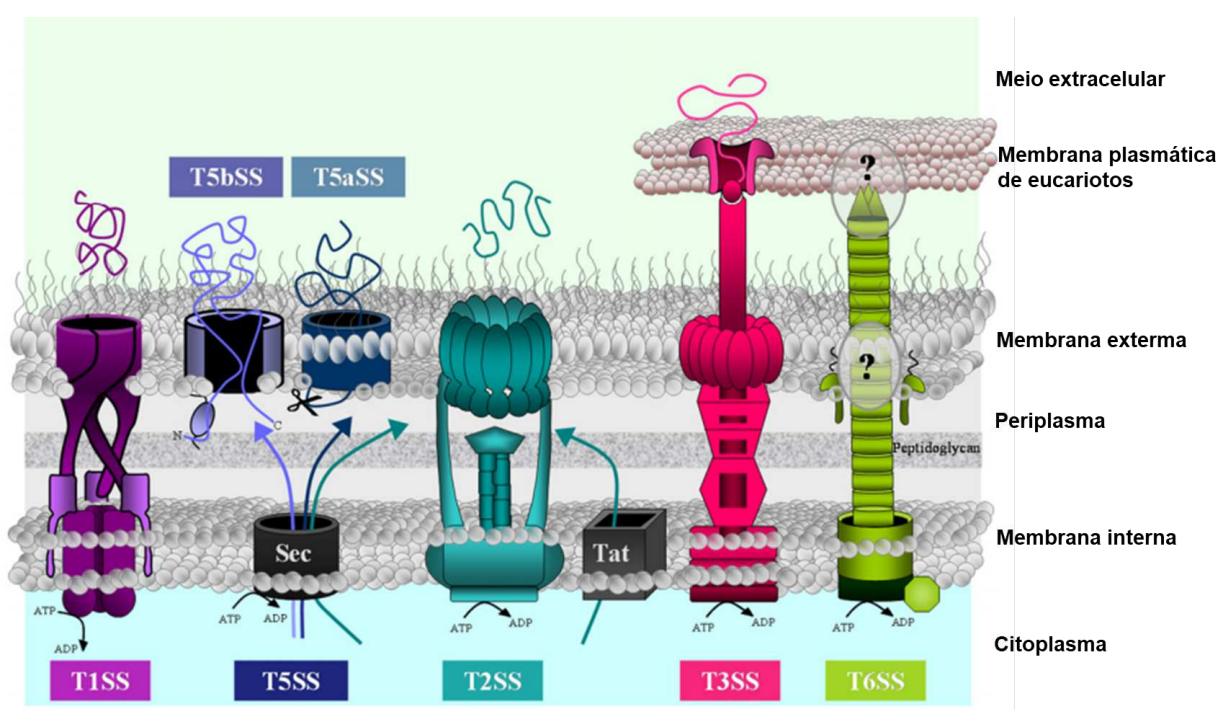


Figura 2 - Representação esquemática dos diferentes sistemas de secreção encontrados na cepa *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Cinco das seis vias de secreção encontradas em bactérias Gram-negativas estão presentes em *P. aeruginosa*. As proteínas, enzimas ou toxinas secretadas precisam atravessar o ambiente hidrofóbico das membranas através destes Sistemas de Secreção. **Fonte:** adaptado de Bleves et al. (2010).

3.1.3 Formação de biofilmes

Um dos mecanismos de virulência mais importantes na patogenicidade de *P. aeruginosa* é a formação de biofilmes. Este mecanismo é uma vantagem em muitas situações durante a infecção bacteriana, pois aumenta a sua capacidade de aderência em diversas superfícies, além de resistência aos antimicrobianos e sobrevivência a condições ambientais adversas (NEWMAN; FLOYD; FOTHERGIL, 2017; BEHZAD; BARÁTH; GAJDÁCS, 2021).

P. aeruginosa é considerada uma bactéria formadora de biofilme bem conhecida, o que a torna um excelente modelo para estudar o biofilme bacteriano (GHAFOOR; HAY; REHM, 2011; THI; WIBOWO; REHM, 2020). Além disso, o biofilme permite a sua colonização e infecção em pacientes imunocomprometidos, por exemplo, os que estão com câncer, pós-cirurgia, queimaduras graves ou infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e portadores de fibrose cística (THI; WIBOWO REHM, 2020; ROSSI et al., 2021). Adicionalmente, favorece a sua permanência em uma variedade de superfícies, incluindo materiais médicos (cateteres venosos centrais, cateteres urinários, lentes de contato, etc.) (LEE; YOON, 2017), tubulações de águas de abastecimento público (WINGENDER; FLEMMING, 2011; MULAMATTATHIL; BEZUIDENHOUT; MBEWE, 2014) e equipamentos na indústria de alimentos (MELIANI; BENSOLTANE, 2015; CARRASCOSA et al., 2021).

Os biofilmes são comunidades de microrganismos sustentados por substâncias extracelulares constituídos de exopolissacarídeos (*psl*, *pel* e alginato), proteínas, DNA extracelular (eDNA), piocianina, ramnolipídeos, água, entre outros, no qual juntos formam a matriz do biofilme (NEWMAN; FLOYD; FOTHERGIL, 2017; DAS et al., 2020). Os exopolissacarídeos estão envolvidos com a fixação bacteriana na superfície, formação e estabilidade da arquitetura do biofilme (THI; WIBOWO; REHM, 2020). O eDNA desempenha um papel importante na formação de biofilme, pois ajuda na motilidade *twitching* das bactérias e no fornecimento de nutrientes às células bacterianas durante as situações de desnutrição (BRINDHADEVI et al., 2020). Os ramnolipídeos, uma classe de glicolipídeos e que são caracterizados como surfactantes atuam na formação da estrutura madura do biofilme, permitindo a manutenção de canais de fluxo de água e nutrientes (DAS et al., 2020). Enquanto que a piocianina, promove a ligação de eDNA a células de *P. aeruginosa*, influenciando a interação físico-química entre as células e permitindo a agregação (DAS et al., 2013).

Há alguns anos, imaginava-se que adesão inicial do biofilme bacteriano estava relacionada somente com ligações químicas simples, tais como as forças de Van der Waals. No entanto, o desenvolvimento do estágio inicial do biofilme é composto de eventos muito mais complexos no qual uma variedade de estruturas bacterianas tais como adesinas, pili tipo IV e lipopolissacarídeo (LPS) estão envolvidos neste processo (LEE; YOON, 2017).

O desenvolvimento de biofilme bacteriano pode ser agrupado em cinco principais etapas, conforme a ilustração na Figura 3. A formação do biofilme inicia-se com uma adesão reversível mediado por exopolissacarídeos, movimento flagelar e pili tipo IV. Posteriormente, ocorre uma interação intercelular, regulado pelo sistema *quorum sensing* que favorece o crescimento sésil, seguido da formação inicial da maturação e formação do biofilme maduro e sua dispersão ao meio ambiente, no qual permite com que o ciclo inicie novamente (THI; WIBOWO; REHM, 2020). Há também na literatura autores que consideram apenas quatro fases para a formação do biofilme, no qual consideram as etapas 3 e 4 um único estágio (SAXENA et al., 2019).

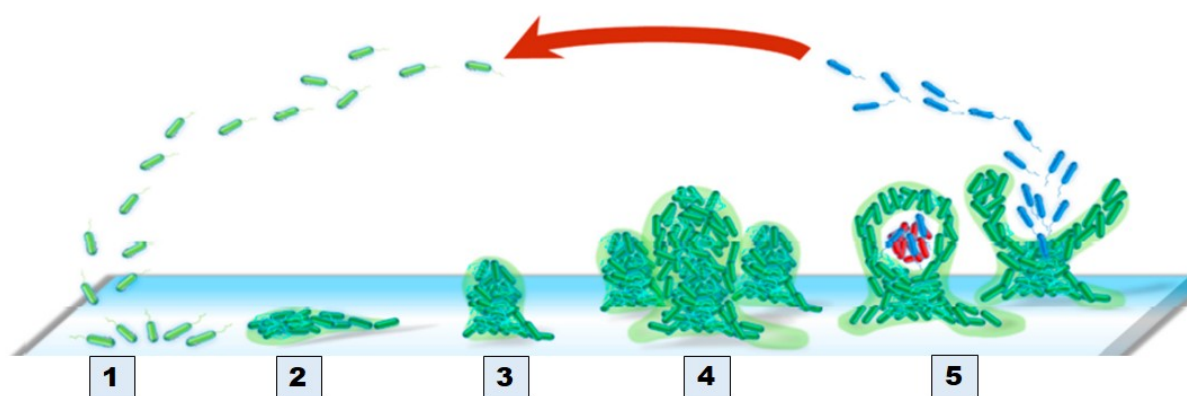


Figura 3 - Esquema do ciclo de vida da formação de biofilmes bacterianos. Etapa 1: as células bacterianas aderem a uma superfície de forma reversível. Etapa 2: fase de crescimento sésil. Etapa 3: é alcançada a primeira fase de maturação, na qual há desenvolvimento inicial da arquitetura do biofilme, denominado de microlônias. Etapa 4: segunda fase de maturação dos biofilmes com formação de estruturas tridimensionais em forma de cogumelo. Etapa 5: Estágio da dispersão no qual células móveis (azul) se dispersam das microlônias.

Fonte: adaptado de Thi; Wibowo; Rehm (2020).

A formação de biofilmes em *P. aeruginosa* é dependente de moléculas de sinalização para coordenar suas atividades em grupo, através do sistema *Quorum Sensing* (QS). Estes comportamentos inter e intraespécies são essenciais para a adaptação e sobrevivência de comunidades bacterianas. O sistema QS envolve a síntese e liberação das moléculas sinalizadoras que resultam na expressão de conjuntos específicos de genes que promovem a regulação de diversos fatores de virulência (BRINDHADEVI et al., 2020; THI; WIBOWO; REHM, 2020).

Além do sistema QS, as bactérias podem utilizar outras moléculas sinalizadoras para direcionar os eventos fisiológicos em resposta aos estímulos

ambientais controlando a motilidade, como por exemplo, o c-di-GMP (bis-(3'-5')-guanosina-monofosfato dimérico cíclico ou diguanilato cíclico). Quando as concentrações de c-di-GMP estão baixas significa que as células estão se movendo pelo efeito do flagelo e do pili tipo IV, enquanto que quando as concentrações de c-di-GMP aumentam, ocorre à adesão e a persistência de comunidades bacterianas para a formação de biofilmes (VALENTINI; FILLOUX, 2016).

3.2 Sistema *Quorum Sensing*

O *quorum sensing* (QS) é um mecanismo de comunicação celular que ocorre através de moléculas sinalizadoras extracelulares (autoindutores), e sua concentração é dependente da densidade microbiana (Figura 4). O QS é capaz de estimular a associação de enzimas responsáveis pela sinalização molecular com seus receptores e desta forma induzir a expressão de genes responsáveis por diversos mecanismos fisiológicos; tais como esporulação, formação de biofilmes, conjugação, bioluminescência, produção de antibióticos e fatores de virulência como proteases, toxinas, adesinas, etc. (CASTILLO-JUÁREZ et al., 2015; GOSWAMI, 2017; WU; LUO, 2021).

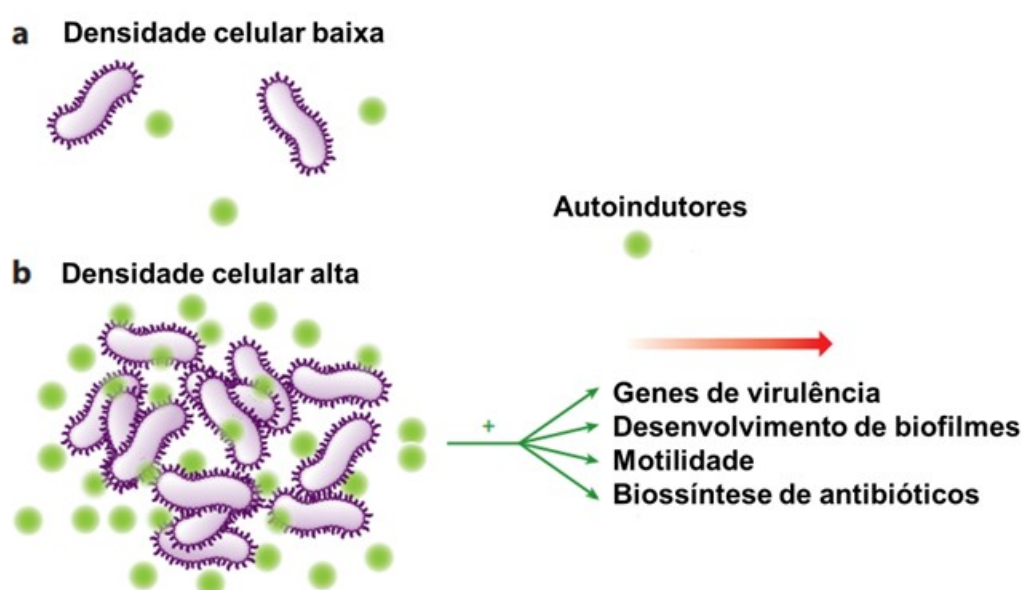


Figura 4 - Esquema resumido do Sistema *Quorum Sensing*. (a) Em densidades celulares baixas, os sinais QS (autoindutores) são produzidos pelas bactérias a nível basal. À medida que a densidade celular aumenta, também aumenta a concentração de autoindutores. (b) Em uma densidade celular alta, os autoindutores aumentam e induzem a expressão de diversos eventos celulares.
Fonte: adaptado de Azimi et al. (2020).

Os dois autoindutores de QS mais estudados são a N-acil homoserina lactona (AHL ou AI-1) produzidos por bactérias Gram-negativas e os peptídeos produzidos por bactérias Gram-positivas (KALIA, 2013).

As N-acil homoserina lactonas, também conhecidas como AI-1 são constituídos por anéis de homoserina lactona (AHL) e ácidos graxos na cadeia lateral (REUTER; STEINBACH; HELMS, 2016). Embora a sinalização AHL tenha sido tradicionalmente considerada uma comunicação intraespecífica, estudos sugerem que as AHLs também podem ser usadas para detectar potenciais competidores do ambiente (ABISADO et al., 2018).

Os peptídeos autoindutores são sintetizados no ribossomo de bactérias Gram-positivas e apresentam modificações pós-traducionais até a sua estabilidade e funcionalidade (TURAN et al., 2017; KIM; YEON, 2018). Em geral, as moléculas de AHL produzidas pelas bactérias Gram-negativas difundem-se passivamente dentro e fora das células, enquanto os peptídeos sintetizados por bactérias Gram-positivas devem ser transportados ativamente (REUTER; STEINBACH; HELMS, 2016).

O autoindutor-2 (AI-2) é uma terceira classe de moléculas de sinalização e pode ser encontrada em muitas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. O AI-2 é muito utilizado para a comunicação interespecíes, por isso é considerado como um sinal de comunicação universal (TURAN et al., 2017).

O autoindutor PQS, também conhecido como quinolona (2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona), identificado em *P. aeruginosa*, é produzido por proteínas codificadas pelos genes *pqsABCDH* e, juntamente com outros autoindutores AHLs, controlam a formação de biofilmes e a produção de fatores de virulência como elastase, piocianina e lectina (HODGKINSON et al., 2016; PAPENFORT; BASSLER, 2016). A Figura 5 apresenta os autoindutores citados e suas respectivas estruturas químicas.

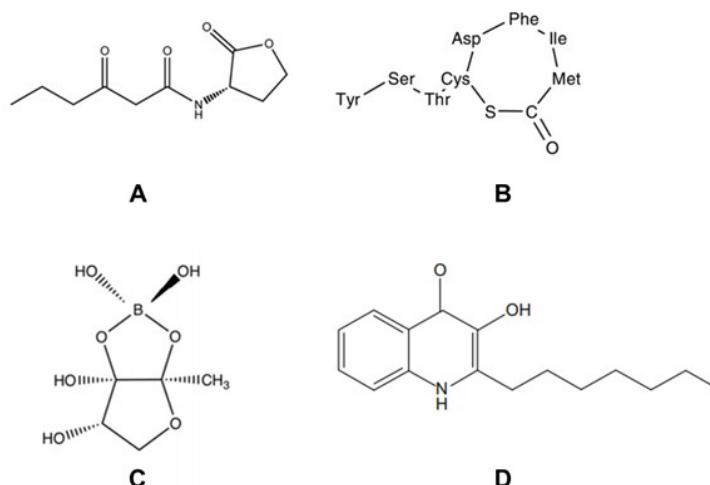


Figura 5 - Estrutura química das moléculas de sinalização do Sistema *Quorum Sensing*. (A) N- acil homoserina-lactona produzido por *Vibrio fischeri*. (B) oligopeptídeos autoindutores em *Staphylococcus aureus*, (C) autoindutor-2 presente em *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, (D) 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona (de *Pseudomonas aeruginosa*).

Fonte: próprio autor (2021).

Os primeiros conceitos sobre um possível mecanismo de comunicação celular bacteriana foram publicadas em meados de 1960 e 1970 em *Streptococcus pneumoniae* (TOMASZ, 1965) e no controle da atividade luminescentes em bactérias (NEALSON, PLATT, HASTINGS, 1970).

Na década de 80, algumas pesquisas importantes foram publicadas e identificaram genes responsáveis pela luminescência produzida pela bactéria *Vibrio fischeri* (ENGBRECHT, SILVERMAN, 1984) e o autoindutor N-3-oxohexanoil-L-homoserina lactona-3OC₆-AHL (EBERHARD et al.,1981). Apesar dos estudos iniciais, a terminologia “*quorum sensing*”, foi usada pela primeira vez em um artigo de revisão de Fuqua; Winans; Greenberg (1994).

Conforme a Figura 6, a bioluminescência na bactéria *Vibrio fischeri* é mediada pelo operon *luxICDABEG*, cuja expressão é regulada principalmente pelos produtos dos genes *luxI* e *luxR*. O gene *luxI*, localizado adjacente ao gene *luxC*, no operon, codifica uma acil-homoserina lactona sintase; enquanto o gene *luxR*, localizado adjacente ao operon, codifica um regulador transcricional. Conforme a densidade da população microbiana aumenta, a concentração de autoindutores (AHL) aumenta gradualmente. Quando a concentração atinge um nível de limiar (correspondendo ao QS), o autoindutor penetra na célula e liga-se à proteína LuxR, ativando a molécula que induz a transcrição do operon *luxICDABEG*, resultando no aumento da

produção de luz e produção de autoindutores (SCHAUDER; BASSLER, 2001; PAPENFORT; BASSLER, 2016; KIM; YEON, 2018).

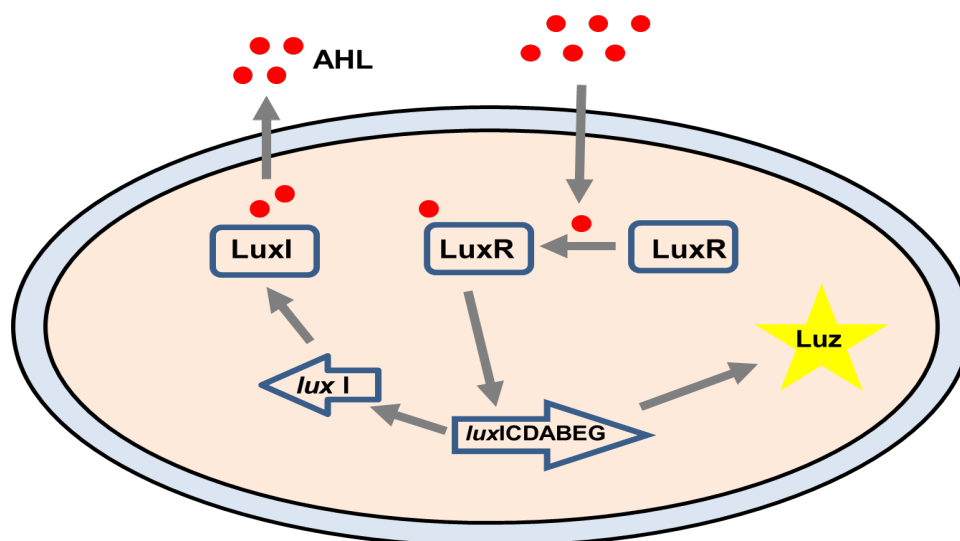


Figura 6 - Quorum sensing em *Vibrio fischeri*. Os genes estruturais (*luxICDABEG*) e dois reguladores (*luxR* and *luxI*). A proteína LuxI produz autoindutores 3OC6-HSL (AHL, bolas vermelhas) que interagem com o regulador transcricional. Isto causa a expressão do operon *luxICDABEG* e ocorre a produção de luz.

Fonte: Próprio autor (2021).

A bactéria *V. fischeri* coloniza os órgãos de *Euprymna scolopes*, também conhecido como lula havaiana, nos quais se multiplica e ao atingir a densidade populacional induz a expressão de genes que codificam a luminescência. A enzima luciferase é responsável pela produção de luz e a capacidade de produzir sinais luminosos que auxilia o hospedeiro a encontrar alimento, acasalar-se ou proteger-se de predadores. Em troca, as bactérias obtêm um ambiente rico em nutrientes para viver em animais marinhos (SCHAUDER; BASSLER, 2001; GOSWAMI, 2017).

Além do sistema QS em bactérias, este tipo de comunicação também já foi descrito em vírus (HARGREAVES; KROPINSKI; CLOKIE, 2014), protozoários (ROJAS; MATTHEWS, 2019), fungos e leveduras (ALBUQUERQUE; CASADEVALL, 2012; PADDER; PRASAD; SHAH, 2018). Estes exemplos fornecem evidências de que as respostas dependentes da densidade populacional possuem um papel importante na vida em comunidade em diferentes grupos de seres vivos (ABISADO et al., 2018).

3.2.1 Quorum sensing em bactérias Gram-negativas

O sistema QS pode ser expresso em diferentes bactérias. Dentre os Gram-negativos, foram descritos em *Acinetobacter baumannii* (DOU et al., 2017), *Escherichia coli* (ROSSI et al., 2017), *Pseudomonas aeruginosa* (LEE et al., 2013; GARCÍA-CONTRERAS, 2016; BRINDHADEVI et al., 2020; CORNELIS, 2020), *Salmonella* spp. (SIVASANKAR et al., 2020), *Vibrio fischeri* (CASTILLO-JUÁREZ et al., 2015), entre outros. Este sistema pode regular diferentes fenótipos, conforme descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Sistema *Quorum sensing* e os fenótipos relacionados em bactérias Gram-negativas.

Microrganismo	Sistema QS	Fenótipos que são regulados	Referência
<i>A.baumannii</i>	Lux	Motilidade e formação de biofilme.	Dou et al. (2017)
<i>E. coli</i>	SdiA, LuxS, epinefrina/norepinefrina	Motilidade e formação de biofilme.	Zohar; Kolodkin-Gal (2015) Rossi et al. (2017)
<i>P.aeruginosa</i>	Las, Rhl, PQS	Produção de Píocianina, pioverdina, ramnolipídeos. Atividade de motilidade, elastase, protease alcalina. Formação de biofilme	Lee et al. (2013), Cornelis (2020)
<i>Salmonella spp.</i>	SidA, Lsr, epinefrina/norepinefrina	Motilidade e adesão.	Haque et al. (2019), Sivasankar et al. (2020)
<i>V. fischeri</i>	LuxI, Ain, LuxS	Expressão de bioluminescência, colonização no hospedeiro e motilidade.	Castillo-Juárez et al. (2015)

Fonte: Próprio autor (2021). Levantamento de dados realizado no período de 2018 a 2021.

Muitas bactérias produzem e detectam vários autoindutores e o sistema QS de bactérias Gram-negativas produz moléculas sinalizadoras pela proteína sintase homóloga ao LuxI. Essas proteínas produzem um autoindutor específico para cada espécie de bactéria (KIM; YEON, 2018). As AHLs são a classe mais comum de autoindutores neste grupo de bactérias, e as variações de autoindutores são de acordo com o comprimento da cadeia de carbonos (PAPENFORT; BASSLER, 2016; TURAN et al. 2017).

Nos últimos anos, diversos estudos mostraram a complexidade do sistema QS nos diferentes microrganismos (BRINDHADEVI et al., 2020; HAQUE et al., 2020; WU; LUO, 2021). Por isso, evidenciam-se cada vez mais novos conhecimentos sobre essa comunicação complexa entre os microrganismos. O grande interesse

neste assunto se deve ao fato de que o QS controla comportamentos que são cruciais para o desenvolvimento e sucesso dessas comunidades em diversos ambientes, como o intestino humano e infecções em humanos (WHITELEY; DIGGLE; GREENBERG, 2017).

3.2.2 Quorum Sensing em *P. aeruginosa*

P. aeruginosa possui três sistemas QS conhecidos: Os sistemas LasI/LasR, RhII/RhIR e PQS. Os dois primeiros são mediados pelos autoindutores N-acil homoserina lactonas (AHL) e o terceiro mediado por quinolonas (sinal PQS) (LEE et al., 2013). Nos sistemas LasR-I e RhIR-I a síntese de autoindutores AHL é catalisada por uma enzima lactona sintase (LuxI). Nestes sistemas ocorre a produção de duas moléculas de AHL, 3-oxo-C₁₂-AHL e C₄-AHL (BOUYAHYA et al., 2017).

Em 1993, foi reportada pela primeira vez que a patogenicidade de *P. aeruginosa* era dependente do Sistema QS LasI/LasR (PASSADOR et al., 1993). Este sistema Las regula genes responsáveis pela produção de inúmeras enzimas como a exotoxina A, elastase, protease e a protease alcalina (LAILA; SANTOS, 2016).

O segundo Sistema QS, RhII/RhIR foi descoberto por Brint e Ohman (1995) e regulam genes responsáveis pela produção de protease, piocianina, elastase (LEE; ZHANG, 2015) e especialmente ramnolipídeos, que atua nos últimos estágios do desenvolvimento de biofilmes e auxilia na manutenção das macrocolônias (LAILA; SANTOS, 2016). O mecanismo molecular geral do QS em *P. aeruginosa* é regulado pelos sistemas *las* e *rhl* (BRINDHADEVI et al., 2020).

O terceiro sistema QS foi descrito por Pesci et al. (1999). *P. aeruginosa* utiliza a molécula 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona (PQS) sintetizada pela proteína PqsABCDE que se liga ao receptor PqsR, resultando no complexo PqsR – PQS. Este complexo promove a transcrição dos genes associados à produção de fenazina, formação de lectinas, exoenzimas, ramnolipídeos e biofilmes (KIM; YEON, 2018). Este sistema influencia na produção de DNA extracelular (eDNA), um componente presente na matriz do biofilme (PÉREZ-PÉREZ et al., 2017). A piocianina é um dos fatores de virulência de maior importância que é regulada por

este sistema. Este pigmento é responsável pela coloração azul-esverdeada das colônias de *P. aeruginosa*, e a produção de espécies reativas de oxigênio, seu principal mecanismo de citotoxicidade (HALL et al., 2016).

Os sistemas QS são regulados entre si de maneira hierárquica, conforme Figura 7. O sistema Las ativa os sistemas Rhl e Pqs, enquanto Rhl pode suprimir Pqs e Pqs pode ativar Rhl (REUTER; STEINBACH; HELMS, 2016).

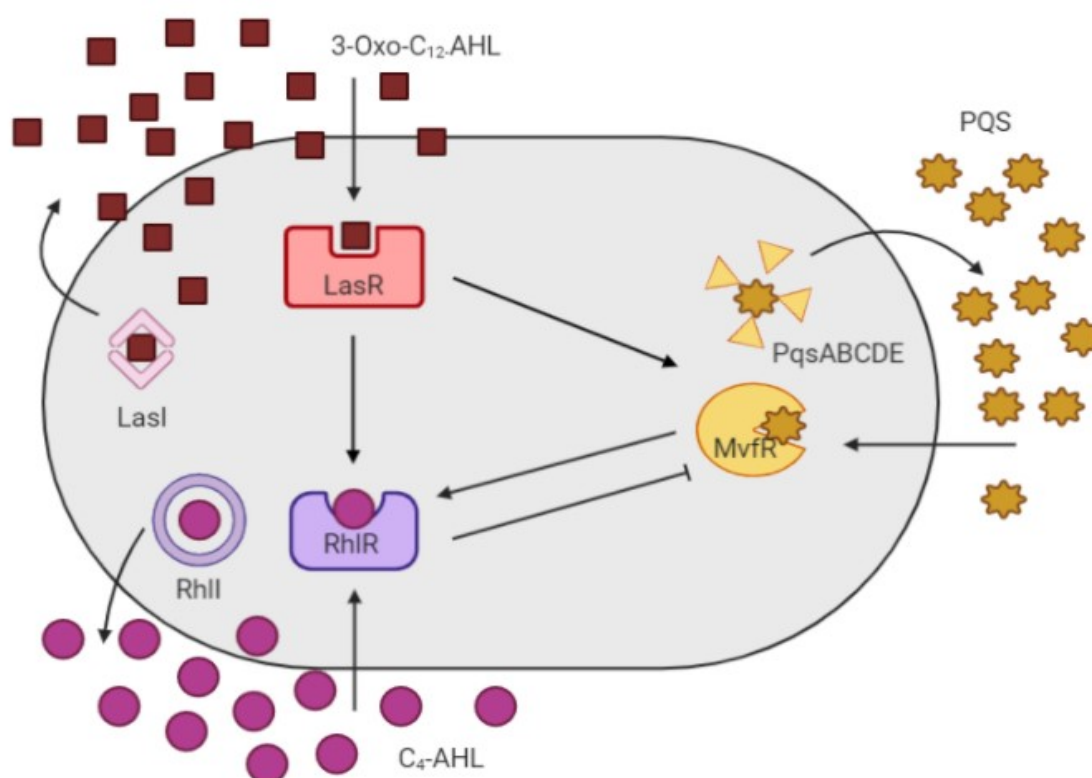


Figura 7 – Representação esquemática dos Sistemas Quorum Sensing em *P. aeruginosa* (*las*, *rhl* e *pqs*) e sua respectiva regulação. O sistema LasI / LasR regula todos os outros dois sistemas, enquanto que o sistema o RhlI / RhlR e o sistema PqsABCDE / PqsR regulam um ao outro. Fonte: Próprio autor (2021).

Lee et al. (2013), revisado por Lee e Zhang (2015) identificaram uma nova molécula sinalizadora 2-(2-hidroxifenil)-tiazol-4-carbaldeído, denominado IQS e sugeriram como o quarto Sistema QS em *P. aeruginosa*. Entretanto, há controvérsias na literatura quanto a existência desta quarta molécula sinalizadora. De acordo com Cornelis (2020), a afirmação de que o operon *ambABCDE* é responsável pela biossíntese de IQS está equivocada. O autor menciona que operon *ambABCDE* codifica proteínas envolvidas na produção do ácido L-2-amino-4metoxi-trans-3-butenoico (AMB) e, portanto, não poderia ser responsável pela produção de

IQS. Desta forma, atualmente são reconhecidos três sistemas QS em *P. aeruginosa* que regulam diversos fatores de virulência, conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 - Sistema *Quorum sensing* de *P. aeruginosa* e os fatores de virulência relacionados.

Sistema QS	Fatores de virulência	Referências
Las	Protease alcalina, elastase, formação de biofilmes, lipase, motilidade, catalase, exotoxinas.	
Rhl	Ramnolipídeos, protease alcalina, formação de biofilmes, piocianina, elastase, lectinas, motilidade (<i>swarming</i> e <i>twitching</i>).	Lee; Zhang (2015); Banu; Mary (2016); Kim; Yeon (2018)
PQS	Piocianina, formação de biofilmes, ramnolipídeos, lectinas e elastase.	

Fonte: Próprio autor (2021). Levantamento de dados realizado no período de 2019 a 2021.

A comunicação química entre bactérias através do Sistema QS é uma característica essencial que permite com que as bactérias vivam em comunidade e definam seus comportamentos coletivos (PAPENFORT; BASSLER, 2016). A sua descoberta e possibilidade de regulação na formação de biofilmes, expressão de fatores de virulência bacteriana, produção de antibióticos e pigmentos, entre outros, tem atraído a atenção de muitos pesquisadores. Por isso, o Sistema QS tornou-se um assunto em destaque, pois afeta diretamente microrganismos relacionados com a saúde humana, a agricultura e o meio ambiente como um todo.

3.3 Inibidores de *Quorum Sensing*

Em 2017, a OMS publicou uma lista de prioridade global de bactérias que necessitam urgentemente do desenvolvimento de novos antimicrobianos. Apresentou um catálogo com 12 bactérias, divididas em três grupos de prioridade (crítica, alta e média). As espécies com maior prioridade são: *Acinetobacter baumannii* resistentes aos carbapenêmicos, *Pseudomonas aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos, e enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos e produtoras de betalactamases de espectro ampliado (WILLYARD, 2017).

Com o aumento da incidência de infecções agudas e persistentes em todo o mundo destaca-se a necessidade de desenvolver estratégias terapêuticas como

uma alternativa aos antimicrobianos tradicionais, provavelmente para controlar e erradicar os microrganismos patogênicos (THI; WIBOWO; REHM, 2020). Por isso, o desenvolvimento de novas terapias para o controle de doenças causadas por microrganismos resistentes aos antimicrobianos é um dos principais desafios.

Os fatores de virulência são controlados pelo Sistema QS, por isso, impedir a sua produção constitui uma importante estratégia para o controle de doenças bacterianas, ou seja, uma terapia antivirulência. Esta terapia visa "desarmar" os agentes patogênicos, impedindo-os de atacar seu hospedeiro (DEFOIRDT, 2018). Por isso, a interferência do sinal do sistema QS tem sido considerada uma boa alternativa, tecnicamente conhecida como "Quorum Quenching" ou inibidores de *quorum sensing* (CASTILLO-JUÁREZ et al., 2015; GARCÍA-CONTRERAS, 2016; GOSWAMI, 2017). O sistema QS como alvo é considerado vantajoso em relação às estratégias terapêuticas convencionais, porque apenas o mecanismo de comunicação entre as bactérias é interrompido sem matar as células individuais (REUTER; STEINBACH; HELMS, 2016).

A interferência no sistema QS pode ser alcançada pela atenuação dos sistemas de comunicação QS pela inativação das proteínas receptoras, degradação dos sinais autoindutores ou inibição da síntese de moléculas sinalizadoras de QS e utilização de compostos sintéticos análogos a moléculas sinalizadoras (KALIA, 2013; GARCÍA-CONTRERAS, 2016; HAQUE et al., 2020). Espera-se que os inibidores de QS possam erradicar as infecções microbianas em combinação com o sistema imunológico do hospedeiro (DEFOIRDT; BRACKMAN; COENYE, 2013).

A inativação das proteínas receptoras é uma das estratégias efetivas para reduzir a virulência e infecção bacteriana. Paczkowski et al. (2017) demonstraram que flavonoides podem se ligar a receptores QS e reduzir significativamente a expressão do gene de virulência em *P. aeruginosa*.

A degradação enzimática dos sinais autoindutores pode interromper a "comunicação" entre as bactérias (JIANG et al., 2019). Alguns exemplos de enzimas são lactonase, acilase, oxidorreduções, todas derivadas de diferentes bactérias (PARK et al., 2006; BIJTENHOORN et al., 2011; MAISURIA; NERURKAR, 2015).

A utilização de compostos sintéticos análogos às moléculas sinalizadoras foi apresentada no estudo de Yang et al. (2012). Naquele trabalho foi demonstrado uma estrutura (C2) análoga aos autoindutores (AHLs) capaz de reduzir a produção de fatores de virulência como a protease, elastase, ramnolipídeos e motilidade

swarming, através do bloqueio das proteínas receptoras em *P. aeruginosa*. Esta estrutura também foi capaz de inibir a expressão de genes reguladores do QS: *lasR*, *lasI*, *rhlR* e *rhlI*.

Espera-se que a inibição de QS exerça menos pressão de seleção para o desenvolvimento de resistência entre bactérias patogênicas, uma vez que o alvo são os fatores de virulência sem inibir o crescimento dos microrganismos (QAIS; KHAN AHMAD, 2018). Entretanto, embora o risco de desenvolvimento de resistência seja menor do que com a terapia antimicrobiana, é improvável que a resistência não se desenvolva ao longo do tempo.

Diversos compostos, dentre eles naturais ou sintéticos têm sido estudados contra os fatores de virulência em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas como *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* (KALIA et al., 2015; LUÍS et al., 2016; SINGH et al., 2015; SHARIF et al. 2018).

Estudos mostram que novas estratégias tem sido desenvolvidas com intuito de inibir a formação de biofilmes e outros fatores de virulência regulados pelo QS. Até o momento foram apresentados diferentes pesquisas com o uso de compostos naturais (BOUYAHYA et al., 2017; ASIF, 2020) e nanopartículas metálicas (GARCÍA-LARA et al., 2015; SINGH et al., 2015; KHAN et al., 2019; OUYANG et al., 2020), que apresentaram resultados promissores contra a virulência e formação de biofilmes em *P. aeruginosa*.

3.4 Nanotecnologia e áreas de aplicação

A nanotecnologia consiste na aplicação de técnicas ou processos em que um dos seus componentes possua dimensões na escala nanométrica (1-100 nm), propiciando a manipulação de qualquer material reduzido a essa escala, surgindo novos materiais com propriedades físicas e químicas exclusivas (LAZZARETTI; HUPFFER, 2019; QAIS; KHAN; AHMAD, 2018).

As nanopartículas podem ser sintetizadas através de métodos físicos, químicos ou biológicos. As rotas de síntese física e química possuem alto consumo de energia e às vezes podem envolver substâncias químicas tóxicas. As sínteses biológicas são consideradas rentáveis, limpas, atóxicas e ecologicamente corretas.

A síntese biológica normalmente ocorre por meio do uso de bactérias, fungos, plantas, cianobactérias ou actinomicetos (RAI, 2013).

As nanopartículas tem despertado grande interesse como agentes terapêuticos potenciais e inovadores. Além disso, possuem reconhecida aplicação em diversas áreas, como alimentos, agricultura, ambiental e medicina.

Com as mudanças no estilo de vida do mundo moderno houve o aumento de consumo de alimentos prontos para consumo e/ou minimamente processados. Entretanto, esses alimentos estão suscetíveis à contaminação por bactérias deteriorantes e patogênicas. Adicionalmente, os consumidores exigem alimentos frescos e microbiologicamente seguros. Neste cenário, as nanopartículas com atividades antimicrobianas têm um efeito promissor na prevenção de deterioração e aumento da vida de prateleira dos alimentos (JAISWAL; SHANKAR; RHIM, 2019).

A aplicação da nanotecnologia na indústria alimentar pode ser realizada em embalagens de alimentos, como aditivos e preservantes. O reconhecimento desta nova tecnologia possui grande avanço no processamento e armazenamento de alimentos, garantindo a segurança alimentar. Entretanto, houve também uma grande preocupação quanto aos riscos potenciais do uso de metais em nanoescala (HE; DENG; HWANG, 2018).

Na agricultura, as nanopartículas podem ser utilizadas para o aumento da produção mundial de alimentos, melhoria na qualidade do solo e estímulo no crescimento de plantas (KASI VISWANATHAN; THOMAS; AMARANATH, 2018). Entretanto, o efeito das NPs no crescimento e desenvolvimento das plantas depende da concentração, composição, tamanho e propriedades físico-químicas (YADAV et al., 2020).

Os avanços na ciência e nanotecnologia também permitiram uma melhoria na área ambiental, especialmente nos problemas que envolvem a qualidade da água fornecida para a população. As técnicas convencionais de desinfecção da água, como tratamento químico, purificam água através dos componentes à base de ozônio ou cloro, entretanto podem gerar subprodutos. Desta forma, diversas NPs (prata, quitosana, dióxido de titânio e óxido de zinco) estão sendo pesquisadas como agentes antimicrobianos para melhorar este processo de desinfecção (GADKARI et al., 2018).

Além do uso em sistemas de tratamentos de águas, as NPs podem entrar no meio ambiente geralmente através de três situações: (i) liberação durante a

produção de matéria-prima; (ii) liberação durante o uso; e (iii) liberação após o descarte de produtos contendo NP (manuseio de resíduos) (BUNDSCHUH et al., 2018).

A nanomedicina surgiu como uma ferramenta para ampliar os avanços das aplicações de nanomateriais na medicina tradicional. Podem ser utilizados em biossensores, dispositivos cirúrgicos, sistema de distribuição de medicamentos (*drug delivery*), aplicações em imagens e na quimioterapia (CANCINO; MARANGONI; ZUCOLOTTO, 2014; McNAMARA; TOFAIL, 2017). Em 2020, devido à pandemia pelo novo coronavírus, vários estudos foram desenvolvidos com a utilização de biossensores com o vírus SARS-CoV-2, no qual pesquisadores de todo o mundo buscam novas técnicas para o diagnóstico do COVID-19 (CHAUHAN et al., 2020; TALEBIAN et al., 2020; GAO et al., 2021; SRIVASTAVA et al., 2021).

Outra área de grande interesse na nanotecnologia é a Microbiologia com estudos envolvendo nanopartículas com atividade antimicrobiana contra bactérias, fungos, protozoários e vírus, incluindo microrganismos multirresistentes (ADEYEMI et al., 2018; SCANDORIEIRO et al., 2016). A multirresistência bacteriana é atualmente considerada uma das principais ameaças à saúde pública global, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) e estima-se que, a menos que sejam tomadas medidas, o número de mortes em todo o mundo poderia aumentar para 10 milhões a cada ano até 2050 (O'NEILL, 2014; 2016).

A resistência antimicrobiana pode ocorrer de maneiras diferentes, tais como: (i) alteração de permeabilidade da superfície bacteriana, (ii) sistema de efluxo (expulsão do medicamento para fora da célula), (iii) inativação do antimicrobiano por enzimas bacterianas e (iv) alteração do alvo bacteriano do medicamento (LIMA; DEL FIOL; BALCÃO, 2019). Resumidamente na Figura 8, apresentamos os principais mecanismos de multirresistência em *P. aeruginosa*.

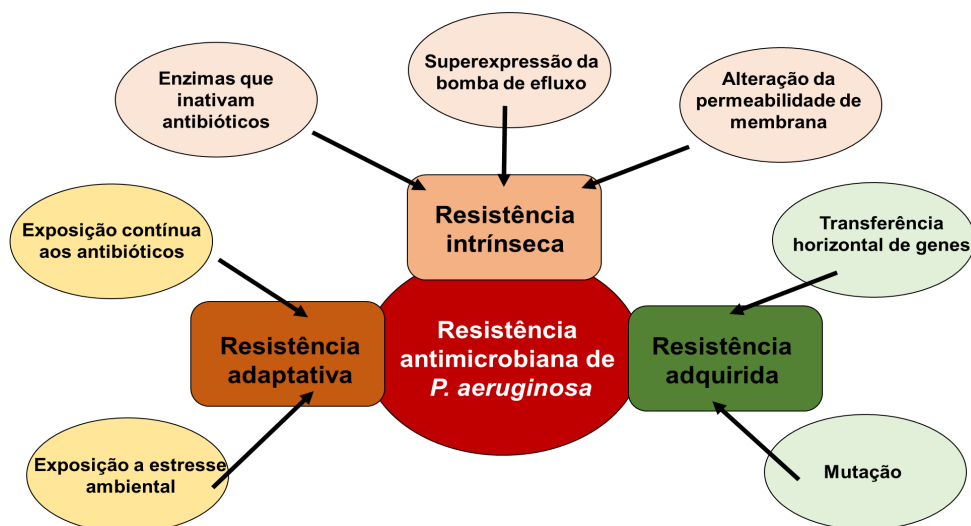


Figura 8 - Mecanismos propostos para resistência aos antimicrobianos em *P. aeruginosa*. Esta bactéria pode apresentar resistência adaptativa, intrínseca e adquirida.
Fonte: adaptado de Pachori; Gothalwal; Gandhi (2019).

A presença desses mecanismos de resistência está cada vez mais frequente em muitos microrganismos, devido à pressão seletiva do uso dos antimicrobianos, resultando na seleção natural de microrganismos resistentes (TELLO; AUSTIN; TELFER, 2012).

Por isso, as nanopartículas em aplicações biomédicas podem representar um grande aliado no desenvolvimento de sistemas eficientes de diagnóstico e tratamento, permitindo o avanço nos estudos que envolvem o controle de microrganismos multirresistentes. Entretanto, o uso racional e a aplicação planejada da nanotecnologia é um fator importante para o controle da multirresistência bacteriana.

Diversas nanopartículas metálicas já foram descritas em pesquisas científicas, como por exemplo, as de prata (AgNP), ouro (AuNP); e óxidos de metal como de zinco (ZnO), cobre (CuO), etc. Dentre estas, as AgNPs estão entre as mais estudadas e possuem um grande potencial antimicrobiano (NATAN; BANIN, 2017; LEI; KARIM, 2020).

3.4.1 Nanopartículas de prata (AgNP)

A prata e os compostos de prata têm sido amplamente utilizados ao longo da história para diferentes aplicações, desde utensílios, jóias e moedas até com

finalidades medicamentosas (RUSSELL; HUGO, 1994; CHEN; SCHLUESENER, 2008). E desde a antiguidade possui seu reconhecimento por seus efeitos antimicrobianos potentes (RUSSELL; HUGO, 1994; JAIN et al., 2009).

Para a produção das nanopartículas (NP), duas rotas são as mais utilizadas: a síntese química (tradicionalmente empregada) e a síntese biogênica ou biológica, considerada mais vantajosa devido a sua rapidez, simplicidade e sustentabilidade, além de evitar o uso de solventes orgânicos e reagentes tóxicos. Nas duas sínteses, as rotas são baseadas na redução de íons prata (Ag^+) a Ag^0 , formando as nanopartículas de prata (AgNP) (DURÁN et al., 2019; LEE; JUN, 2019).

As AgNPs podem apresentar diversas formas, como esférica, plana, triangular, tetraédrica, prismática, cúbica, octaédrica e irregulares (CHERNOUSOVA; EPPLE, 2013).

O mecanismo de ação das NP de prata nas bactérias ainda não foi totalmente esclarecido, mas envolve quatro principais mecanismos (Figura 9): (1) adesão das nanopartículas à superfície bacteriana, (2) desestabilização de parede e membrana celulares, com alteração de sua permeabilidade, (3) indução de estresse oxidativo pela geração de espécies reativas de oxigênio e (4) genotoxicidade (LEE; JUN, 2019).

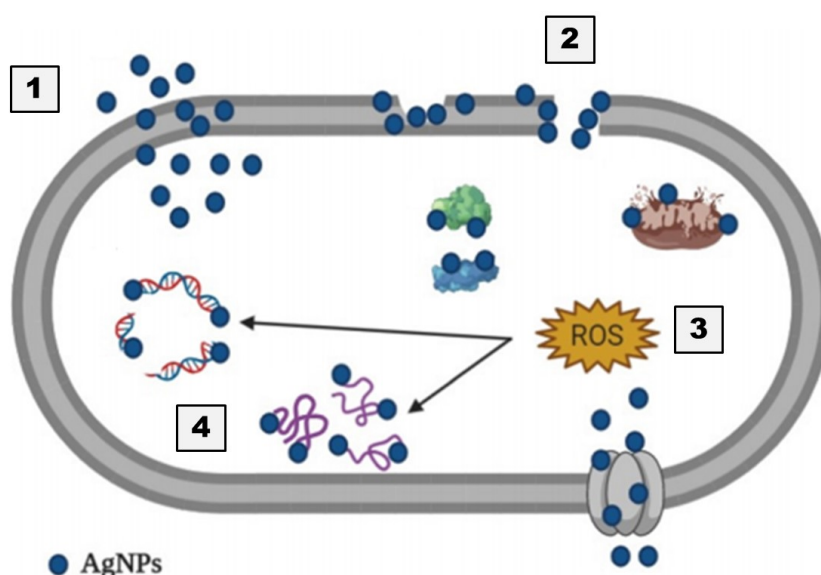


Figura 9 - Mecanismos antibacterianos de nanopartículas de prata. (1) AgNPs aderem à superfície de uma célula, danificando sua membrana e alterando a atividade de transporte. (2) AgNPs e íons Ag penetram dentro da célula e interagem com organelas celulares e biomoléculas, que podem afetar função celular. (3) AgNPs e íons Ag geram espécies reativas de oxigênio levando a um dano celular. (4) AgNPs e íons Ag induzem a genotoxicidade, através de danos no DNA.

Fonte: adaptado de Lee; Jun (2019) e De Lacerda Coriolano et al. (2021).

As AgNPs são um dos nanomateriais mais estudados atualmente. São amplamente utilizadas devido às suas características como estabilidade química, maleabilidade, flexibilidade, elevada condutividade elétrica e térmica, atividade catalítica, relativo baixo custo de produção, e principalmente potente ação antimicrobiana (DURÁN et al., 2019).

Devido a essas propriedades únicas as AgNPs tem atraído bastante interesse na indústria têxtil (vestuários) e indústria alimentar (recipientes para alimentos, superfícies de frigorífico e tábuas de cortar), bem como em aplicações médicas (curativos para feridas e queimaduras, cateteres, instrumentos cirúrgicos, próteses ósseas e antimicrobianos) (McNAMARA; TOFAIL, 2017; YUSUF; 2019). Nestas áreas a prata é uma das nanopartículas mais utilizadas e aplicadas devido à sua atividade antimicrobiana (DANKOVICH; GRAY, 2011; GEHRKE; GEISER; SOMBORN-SCHULZ, 2015; MOUSTAFA, 2017; HE; DENG; HWANG, 2018; WHO, 2018).

A propriedade antimicrobiana das AgNPs tem sido bem documentada na literatura. Estudos realizados com AgNPs biogênicas apresentaram resultados satisfatórios contra bactérias *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* produtoras de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) e produtoras de carbapenemases tipo KPC, *S. aureus*, *S. Typhimurium* (SCANDORIEIRO et al., 2016). Outros estudos também comprovaram a eficiência antimicrobiana contra *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enterica* ATCC 14028 (ROLIM et al., 2018) e *Listeria monocytogenes* MTCC 657 (SINHA; MANJHI, 2020).

Além da atividade antimicrobiana, as AgNPs têm se destacado em estudos que buscam métodos alternativos de controle da disseminação de bactérias multirresistentes através das terapias antivirulências.

3.4.2 Nanopartículas de prata como inibidores do Sistema *Quorum Sensing*

Por muitos anos, as propriedades antimicrobianas dos nanomateriais foram estudadas. Embora a literatura sobre o potencial *Quorum Quenching* (QQ) ou inibidores QS das NPs seja escassa, estudos recentes estão avaliando a capacidade das nanopartículas metálicas em inibir comunicação celular ou *quorum*

sensing em diversos microrganismos, especialmente em *P. aeruginosa* (QAIS; KHAN; AHMAD, 2018; SHAH et al., 2019; AHMED et al., 2020; LAHIRI et al., 2021).

As AgNPs podem potencialmente bloquear a biossíntese das moléculas sinalizadoras (autoindutores) pela inibição da proteína sintase LasI/RhII. Além disso, as AgNPs podem inativar as proteínas reguladoras LasR / RhIR que bloqueia a expressão de genes de virulência controlados pelo QS (ALI et al., 2017).

Singh et al. (2015) ao testarem AgNPs sintetizados a partir de *Rhizopus arrhizus* verificaram a redução da formação de biofilmes, expressão de fatores de virulência (protease, elastase, piocianina, ramnolipídeos e alginato), e produção de autoindutores em *P. aeruginosa*. Houve redução de 2-76% na produção de moléculas de sinalização após o tratamento de células com várias concentrações de AgNPs (0–25 µg / mL). Na análise da expressão gênica foi possível observar que a expressão dos genes *lasI*, *rhII*, *lasR* e *rhIR* foram regulados negativamente por 71, 63, 51 e 36%, respectivamente na concentração de 25 µg/mL AgNP. Shah et al. (2019) também evidenciaram a inibição da produção de piocianina, elastase e formação de biofilme que são regulados pelo QS após tratamento com AgNPs.

Este mecanismo visa inibir a virulência bacteriana, sem impedir o seu crescimento é uma estratégia eficaz para controlar os patógenos (HAYAT et al., 2019). É esperado que o uso de inibidores de QS exerça menos pressão seletiva no desenvolvimento de multirresistência. Mühlhling et al. (2009) verificaram que as bactérias que viviam naturalmente em sedimentos estuarinos, quando expostos as diferentes concentrações de AgNPs (50 e 2000 µg/L), não desenvolveram resistência aos antimicrobianos.

Entretanto, não podemos descartar que a resistência possa ocorrer com o passar dos anos. Por isso, além da resistência às NPs, outra grande preocupação, é a utilização de concentrações subinibitórias de nanopartículas, uma vez que não é conhecido ao certo a resposta bacteriana a estes nanometais. Como exemplo da variedade das respostas às concentrações de nanopartículas, há pesquisas que apresentam resultados com aumento da produção de autoindutores após exposição de AgNPs. Li et al. (2018) ao testarem AgNP em concentrações subinibitórias (100 µg/L) em *P. aeruginosa* PAO1, evidenciaram o aumento significativo da produção de autoindutores, produção da protease, formação de biofilmes e no nível de expressão do gene *lasR*.

Por isso, o efeito das AgNPs sobre o QS está em fase de pesquisa preliminar e mais estudos devem ser realizados para entender o mecanismo exato da inibição ou possível indução do QS por estes compostos contra os microrganismos patogênicos.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABISADO, R. G. et al. Bacterial Quorum Sensing and Microbial Community Interactions. **mBio**, v. 9, n. 3, p. e02331-17, 2018.
- ADEYEMI, O.S. et al. Metal nanoparticles restrict the growth of protozoan parasites. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 46:sup3, p. S86-S94, 2018.
- AHMED, T. et al. Inhibition of quorum sensing-associated virulence factors and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by *Mycoleptodiscus indicus* PUTY1. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 467-487, 2020.
- ALBUQUERQUE, P.; CASADEVALL, A. Quorum sensing in fungi – a review. **Medical Mycology**, v. 50, n. 4, 2, p. 337–345, 2012.
- ALI, S. G. et al. Antiquorum sensing activity of silver nanoparticles in *P. aeruginosa*: an in silico study. **In Silico Pharmacology**, v. 20, p.12, 2017.
- ASIF, M. Natural Anti-Quorum Sensing agents against *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Chemical Reviews**, v. 2, n. 1, p. 57-69, 2020.
- AZAM, M.W., KHAN, A.U. Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. **Drug Discovery Today**, v. 24, n. 1, p. 350-359, 2019.
- AZIMI, S. *et al.* Bacterial Quorum Sensing During Infection. **Annual Review of Microbiology**, v.74, n.1, p. 201-219, 2020.
- BANU, N.; MARY, N. I. Review on anti quorum sensing activity in *Pseudomonas aeruginosa* using plants extracts. **Asiarn Journal of Microbiology Biotechnology & Environmental Sciences**, v.18, n. 3, p. 663-671, 2016.
- BEHZADI, P., BARÁTH, Z., GAJDÁCS, M. It's Not Easy Being Green: A Narrative Review on the Microbiology, Virulence and Therapeutic Prospects of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Antibiotics (Basel)**, v. 10, n. 42, p. 1-29, 2021.
- BIJTENHOORN, P. et al. A novel metagenomic short-chain dehydrogenase/reductase attenuates *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and virulence on *Caenorhabditis elegans*. **PloS one**, v. 6, n. 10, p. e26278, 2011.
- BLEVES, S. et al. Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: A wealth of pathogenic weapons. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, n.8, p. 534-43, 2010.
- BRINDHADEVI, K. et al. Biofilm and Quorum sensing mediated pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*. **Process Biochemistry**, v. 96, p. 49–57, 2020.
- BRINT, J.M., OHMAN, D.E. Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the control of RhIR-RhII, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family. **Journal of Bacteriology**, v.177, p. 7155–7163, 1995.

BOUYAHYA, A. et al. Medicinal plant products targeting quorum sensing for combating bacterial infections. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v.10, n. 8, p. 729-743, 2017.

BUNDSCHUH, M. et al. Nanoparticles in the environment: where do we come from, where do we go to?. **Environmental Sciences Europe**, v.30, n.6, 2018.

BURROWS, L. L. *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility: type IV pili in action. **Annual Review of Microbiology**, v. 66, p. 493-520, 2012.

CANCINO, J.; MARANGONI, V.S.; ZUCOLOTTO, V. Nanotecnologia em medicina: aspectos fundamentais e principais preocupações. **Quimica Nova**, v. 37, n. 3, p. 521-526, 2014.

CARRASCOSA, C. et al. Microbial Biofilms in the Food Industry-A Comprehensive Review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n.4, 2021.

CASTILLO-JUÁREZ, I. et al. Role of quorum sensing in bacterial infections. **World Journal of Clinical Cases**, v. 3, n. 7, p. 575–598, 2015.

CHAUHAN, D. S. et al. Comprehensive Review on Current Interventions, Diagnostics, and Nanotechnology Perspectives against SARS-CoV-2. **Bioconjugate Chemistry**, v. 31, n.9, p. 2021-2045, 2020.

CHEN, X.; SCHLUESENER, H. J. Nanosilver: a nanoparticle in medical application. **Toxicology Letters**, v.176, n. 1, p. 1-12, 2008.

CHERNOUSOVA, S; EPPLE, M. Silver as antibacterial agent: ion, nanoparticle, and metal. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 52, n. 6, p. 1636-1653, 2013.

CILLÓNIZ, C., DOMINEDÒ, C., TORRES, A. Multidrug Resistant Gram-Negative Bacteria in Community-Acquired Pneumonia. **Critical Care**, v.23, n.1, 2019.

CORNELIS, P. Putting an end to the *Pseudomonas aeruginosa* IQS controversy. **MicrobiologyOpen**, p. 9:e962, 2020.

DAS, T. et al. Pyocyanin facilitates extracellular DNA binding to *Pseudomonas aeruginosa* influencing cell surface properties and aggregation. **PLoS One**, v. 8, n.3, 2013.

DAS, T. et al. **Chapter 3 - *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and infections: Roles of extracellular molecules**. Ed. Yadav, M.K.; Singh, B.P. New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Biofilms, Elsevier, p. 29-46, 2020.

DANKOVICH, T. A., GRAY, D. G. Bactericidal Paper Impregnated with Silver Nanoparticles for Point-of-Use Water Treatment. **Environmental Science & Technology**, v.45, n.5, p.1992–1998, 2011.

DEFOIRDT, T. Quorum-Sensing Systems as Targets for Antivirulence Therapy. **Trends in Microbiology**, v. 26, n. 4, p. 313-328, 2018.

DEFOIRDT, T.; BRACKMAN, G.; COENYE, T. Quorum sensing inhibitors: how strong is the evidence? **Trends in Microbiology**, v. 21, n.12, p. 619–624, 2013.

DE LACERDA CORIOLANO, D. et al. Antibacterial and antibiofilm potential of silver nanoparticles against antibiotic-sensitive and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 267-278, 2021.

DIGGLE, S.P. et al. The galactophilic lectin, LecA, contributes to biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*. **Environmental Microbiology**, v.8, p.1095–1104, 2006.

DIGGLE, S.P.; WHITELEY, M. Microbe Profile: *Pseudomonas aeruginosa*: opportunistic pathogen and lab rat. **Microbiology (Reading)**, v. 166, n.1, p. 30-33, 2020.

DOU, Y. et al. *Acinetobacter baumannii* quorum-sensing signalling molecule induces the expression of drug-resistance genes. **Molecular Medicine Reports**, v. 15, n. 6, p. 4061-4068, 2017.

DURÁN, N. et al. Nanotoxicologia de nanopartículas de prata: toxicidade em animais e humanos. **Química Nova**, v. 42, n. 2, p. 206-213, 2019.

EBERHARD, A. et al. Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. **Biochemistry**, v. 20, n. 9, p. 2444–2449, 1981.

ENGEBRECHT, J.; SILVERMAN, M. Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 81, n.13, p.4154–4158, 1984.

FIGUEREDO, A.C.D. et al. *Pseudomonas aeruginosa*: panorama do perfil de resistência aos carbapenêmicos no Brasil. **Brazilian Journal of Development**, v.7, n.1, p. 9661-9672, 2021.

FILLOUX A. Protein Secretion Systems in *Pseudomonas aeruginosa*: An Essay on Diversity, Evolution, and Function. **Frontier in Microbiology**, v. 18, p.155, 2011

FRESCHI, L. et al. The *Pseudomonas aeruginosa* pan-genome provides new insights on its population structure, horizontal gene transfer and pathogenicity. **Genome Biology and Evolution**, v. 11, n. 1, p. 109-120, 2019.

FUQUA, W.C.; WINANS, S.C.; GREENBERG, E.P. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. **Journal of Bacteriology**, v.176, n. 2, p. 269-275, 1994.

GADKARI, R. R. et al. A. Silver Nanoparticles in Water Purification: Opportunities and Challenges. **Modern Age Environmental Problems and Their Remediation**, p.229–237, 2018.

GARCÍA-CONTRERAS, R. Is Quorum Sensing interference a viable alternative to treat *Pseudomonas aeruginosa* infections? **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p.1454, 2016.

GARCÍA-LARA, B. et al. Inhibition of quorum-sensing-dependent virulence factors and biofilm formation of clinical and environmental *Pseudomonas aeruginosa* strains by ZnO nanoparticles. **Letters in Applied Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 299-305, 2015.

GAO, Y. et al. Rapid and sensitive triple-mode detection of causative SARS-CoV-2 virus specific genes through interaction between genes and nanoparticles. **Analytica Chimica Acta**, n. 1154, p. 338330, 2021.

GEHRKE, I.; GEISER, A.; SOMBORN-SCHULZ, A. Innovations in nanotechnology for water treatment. **Nanotechnology, Science and Applications**, v.6, n.8, p. 1-17, 2015.

GHAFOOR, A.; HAY, I.D.; REHM, B.H. Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77, p. 5238–5246, 2011.

GOSWAMI, J. Quorum Sensing by Super Bugs and their Resistance to Antibiotics, a Short Review. **Global Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n.3, p. 555614, 2017.

HA, D.-G.; KUCHMA, S. L.; O'TOOLE, G. A. **Plate-Based Assay for Swimming Motility in *Pseudomonas aeruginosa***. Alain Filloux and Juan-Luis Ramos (eds.), *Pseudomonas Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, 59–65, 2014.

HALL, S. et al. Cellular Effects of Pyocyanin, a Secreted Virulence Factor of *Pseudomonas aeruginosa*. **Toxins**, v. 8, n. 8, p. 236, 2016.

HARGREAVES, K. R.; KROPINSKI, A. M.; CLOKIE, M. R. What does the talking?: quorum sensing signalling genes discovered in a bacteriophage genome. **PLoS One**, v. 24, n. 1, p. e85131, 2014.

HAQUE, M. et al. Quorum sensing: a new prospect for the management of antimicrobial-resistant infectious diseases. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, n. 8, p. 1-16, 2020.

HAQUE, S. et al. Quorum sensing pathways in Gram-positive and -negative bacteria: potential of their interruption in abating drug resistance. **Journal of Chemotherapy**, p.1–27, 2019.

HAUSER, A.R. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. **Nature Reviews Microbiology**, v.7, n. 9, p. 654-65, 2009.

HAYAT, S. et al. Quorum quenching: role of nanoparticles as signal jammers in Gram-negative bacteria. **Future Microbiology**, v.14, p. 61-72, 2019.

HE, J. et al. 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**, v.101, n.8, p. 2530-2535, 2004.

HE, X.; DENG, H.; HWANG, H. The current application of nanotechnology in food and agriculture. **Journal of Food and Drug Analysis**, n.27, p.1-21, 2018.

HEINE, H.; RIETSCHEL, E. T.; ULMER, A. J. The biology of endotoxin. **Molecular Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 279-296, 2001.

HODGKINSON, J. T. et al. A new *Pseudomonas* quinolone signal (PQS) binding partner: MexG. **Chemical Science**, v. 7, p. 2553–2562, 2016.

JAIN, J. et al. Silver nanoparticles in therapeutics: development of an antimicrobial gel formulation for topical use. **Molecular Pharmaceutics**, v. 6, n. 5, p.1388-1401, 2009.

JAISWAL, L.; SHANKAR, S.; RHIM, J-W. **Applications of nanotechnology in food microbiology**. Chapter 3 - Applications of nanotechnology in food microbiology. *Methods in Microbiology*, v. 46, p. 43-60, 2019.

JIANG, Q. et al. Quorum Sensing: A Prospective Therapeutic Target for Bacterial Diseases. **BioMed Research International**, p. 2015978, 2019.

KALIA, V. C. Quorum sensing inhibitors: An overview. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 2, p. 224–245, 2013.

KALIA, M. et al. Effect of Cinnamon oil on quorum sensing-controlled virulence factors and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. **PLOS ONE**, v.10, n. 8, p. e0135495, 2015.

KANG, D. et al. Pyoverdine, a siderophore from *Pseudomonas aeruginosa*, translocates into *C. elegans*, removes iron, and activates a distinct host response. **Virulence**, v.9, n.1, p.804-817, 2018.

KASI VISWANATHAN, H.; THOMAS, N. R.; AMARANATH, G. Nanotechnology in the Food Industry—And the Benefits and Improvements in Food Processing and Packaging Brought About by it. **Emerging Trends of Nanotechnology in Environment and Sustainability**, p.21–25, 2018.

KEARNS D. B. A field guide to bacterial swarming motility. **Nature reviews Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 634–644, 2010.

KHAN, F. et al. Fucoidan-Stabilized Gold Nanoparticle-Mediated Biofilm Inhibition, Attenuation of Virulence and Motility Properties in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Marine Drugs**, v. 17, n. 4, 208, 2019.

KIM, S.; YEON, K. **Chapter Two - Quorum Sensing as Language of Chemical Signals**. *Comprehensive Analytical Chemistry*, v. 81, p. 57-94, 2018.

KLOCKGETHER, J. et al. *Pseudomonas aeruginosa* Genomic Structure and Diversity. **Frontiers in Microbiology**, v.13 n. 2:150, 2011.

KOHLER, T. et al. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. **Journal of Bacteriology**, n.182, p. 5990–5996, 2000.

LAARMAN, A. J. et al. *Pseudomonas aeruginosa* Alkaline Protease Blocks Complement Activation via the Classical and Lectin Pathways. **The Journal of Immunology**, v.188, p. 386-393, 2012.

LAHIRI, D. et al. Microbiologically-Synthesized Nanoparticles and Their Role in Silencing the Biofilm Signaling Cascade. **Frontier in Microbiology**, v. 12, p. 636588, 2021.

LAILA, H. J. E. A.; SANTOS, R. C. V. Aspectos gerais e mecanismos moleculares envolvidos na formação de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*. **Disciplinarum Scientia. Série: Ciências da Saúde**, v. 17, n. 1, p. 125-144, 2016.

LAM, J.S. et al. Genetic and functional diversity of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide. **Frontier in Microbiology**, v. 2, p. 1-25, 2011.

LAZZARETTI, L.L.; HUPFFER, H.M. Nanotecnologia e sua regulamentação no Brasil. **Revista Gestão e Desenvolvimento**, v. 16, n. 3, 2019.

LEE, D.G. et al. Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. **Genome Biology**, v. 7, n. 10, p. R90, 2006.

LEE, J. et al. A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response. **Nature Chemical Biology**, v. 9, p. 339-343, 2013.

LEE, J.; ZHANG, L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. **Protein Cell**, v.6, n.1, p. 26–41, 2015.

LEE, K.; YOON, S. S. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm, a Programmed Bacterial Life for Fitness. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 6, p. 1053-1064, 2017.

LEE, S. H.; JUN, B. H. Silver Nanoparticles: Synthesis and Application for Nanomedicine. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 4, p. 865, 2019.

LEI, Z.; KARIM, A. The challenges and applications of nanotechnology against bacterial resistance. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, p. 1-17, 2020.

LI, N. et al. Effects of low-level engineered nanoparticles on the quorum sensing of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 7, p. 7049-7058, 2018.

LIMA, R.; DEL FIOL, F. S.; BALCÃO, V. M. Prospects for the use of new technologies to combat multidrug-resistant bacteria. **Frontiers in Pharmacology**, n. 10, p. 692, 2019.

LUÍS A. et al. Chemical composition, antioxidant, antibacterial and anti-quorum sensing activities of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus radiata* essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 79, p. 274-282, 2016.

MAISURIA, V. B.; NERURKAR, A. S. Interference of Quorum Sensing by *Delftia* sp. VM4 Depends on the Activity of a Novel N-Acylhomoserine Lactone-Acylase. **PLoS one**, v. 10, n. 9, p. e0138034, 2015.

MCNAMARA, K.; TOFAIL, S. A. M. Nanoparticles in biomedical applications. **Advances in Physics X**, v. 2, n. 1, p. 54-88, 2017.

MELIANI, A.; BENSOLTANE, A. Review of *Pseudomonas* Attachment and Biofilm Formation in Food Industry. **Poultry, Fisheries & Wildlife Sciences**, v.3, p. 1-7, 2015.

MICHALSKA, M.; WOLF, P. *Pseudomonas* Exotoxin A: optimized by evolution for effective killing. **Frontier in Microbiology**, v.6, p.963, 2015.

MIKKELSEN, H.; MCMULLAN, R.; FILLOUX A. The *Pseudomonas aeruginosa* reference strain PA14 displays increased virulence due to a mutation in *ladS*. **PLoS One**, v.6, n.12, p.e29113, 2011.

MOUSTAFA, M. T. Removal of pathogenic bacteria from wastewater using silver nanoparticles synthesized by two fungal species. **Water Science**, v.31, n.2, p. 164–176, 2017.

MULAMATTATHIL, S. G.; BEZUIDENHOUT, C.; MBEWE, M. Biofilm formation in surface and drinking water distribution systems in Mafikeng, South Africa. **South African Journal of Science**, v.110, n.11/12, p. 1-9, 2014.

MÜHLING, M. et al. An investigation into the effects of silver nanoparticles on antibiotic resistance of naturally occurring bacteria in an estuarine sediment. **Marine Environmental Research**, v. 68, n. 5, p. 278-283, 2009.

NATAN, M.; BANIN, E. From Nano to Micro: using nanotechnology to combat microorganisms and their multidrug resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 3, p. 302-322, 2017.

NEALSON, K. H.; PLATT, T.; HASTINGS, J. W. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. **Journal of Bacteriology**, v.104, p. 313–322, 1970.

NEWMAN, J.W.; FLOYD, R.V.; FOTHERGILL, J.L. The contribution of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors and host factors in the establishment of urinary tract infections. **FEMS Microbiology Letters**, v.364, n.15, p.1-11, 2017.

NOMURA, K. et al. *Pseudomonas aeruginosa* elastase causes transient disruption of tight junctions and downregulation of PAR-2 in human nasal epithelial cells. **Respiratory Research**, v. 15, n. 21, p. 1-15, 2014.

O'NEILL, J. **Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations**. 2014. Disponível em: <https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf>. Acesso em: nov. 2020.

O'NEILL, J. **Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations**. 2016. Disponível em: <http://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf>. Acesso em: nov. 2020.

OTTON, L. M. et al. Influence of twitching and swarming motilities on biofilm formation in *Pseudomonas* strains. **Archives of Microbiology**, v.199, n.5, p. 677-682, 2017.

OUYANG, K. et al. Towards a better understanding of *Pseudomonas putida* biofilm formation in the presence of ZnO nanoparticles (NPs): Role of NP concentration. **Environment International**, n.137, p.105485, 2020.

PACHORI, P.; GOTHALWAL, R.; GANDHI P. Emergence of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit; a critical review. **Genes & Disease**, v.6, n. 2, p. 109-119, 2019.

PACZKOWSKI, J. E. et al. Flavonoids suppress *Pseudomonas aeruginosa* virulence through allosteric inhibition of quorum-sensing receptors. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 10, p. 4064–4076, 2017.

PADDER, S. A.; PRASAD, R.; SHAH, A. H. Quorum sensing: A less known mode of communication among fungi. **Microbiological Research**, v. 210, p. 51-58, 2018.

PALLERONI, N. J. The *Pseudomonas* story. **Environmental Microbiology**, v.12, n.6, p. 1377-1383, 2010.

PANG, Z. et al. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. **Biotechnology Advances**, v.37, p.177-192, 2019.

PAPENFORT, K.; BASSLER, B. L. Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v.14, p. 576-88, 2016.

PARK, S. Y. et al. N-acylhomoserine lactonase producing *Rhodococcus* spp. with different AHL-degrading activities. **FEMS Microbiology Letters**, v. 261, n. 1, p. 102-108, 2006.

PASSADOR, L. et al. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. **Science**, v. 260, n.5111, p. 1127–1131, 1993.

PÉREZ-PÉREZ, M. et al. Quorum sensing inhibition in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: new insights through network mining, **Biofouling**, v. 33, n.2, p.128–142, 2017.

PESCI, E. C. et al. Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, p. 11229–11234, 1999.

PRABHURAJESHWAR, C. A review on emergence of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal of Recent Scientific Research**, v. 10, n. 05, p. 32502-32505, 2019.

QAIS, F.A.; KHAN, M. S.; AHMAD, I. **Nanoparticles as Quorum Sensing Inhibitor: Prospects and Limitations**. In: Kalia V. (eds) Biotechnological Applications of Quorum Sensing Inhibitors. Springer, p. 227–243, 2018.

RAI, M. Nanobiotecnologia verde: biossínteses de nanopartículas metálicas e suas aplicações como nanoantimicrobianos. **Ciência e Cultura**, v. 65, n. 3, p. 44-48, 2013.

REUTER, K.; STEINBACH, A.; HELMS, V. Interfering with bacterial Quorum Sensing. **Perspectives in Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 1–15, 2016.

ROCHA, A. J. et al. *Pseudomonas aeruginosa*: Virulence Factors and Antibiotic Resistance Genes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 62, p. e19180503, 2019.

ROJAS, F.; MATTHEWS, K.R. Quorum sensing in African trypanosomes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 52, p. 124-129, 2019.

ROLIM, W. R. et al. Green tea extract mediated biogenic synthesis of silver nanoparticles: Characterization, cytotoxicity evaluation and antibacterial activity. **Applied Surface Science**, v. 463, p. 66-74, 2018.

ROSSI, E. et al. “It’s a gut feeling” – *Escherichia coli* biofilm formation in the gastrointestinal tract environment. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 44, p. 1-30, 2017.

ROSSI, E. et al. *Pseudomonas aeruginosa* adaptation and evolution in patients with cystic fibrosis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, p. 331–342, 2021.

RUSSELL, A. D.; HUGO, W. B. Antimicrobial activity and action of silver. **Progress in Medicinal Chemistry**, n.31, p. 351-370, 1994.

SALEH, M. M.; ABBAS, H. A.; ASKOURA, M. M. Repositioning secnidazole as a novel virulence factors attenuating agent in *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbial Pathogenesis**, v. 127, p. 31–38, 2019.

SAXENA, P. et al. Biofilms: Architecture, Resistance, Quorum Sensing and Control Mechanisms. **Indian Journal of Microbiology**, v. 59, n. 1, p. 3-12, 2019.

SCANDORIEIRO, S. et al. Synergistic and Additive Effect of Oregano Essential Oil and Biological Silver Nanoparticles against Multidrug-Resistant Bacterial Strains. **Frontier Microbiology**, v. 23, n. 7, p. 760, 2016.

SCHAUDER, S.; BASSLER, B. L. The languages of bacteria. **Genes & Development**, v. 15, p. 1468-1480, 2001.

SHAH, S. et al. Biofilm inhibition and anti-quorum sensing activity of phytosynthesized silver nanoparticles against the nosocomial pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. **Biofouling**, v. 35, n. 1, p. 34-49, 2019.

SHARIFI, A. et al. Antibacterial, antibiofilm and antiquorum sensing effects of *Thymus daenensis* and *Satureja hortensis* essential oils against *Staphylococcus aureus* isolates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 124, n. 2, p. 379-388, 2018.

SINGH, B. R. et al. Mycofabricated biosilver nanoparticles interrupt *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing systems. **Scientific Reports**, v. 5, p. 13719, 2015.

SINHA, A.; MANJHI, J. Role of Green Silver Nanoparticles in the Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. **Nanoscience & Nanotechnology-Asia**, v.10, p. 39-50, 2020.

SIVASANKAR, C. et al. Anti quorum sensing and anti virulence activity of tannic acid and it's potential to breach resistance in *Salmonella enterica* Typhi / Paratyphi A clinical isolates. **Microbial Pathogenesis**, v. 138, p. 103813, 2020.

SONAWANE, A.; JYOT, J.; RAMPHAL, R. *Pseudomonas aeruginosa* LecB is involved in pilus biogenesis and protease IV activity but not in adhesion to respiratory mucins. **Infection and immunity**, v.74, n.12, p. 7035–7039, 2006.

SRIVASTAVA, M. et al. Prospects of nanomaterials-enabled biosensors for COVID-19 detection. **Science of The Total Environment**, n. 754, p. 142363, 2021.

STRATEVA, T.; MITOV, I. Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Annals of Microbiology**, v. 61, p.717–732, 2011.

STOVER, C.K. et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. **Nature**, v. 31, n. 406(6799), p. 959-964, 2000.

TALEBIAN, S. et al. Nanotechnology-based disinfectants and sensors for SARS-CoV-2. **Nature Nanotechnology**, n.15, p. 618–621, 2020.

TELLO, A.; AUSTIN, B.; TELFER, T. C. Selective pressure of antibiotic pollution on bacteria of importance to public health. **Environmental Health Perspectives**, v. 120, n. 8, p. 1100–1106, 2012.

THI, M. T. T.; WIBOWO, D.; REHM, B. H. A. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 8671, P. 1-25, 2020.

TOMASZ, A. Control of the competent state in *Pneumococcus* by a hormone-like cell product: an example for a new type of regulatory mechanism in bacteria. **Nature**, v. 208, p. 155–159, 1965.

TURAN, N. B. et al. Quorum sensing: Little talks for an effective bacterial coordination. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 91, p. 1-11, 2017.

VALENTINI, M.; FILLOUX, A. Biofilms and Cyclic di-GMP (c-di-GMP) Signaling: Lessons from *Pseudomonas aeruginosa* and Other Bacteria. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 24, p. 12547–12555, 2016.

VAN DELDEN, C.; IGLEWSKI, B. H. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, n. 4, p. 551-60, 1998.

WHITELEY, M.; DIGGLE, S. P.; GREENBERG, E. P. Progress in and promise of bacterial quorum sensing research. **Nature**, v. 551. n. 7680, p. 313–320, 2017.

WHO. Alternative drinking-water disinfectants: bromine, iodine and silver. Geneva: World Health Organization; 2018.

WILLYARD, C. The drug-resistant bacteria that pose the greatest health threats. **Nature**, v. 543, p.15, 2017.

WINGENDER, J.; FLEMMING, H.-C. Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v, 214, n. 6, p. 417–423, 2011.

WOLSKA, K.; KOT, B. Twitching motility activity, biofilm formation, and genetic typing for clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* by random amplified DNA PCR. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 60, n.3, p. 313-328, 2013.

WU, L.; LUO, Y. Bacterial Quorum-Sensing Systems and Their Role in Intestinal Bacteria-Host Crosstalk. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 611413, 2021.

YADAV, R.K. et al. Expanding the horizons of nanotechnology in agriculture: recent advances, challenges and future perspectives. **Vegetos**, v. 33, p. 203–221, 2020.

YANG, Y.-X. et al. A new quorum-sensing inhibitor attenuates virulence and decreases antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Microbiology**, v. 50, n. 6, p. 987–993, 2012.

YUSUF, M. **Silver Nanoparticles: Synthesis and Applications**. In: Martínez L., Kharissova O., Kharisov B. (eds) Handbook of Ecomaterials. Springer, Cham, 2019.

ZOHAR, B. A.; KOLODKIN-GAL, I. **Quorum Sensing in *Escherichia coli*: Interkingdom, Inter- and Intraspecies Dialogues, and a Suicide-Inducing Peptide**. In: Kalia V. (eds) Quorum Sensing vs Quorum Quenching: A Battle with No End in Sight. Springer, New Delhi, 2015.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão, juntamente com a metodologia necessária para o desenvolvimento desta tese de doutorado foram apresentados na forma de três artigos.

Artigo de revisão 1 – “Quorum Sensing system: target to control the spread of bacterial infections” (doi: 10.1016/j.micpath.2020.104068) publicado em 13 de fevereiro de 2020 na revista **Microbial Pathogenesis**.

Artigo 2 – “Subinhibitory concentrations of biogenic silver nanoparticles affect motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*” publicado em 01 de abril de 2021 na revista **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology** seção “*Molecular Bacterial Pathogenesis*” (doi:10.3389/fcimb.2021.656984).

Artigo 3 - “Efeito das nanopartículas de prata biogênicas no Sistema Quorum Sensing de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 e PA14” no qual será submetido posteriormente.

5.1 Artigo 1

ARTIGO DE REVISÃO: Quorum sensing system: target to control the spread of bacterial infections

Microbial Pathogenesis 142 (2020) 104068



Contents lists available at ScienceDirect

Microbial Pathogenesis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/micpath**Quorum sensing system: Target to control the spread of bacterial infections**Erika Kushikawa Saeki^{a,*}, Renata Katsuko Takayama Kobayashi^b, Gerson Nakazato^b^a Regional Laboratory Center, Adolfo Lutz Institute, Presidente Prudente, São Paulo, Brazil^b Laboratory of Basic and Applied Bacteriology, Department of Microbiology, Center of Biological Sciences, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Autoinducers
Inhibitors
Quorum quenching
Bacterial resistance

ABSTRACT

Quorum Sensing (QS) systems regulate the gene expression of different types of virulence factors in accordance with the cell population density. A literature search was performed, including electronic databases such as MEDLINE/PubMed, SciELO, and LILACS, as well as other databases not indexed, such as Google Scholar. The search was conducted between July 2018 and April 2019, through online research. Antimicrobial resistance is one of the biggest threats to global health and the dissemination of resistant microbes in the environment is a major public health problem. Therefore, it is important to develop new therapies to control the spread of resistant bacteria to humans. Thus, interference in the chemical signal (autoinducers) of the QS system has been postulated as a good alternative, technically known as "Quorum Quenching" or QS inhibitors. Inhibition of QS signaling is not intended to kill the microorganism, but to block the expression of the target genes, making the cells less virulent and more vulnerable to host immune response. Anti-virulence therapy by agents that interfere with this system in pathogenic bacteria is a well-studied strategy, including medicinal plants and their bioactive constituents, and presents good prospects. This review aims to provide an overview of the QS system in bacteria and describe the main inhibitors of the system.

1. Introduction

For several years researchers have been interested in the fact that microorganisms survive in adverse conditions, such as changes in acidity, temperature, nutrient reduction, ultraviolet radiation, and exposure to toxic substances. Initially, research was related to the metabolic changes in individual bacteria in response to external stimuli, since it was believed that bacteria do not live in a community. Advancement in molecular biology and microscopy has enabled research into and understanding of the microbial community and its survival strategies [1].

It has been observed that the majority of microorganisms live in a complex community called biofilm, which can be defined as an organized group of microorganisms that live within a matrix of polymeric substances that adhere to several surfaces [2]. The competition for nutrients and other growth conditions is an important factor for the development of the biofilm structure. Moreover, bacteria in the form of biofilms are known to maintain efficient communities through secretion of chemical signals to communicate with one another, without direct physical contact [3].

Quorum sensing (QS) system is a mechanism of cellular communication between microorganisms through the secretion of extracellular

chemical signals, and its concentration is dependent on the microbial density. The QS system consists of an enzyme that catalyzes the synthesis of chemical signals, and a receptor that binds to the signal and induces the expression of genes responsible for various physiological mechanisms; such as sporulation, biofilm production, conjugation, and motility, as well as virulence factors, such as proteases, toxins, and adhesins [4,5].

Nowadays, the intensive use of antimicrobials has allowed the emergence of multidrug-resistant (MDR) and extensively resistant microorganisms (XDR), a worldwide concern, including for the World Health Organization (WHO), which warns of the necessity to control the spread of these bacteria and encourages the search for new treatments [6]. Therefore, the development of new therapies to treat infectious diseases caused by antimicrobial resistance is one of the main challenges facing science today. Thus, interference in the chemical signal of the QS system has been studied as a new form of control strategy [4,7,8]. Some of the quorum sensing inhibitors which have presented satisfactory results are bioactive compounds and essential oils obtained from plants. For this reason, researchers are increasingly focusing their studies on medicinal herbal products to identify new antipathogenic agents that could act on QS, thus controlling infections. In addition, as this strategy does not directly kill the microorganisms,

* Corresponding author.

E-mail address: erika.saeki@ial.sp.gov.br (E.K. Saeki).<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104068>

Received 12 July 2019; Received in revised form 11 February 2020; Accepted 12 February 2020

Available online 13 February 2020

0882-4010/ Published by Elsevier Ltd.

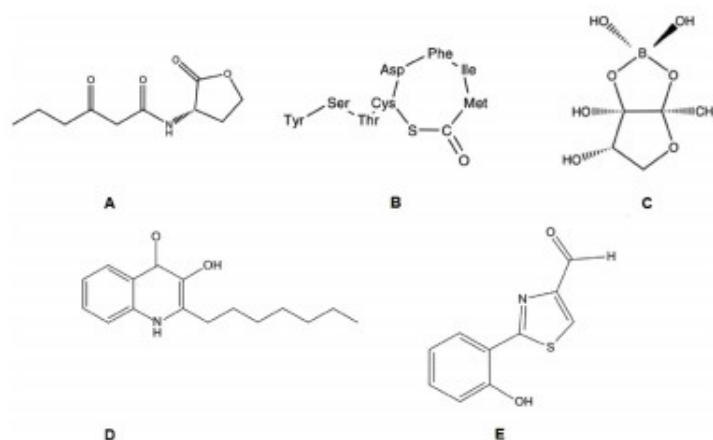


Fig. 1. Chemical structures of representative QS signals. (A) Structure 1, the *Vibrio fischeri* AHL, 3OC6-HSL. AHLs can vary in the side chain length and substitution at the third carbon position of the acyl chain, and this variation dictates the specificity of the system, (B) *Staphylococcus aureus* oligopeptide autoinducer, (C) *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* Autoinducer-2 (AI2) and, (D) 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone (*Pseudomonas* Quinolone Signal, PQS); (E) 2-(2-hydroxyphenyl)-thiazole-4-carbaldehyde (Integrated Quorum Sensing Signal, IQS) described in *P. aeruginosa*.

and there is presumably less evolutionary pressure for the development of bacterial resistance, although it is unlikely that resistance will not develop over time [9].

2. Method

The literature search included electronic databases such as MEDLINE/PubMed, SciELO (Scientific Electronic Library Online), and LILACS, as well as other databases not indexed, such as Google Scholar. The search was based on the following descriptors "quorum sensing system", "quorum quenching", "bacterial quorum sensing", "quorum sensing Gram-positive bacteria", "quorum sensing Gram-negative bacteria", "anti quorum sensing", "anti quorum sensing activity". The literature search was conducted between July 2018 and April 2019, through online research.

3. Results

3.1. Quorum sensing system

Quorum sensing is a mechanism of communication between microorganisms through the production and diffusion of small chemical or signaling molecules that control a variety of physiological functions. Bacterial physiology control can be performed in cell differentiation and nutrient availability, bioluminescence, antibiotic biosynthesis process, sporulation, biofilm formation, and to express virulence factors or transfer genetic material (conjugation and transformation processes) [10,11]. This communication system coordinates bacterial behavior and regulates the expression of genes in response to the population density [12,13]. QS systems provide bacteria with a great evolutionary advantage, allowing them to adapt to changes in the environment [14].

QS system is a very common molecular mechanism in bacteria, which involves the production and detection of small extracellular molecules, known as autoinducers. Autoinducers are produced by the cells and excreted into the extracellular medium by a simple diffusion process, accumulating in amounts proportional to the population density and detected through receptors. Once autoinducer concentrations reach a critical threshold in the local environment, they can lead to a coordinated change in gene expression in bacteria, resulting in coordinated alterations in the bacterial physiology [15].

This system starts with production and release of autoinducers into the environment, either by the pathogen or resident microbiota. This system allows the bacteria to coexist in a community and to express phenotypes that are advantageous for the group and ensure bacterial survival [16]. The most commonly studied autoinducers of QS are N-

acyl homoserine lactones (AHL) produced by Gram-negative bacteria and peptides produced by Gram-positive bacteria [17]. AHL, also known as AI-1, consist of homoserine lactone rings with an additional fatty acid side chain [16]. Although AHL signaling has traditionally been considered to be intra-specific communication, studies suggest that AHL can also be used to detect potential environmental competitors [18].

Peptides (autoinducer peptides or quorum sensing peptides) are synthesized on the ribosome of Gram-positive bacteria and exhibit post-translational modifications to their stability and functionality [1,19]. In general, the AHL molecules produced by Gram-negative bacteria diffuse passively in and out of cells, whereas peptides synthesized by these bacteria are transported out of cells via an ABC transporter. When the extracellular concentration of the peptide signal accumulates to the minimal level, a protein (histidine sensor kinase) detects it [16,17].

Autoinducer 2 (AI-2) is another class of signaling molecules and can be found in Gram-positive and Gram-negative bacteria. AI-2 is widely used for interspecies communication, so is considered a signal of universal communication between different bacterial species [20].

Autoinducer PQS, also known as quinolone, identified in *Pseudomonas aeruginosa*, is produced by proteins encoded by the *pqsABCDH* genes and, together with other auto-inducer AHL, controls the formation of biofilms and the production of virulence factors such as elastase, pyocyanin, and leucine [21,22]. More recently, the auto-inducer IQS produced by *ambBCDE*-encoded proteins has been described in *P. aeruginosa*. This molecule controls the expression of several genes associated with production of pyocyanin, rhamnolipids, and elastase [23]. Fig. 1 shows the autoinducers and their chemical structures.

3.2. First descriptions of the quorum sensing system

Early studies on a mechanism of bacterial cell communication were published in the mid-1960s and 1970s, when researchers presented the state of knowledge concerning control of the genetic competence of *Streptococcus pneumoniae* [24] and control of activity in luminescent bacteria [25], which required the production of extracellular molecules.

In the 80's, important research was published on luminescent genes of *Vibrio fischeri* [26] and the autoinducer N-3-oxohexanoyl-L-homoserine lactone - 3OC6-HSL [27]. Despite the initial studies, the terminology "quorum sensing" was first used in a review article by Fuqua et al. [28].

Bioluminescence in *V. fischeri* is controlled by the regulation of a transcriptional regulatory protein (LuxR) and a signal molecule synthase (LuxI) (Fig. 2). As the density of the microbial population

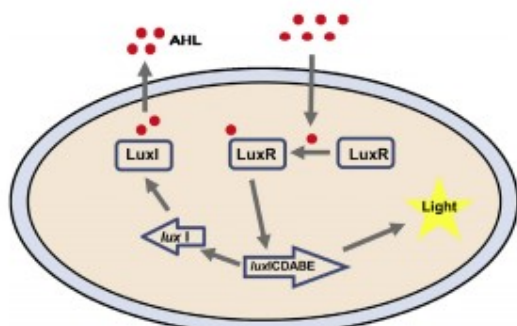


Fig. 2. Quorum sensing in *Vibrio fischeri*. There are five luciferase structural genes (*luxICDABE*) and two regulatory genes (*luxR* and *luxI*). *LuxI* (protein expressed from *luxI*) produces 3OC6-HSL (N-acyl homoserine lactones, AHL, red spheres), which specifically interacts with the *LuxR* transcriptional regulator when it reaches concentrations in the nanomolar range. This leads to expression of the *luxICDABE* operon and bioluminescence (light production).

increases, the concentration of autoinducers (AHL) gradually increases. When the concentration reaches a threshold level (corresponding to QS), the autoinducer enters the cell and binds to the *LuxR* protein to form a dimer. At this point, the *LuxR* complex is activated and transcription of the *luxICDABEG* gene occurs, resulting in increased light production and production of autoinducers [1,22,29].

V. fischeri colonizes the organs of *Euprymna scolopes*, in which it multiplies and, upon reaching the population density threshold, induces the expression of luminescent genes. The luciferase enzyme complex is responsible for the production of light and the ability to produce luminous signals that help the host find food, mate, or protect itself from predators. In return, the bacteria gain a nutrient-rich environment to live in, within marine animals [5,29].

3.3. Quorum sensing system in Gram-negative bacteria

QS systems can be expressed in different bacterial pathogens; among Gram-negative bacteria, they have been described in *Acinetobacter baumannii* [30], *P. aeruginosa* [7], and *Escherichia coli* [31]. These systems can regulate different phenotypes, as described in Table 1.

QS systems of other Gram-negative bacteria produce signaling molecules by the protein synthase homologous to *LuxI*. These proteins produce a specific AHL for each bacterial species [1]. The variations in AHL are according to the length of the carbon chain [20].

E. coli and *Salmonella* sp. do not possess the *LuxI* protein and therefore do not synthesize AHL. However, both synthesize the *SdiA* protein which recognizes and binds to AHL produced by other bacteria [32].

P. aeruginosa has four known QS systems: *las*, *rhl*, *PQS*, and integrated QS (IQS). The first two are mediated by the autoinducers homoserine N-acyl lactones (AHL), the third mediated by quinolones (signal *PQS*), and the latter, mediated by signal IQS [23,33].

In the *las* and *rhl* systems, the synthesis of AHL autoinducers is

catalyzed by a lactone synthase enzyme (*LuxI*). These systems include production of two molecules of AHL, 3OC12-HSL, and C4-HSL [34] and, consequently, the expression of several genes related to the production of proteases, exotoxins, biofilm, rhamnolipids, and pyocyanin [35].

3.4. Quorum sensing system in Gram-positive bacteria

In Gram-positive bacteria, regulation by QS is generally mediated by autoinduction of cyclic peptides, and the signal occurs through phosphorylation cascades [4]. Peptides generally require transporters to the extracellular environment, as they are not permeable to the bacterial cell membrane [1].

This mechanism of QS can be found in different bacteria such as *Staphylococcus aureus* [4], *Bacillus subtilis* [36], *Clostridium botulinum* [37], and *S. pneumoniae* [38], and can regulate different phenotypes (Table 2).

3.5. Inhibitors of the quorum sensing system

In 2017, the World Health Organization (WHO) published a global priority list of bacteria for which development of new antimicrobials is urgently required. The WHO presented a catalog with 12 bacteria, divided into three priority groups (critical, high, and medium). The species identified as highest priority are: *A. baumannii* resistant to carbapenems, *P. aeruginosa* resistant to carbapenems, and enterobacteria resistant to carbapenems and producers of extended spectrum beta-lactamases (ESBLs) [39].

Although antimicrobials continue to be the main treatment option for bacterial infections, with increasing multidrug resistance, new alternatives are needed to treat infections and fight the spread of multi-resistant bacteria.

Microorganisms synthesize different compounds and have structures that allow them to colonize and infect their host, called virulence factors. These virulence factors are controlled by the QS system; therefore, preventing their production is an important strategy for the control of bacterial diseases, that is, an antivirulence therapy. This therapy aims to "disarm" the pathogens, preventing them from attacking their host [40]. QS system signal interference has been postulated as a good alternative, technically referred to as "Quorum Quenching" or quorum sensing inhibitors (QSI) [4,5,7,8].

Interference in the QS system can be achieved by attenuation of QS communication systems through interruption of receptor proteins, degradation of autoinducing signals, or inhibition of the synthesis of QS signaling molecules, as well as the use of synthetic compounds analogous to signaling molecules [7,18].

The search for alternatives to interfere in the mechanisms of regulation of bacterial virulence has been the object of research in recent years. Several plants and their bioactive compounds and essential oils have been studied to analyze their activity against virulence factors in Gram-negative and Gram-positive bacteria such as *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *S. enterica*, *E. coli*, *Campylobacter jejuni*, *S. aureus*, and *Listeria monocytogenes* [41–44].

The main advantages of using QSI are minimal impact on host commensal flora, rapid inactivation of the target, supplementation of antibiotics to increase efficacy, blocking the secretion of multiple virulence factors and lesser selective pressure than antibiotics. This is

Table 1
Quorum sensing system and related phenotypes in Gram-negative bacteria.

Microorganism	QS system	Regulated phenotypes	Reference
<i>Vibrio fischeri</i>	<i>LuxI</i> , <i>Ain</i> , <i>LuxS</i>	Expression of bioluminescence, colonization in the host, and motility	[4]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Las</i> , <i>Rhl</i> , <i>PQS</i> , <i>IQS</i>	Virulence factors: pyocyanin, pyoverdine, elastase, alkaline protease, motility, rhamnolipids, and biofilm formation	[23]
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Lux</i>	Motility and biofilm formation	[30]
<i>Escherichia coli</i>	<i>SdiA</i>	Motility and biofilm formation	[31]

Table 2
Quorum sensing system and related phenotypes in Gram-positive bacteria.

Microorganism	QS system	Regulated phenotypes	Reference
<i>Bacillus subtilis</i>	ComQXPA	Production of surfactin and biofilm	[36]
<i>Clostridium botulinum</i>	Agr	Production of botulinum toxin and sporulation	[37]
<i>Staphylococcus aureus</i>	Agr	Production of proteases, lipases, and nucleases	[16]
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Lux	Biofilm formation and autolysis	[38]

because blocking a virulence factor would not affect the natural survival and growth of the target microorganism and thus would not favour bacterial resistance evolution [8,45].

3.6. Plants as QS inhibitors

Since ancient times, plants and their derivatives, such as essential oils (EO), have been used in folk medicine for the treatment of diseases. These oils are concentrated natural compounds with a strong smell and are produced as secondary metabolites by aromatic plants [46,47]. The oils can be obtained from plant organs such as flowers, leaves, seeds, twigs, stems, flowers, fruits, roots, wood, or bark [48]. Medicinal herbal products are believed to be prospective sources of pharmaceuticals or phytochemicals to discover new compounds for the treatment of QS-mediated bacterial virulence [8].

Essential oils are extremely complex in composition, containing several terpenoid compounds, especially monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenoids. Other molecules such as acids, alcohols, aldehydes, aliphatic hydrocarbons, acyclic esters, or lactones and phenylpropanoids may also be present [46].

Many studies have shown the efficiency of EOs to inhibit the growth of fungi and bacteria [49–52]. EOs and their components have a variety of targets, particularly the cell membrane and cytoplasm. The disruption of bacterial membranes contributes to the antibacterial properties of most essential oils [53].

For this reason, many studies with medicinal herbal products seek to identify new agents that could act on QS, thus controlling bacterial infections. Recent studies show that plant extracts can act as QSI on the inhibition of QS-controlled virulence factors (Table 3); due to the similarity of their chemical structure with QS auto-inducers (AHL), the ability to degrade signal receptors (LuxR/LasR) and inhibition of the synthesis and/or transport of autoinducers [18,34].

Table 3
Plants as QS inhibitors.

Plant species	Microorganism	Result	Reference
Cinnamon spp.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Decreased production of pyocyanin, swarming motility, protease, alginate, and biofilm	[42]
Citrus spp.	<i>Campylobacter jejuni</i>	Inhibition of biofilm formation and motility	[41]
Centella asiatica	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Decreased production of swarming motile, pyocyanin, elastase, and protease	[54]
<i>Elletaria cardamomum</i>	<i>Chromobacterium violaceum</i>	Inhibition of the production of QS-regulated violacein pigment in bacteria	[55]
<i>Eucalyptus radiata</i>	<i>Chromobacterium violaceum</i>	Inhibition of the production of QS-regulated violacein pigment in bacteria	[43]
<i>Eugenia brasiliensis</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> and <i>Serratia marcescens</i>	Decreased production of motility	[56]
<i>Farythia suspense</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Decreased production of swimming, pyocyanin, and biofilm and motility	[52]
<i>Hypericum perforatum</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Blocking of <i>las</i> and <i>rhl</i> quorum sensing systems	[57]
<i>Origanum compactum</i>	<i>Escherichia coli</i> and <i>Bacillus subtilis</i>	Decreased biofilm formation	[58]
<i>Origanum vulgare</i>	<i>Chromobacterium violaceum</i>	Inhibition of the production of QS-regulated violacein pigment in bacteria	[59]
<i>Piper betle</i>	<i>Serratia marcescens</i>	Inhibition of virulence and biofilm formation	[60]
<i>Rubus rosaefolius</i>	<i>Chromobacterium violaceum</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i> and <i>Serratia marcescens</i>	Inhibition of violacein, swarming motility, and biofilm formation	[61]
<i>Satureja hortensis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Decreased biofilm formation	[44]
<i>Thymus daenensis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Decreased biofilm formation	[44]

4. Conclusion

Studies on quorum sensing systems demonstrate that bacteria have developed several forms of intra and interspecies communication. Due to the spread of multiresistant bacteria and infections without treatment options, the development of new control strategies is essential.

The strategy of anti-virulence therapy using agents that interfere in the Quorum Sensing system of pathogenic bacteria has been intensely studied in recent years and presents good prospects. If virulence can be controlled, it is hoped that the host immune system will be capable of overcoming any infections. Although the risk of development of resistance is lower than with antimicrobial therapy it is unlikely that resistance will not develop over time.

However, research is needed to investigate the impact of the use of these inhibitors on the beneficial activities of non-target bacteria, such as those present in the microbiome; as well as their potential use in antimicrobial therapy, therapies combined with other antimicrobials, and/or as coatings of medical devices.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Declaration of competing interest

We declare that we have no conflicts of interest.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104068>.

References

- [1] S. Kim, K. Yeon, Chapter two - quorum sensing as language of chemical signals, *Compr. Anal. Chem.* 81 (2018) 57–94, <https://doi.org/10.1016/bs.coac.2018.03.010>.
- [2] J. Hurlow, K. Couch, K. Laforet, L. Bolton, D. Metcalf, P. Bowler, Clinical biofilms: a challenging frontier in wound care, *Adv. Wound Care* 4 (5) (2015) 295–301, <https://doi.org/10.1089/wound.2014.0567>.
- [3] Y.H. Li, X. Tian, Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms, *Sensors* 12 (25) (2013) 2519–2538, <https://doi.org/10.3390/s120302519>.
- [4] I. Castillo-Juárez, T. Maeda, E.A. Mandujano-Tinoco, M. Tomas, B. Pérez-Eretza, S.J. García-Contreras, T.K. Wood, R. García-Contreras, Role of quorum sensing in bacterial infections, *World J. Clin. Cases* 7 (7) (2015) 575–598, <https://doi.org/10.12998/wjcc.v3.i7.575>.
- [5] J. Goswami, Quorum sensing by super bugs and their resistance to antibiotics, a short review, *Glob. J. Pharmaceut. Sci.* 3 (3) (2017) 555614.
- [6] N. Gohil, R. Ramírez-García, H. Panchasara, S. Pate, G. Bhattacharjee, V. Singh, Book review: quorum sensing vs. Quorum quenching: a battle with No end in sight, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8 (2018) 1–3, <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00106>.
- [7] R. García-Contreras, Is Quorum Sensing Interference a viable alternative to treat *Pseudomonas aeruginosa* infections? *Front. Microbiol.* 7 (2016) 1–7, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01454>.
- [8] S. Santhakumari, A.V. Ravi, Targeting quorum sensing mechanism: an alternative anti-virulent strategy for the treatment of bacterial infections, *South Afr. J. Bot.* 120 (2019) 81–86, <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.09.028>.
- [9] D.A. Rasko, V. Sperandio, Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease, *Nat. Rev. Drug Discov.* 9 (2) (2010) 117–128, <https://doi.org/10.1038/nrd3013>.
- [10] C. Lixa, A. Mujo, C.D. Anobom, A.S. Pi, A structural perspective on the mechanisms of quorum sensing activation in bacteria, *An Acad. Bras Ciências* 87 (4) (2015) 2189–2203, <https://doi.org/10.1590/0001-3765201520140482>.
- [11] S.T. Rutherford, B.L. Bassler, Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2 (11) (2012) a012427, <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012427>.
- [12] A. Deep, U. Chaudhary, V. Gupta, Quorum sensing and bacterial pathogenicity: from molecules to disease, *J. Lab. Phys.* 3 (1) (2011) 4–11, <https://doi.org/10.4103/0974-2727.78553>.
- [13] B. Rémy, S. Mion, L. Plener, M. Elias, E. Chabrière, D. Daudé, Interference in bacterial quorum sensing: a biopharmaceutical perspective, *Front. Pharmacol.* 9 (2018) 1–17, <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00203>.
- [14] L. Antonioli, C. Blandizzi, P. Pacher, M. Guillemin, G. Haskó, Rethinking communication in the immune system: the quorum sensing concept, *Trends Immunol.* 40 (2) (2019) 88–97, <https://doi.org/10.1016/j.it.2018.12.002>.
- [15] F. Nazzaro, F. Fratianni, L. Martirino, R. Coppola, V. Feo, Effect of essential oils on pathogenic bacteria, *Pharmaceuticals* 6 (12) (2013) 1451–1474, <https://doi.org/10.3390/ph6121451>.
- [16] K. Reuter, A. Steinbach, V. Helms, Interfering with bacterial quorum sensing, *Perspect. Med. Chem.* 18 (2016) 1–15, <https://doi.org/10.4137/PMC.s13209>.
- [17] M.B. Miller, B.L. Bassler, Quorum sensing in bacteria, *Annu. Rev. Microbiol.* 55 (2001) 165–199.
- [18] V.C. Kalia, Quorum sensing inhibitors: an overview, *Biotechnol. Adv.* 31 (2) (2013) 224–245, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.10.004>.
- [19] R.G. Abisado, S. Benomar, J.R. Klaus, A.A. Dandekar, J. Chandler, Bacterial quorum sensing and microbial community interactions, *mBio* 9 (3) (2018), <https://doi.org/10.1128/mBio.02331-17> e02331-17.
- [20] N.B. Turan, D.S. Chormey, Ç. Büyükpınar, G.E. Engin, S. Bakidere, Quorum sensing: little talks for an effective bacterial coordination, *Trends Anal. Chem.* 91 (2017) 1–11, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.03.007>.
- [21] J.T. Hodgkinson, J. Gross, Y.R. Baker, D.R. Springa, M. Welch, A new *Pseudomonas* quinolone signal (PQS) binding partner: MexG, *Chem. Sci.* 4 (2016) 2553–2562, <https://doi.org/10.1039/c5sc04197>.
- [22] K. Papenfort, B.L. Bassler, Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria, *Nat. Rev. Microbiol.* 14 (2016) 576–588, <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.89>.
- [23] J. Lee, J. Wu, Y. Deng, J. Wang, C. Wang, J. Wang, C. Chang, Y. Dong, P. Williams, L.H. Zhang, A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response, *Nat. Chem. Biol.* 9 (2013) 339–343, <https://doi.org/10.1038/nchembio.1225>.
- [24] A. Tomasz, Control of the competent state in *Pneumococcus* by a hormone-like cell product: an example for a new type of regulatory mechanism in bacteria, *Nature* 208 (1965) 155–159.
- [25] K.H. Nealson, T. Platt, J.W. Hastings, Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system, *J. Bacteriol.* 104 (1970) 313–322.
- [26] J. Engebrecht, M. Silverman, Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81 (1984) 4154–4158.
- [27] A. Eberhard, A.L. Burlingame, C. Eberhard, G.L. Kenyon, K.H. Nealson, N.J. Oppenheimer, Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase, *Biochemistry* 20 (1981) 2444–2449.
- [28] W.C. Fugua, S.C. Winans, E.P. Greenberg, Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators, *J. Bacteriol.* 176 (1994) 269–275.
- [29] S. Schauder, B.L. Bassler, The languages of bacteria, *Genes Dev.* 15 (2001) 1468–1480.
- [30] Y. Dou, F. Song, F. Guo, Z. Shou, C. Zhu, J. Xiang, J. Hian, *Acinetobacter baumannii* quorum-sensing signalling molecule induces the expression of drug-resistance genes, *Mol. Med. Rep.* 15 (2017) 4061–4068, <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6528>.
- [31] E. Rossi, A. Cimdins, P. Lühje, A. Brauner, A. Sjöling, P. Landini, U. Römling, "It's a gut feeling" – *Escherichia coli* biofilm formation in the gastrointestinal tract environment, *Crit. Rev. Microbiol.* 44 (1) (2017) 1–30, <https://doi.org/10.1080/1040841X.2017.1303660>.
- [32] M. Walters, V. Sperandio, Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella*, *Int. J. Med. Microbiol.* 296 (2006) 125–131, <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2006.01.041>.
- [33] J. Lee, L. Zhang, The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*, *Protein Cell* 6 (1) (2015) 26–41, <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0100-x>.
- [34] A. Bouayaha, N. Dakka, A. El-Touys, J. Abrini, Y. Bakri, Medicinal plant products targeting quorum sensing for combating bacterial infections, *Asian Pac. J. Trop. Med.* 10 (8) (2017) 729–743, <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.07.021>.
- [35] M.M. Moghaddam, S. Khodi, A. Mirhosseini, Quorum sensing in bacteria and a glance on *Pseudomonas aeruginosa*, *Clin. Microb.* 3 (4) (2014) 156, <https://doi.org/10.4172/2327-5073.1000156>.
- [36] I. Dogsa, A. Osilizo, P. Stefanie, I. Mandic-Mulec, Social interactions and biofilm formation in *Bacillus subtilis*, *Food Technol. Biotechnol.* 52 (2) (2014) 149–157.
- [37] J. Li, J. Chen, J.E. Vida, B.A. MacClane, The Agr-Like quorum-sensing system regulates sporulation and production of enterotoxin and beta2 Toxin by *Clostridium perfringens* type a non-food-borne human gastrointestinal disease strain F5603, *Infect. Immun.* 79 (6) (2011) 2451–2459, <https://doi.org/10.1128/IAI.00169-11>.
- [38] M.K. Yadav, J.E. Vidal, Y.Y. Go, S.H. Kim, S.-W. Chae, J.-J. Song, The LuxS/AI-2 Quorum-Sensing System of *Streptococcus pneumoniae* is required to cause disease, and to regulate virulence- and metabolism-related genes in a rat model of middle ear infection, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8 (2018) 138, <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00138>.
- [39] C. Willyard, The drug-resistant bacteria that pose the greatest health threats, *Nature* 543 (2017) 15, <https://doi.org/10.1038/nature.2017.21550>.
- [40] T. Defoirdt, Quorum-Sensing systems as targets for antivirulence therapy, *Trends Microbiol.* 26 (4) (2018) 313–328, <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.10.005>.
- [41] S. Castillo, N. Heredia, E. Arechiga-Carvajal, S. García, Citrus extracts as inhibitors of quorum sensing, biofilm formation and motility of *Campylobacter jejuni*, *Food Biotechnol.* 28 (2014) 106–122, <https://doi.org/10.1080/08905436.2014.895947>.
- [42] M. Kalia, V.K. Yadav, P.K. Singh, D. Shama, H. Pandey, S.S. Narvi, V. Agarwal, Effect of Cinnamon oil on quorum sensing-controlled virulence factors and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*, *PLoS One* 10 (2015) 1–18, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135495>.
- [43] A. Luís, A. Duarte, J. Gominho, F. Domingues, A.P. Duarte, Chemical composition, antioxidant, antibacterial and anti-quorum sensing activities of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus radiata* essential oils, *Ind. Crop. Prod.* 79 (2016) 274–282, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.10.055>.
- [44] A. Sharifi, A. Mohammadzadeh, T. Zahraei Salehi, P. Mahmoodi, Antibacterial, antibiofilm and anti-quorum sensing effects of *Thymus daenensis* and *Satureja hortensis* essential oils against *Staphylococcus aureus* isolates, *J. Appl. Microbiol.* 124 (2) (2018) 379–388, <https://doi.org/10.1111/jam.13639>.
- [45] S.W. Dickey, G.Y.C. Cheung, M. Otto, Different drugs for bad bugs: antivirulence strategies in the age of antibiotic resistance, *Nat. Rev. Drug Discov.* 16 (7) (2017) 457–471, <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.23>.
- [46] F. Nazzaro, F. Fratianni, R. Coppola, Quorum sensing and phytochemicals, *Int. J. Mol. Sci.* 14 (6) (2013) 12607–12619, <https://doi.org/10.3390/ijms140612607>.
- [47] R. Rehman, H.A. Hanif, Z. Mushtaq, A.M. Al-Sadi, Biosynthesis of essential oils in aromatic plants: a review, *Food Rev. Int.* 32 (2) (2016) 117–160, <https://doi.org/10.1080/87559129.2015.1057841>.
- [48] A.K. Dhakad, V.V. Pandey, S. Beg, J.M. Rawat, A. Singh, Biological, medicinal and toxicological significance of *Eucalyptus* leaf essential oil: a review, *J. Sci. Food Agric.* 98 (2018) 833–848, <https://doi.org/10.1002/jsfa.8600>.
- [49] G.B. Avançaço, F.D. Ferreira, N.S. Bonfim, P.A.S.R. dos Santos, R.M. Peralta, T. Brugnari, C.A. Mallmann, B.A. de Abreu Filho, J.M.G. Mikcha, M. Machinski, *Curcuma longa* L. essential oil composition, antioxidant effect, and effect on *Fusarium verticillioides* and fumonisin production, *Food Contr.* 73 (2016) 806–813, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.09.032>.
- [50] S. Scandoreiro, L.C. de Camargo, C.A. Lancheros, S.F. Yamada-Ogatta, C.V. Nakamura, A.G. de Oliveira, C.G. Andrade, N. Duran, G. Nakazato, R.K.T. Kobayashi, Synergistic and additive effect of oregano essential oil and biological silver nanoparticles against multidrug-resistant bacterial strains, *Front. Microbiol.* 7 (2016) 760, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00760>.
- [51] Y. Zhang, X. Liu, Y. Wang, P. Jiang, S. Quek, Antibacterial activity and mechanism of Cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, *Food Contr.* 59 (2016) 282–289, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.05.032>.
- [52] A. Zhang, W.H. Chu, Anti-quorum sensing activity of *Forsythia suspense* on *Chromobacterium violaceum* and *Pseudomonas aeruginosa*, *Phcog. Mag.* 13 (50) (2017) 321–325, <https://doi.org/10.4103/0973-1296.204547>.
- [53] W.T. Langeveld, E.J.A. Veldhuizen, A.S. Burt, Synergy between essential oil components and antibiotics: a review, *Crit. Rev. Microbiol.* 40 (1) (2014) 76–94, <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.763219>.
- [54] H.S. Vasavi, A.B. Arun, P.D. Rekha, Anti-quorum sensing activity of flavonoidrich fraction from *Centella asiatica* L. against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 49 (1) (2016) 8–15, <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2014.03.012>.
- [55] A.A. Abdullah, M.S. Butt, M. Shahid, Q. Huang, Evaluating the antimicrobial potential of green cardamom essential oil focusing on quorum sensing inhibition of *Chromobacterium violaceum*, *J. Food Sci. Technol.* 54 (8) (2017) 2306–2315, <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2668-7>.
- [56] A.C. Rodrigues, D.B. Oliveira, E.R. Silva, N.T.B. Sacramento, M.C. Bertoldi,

- U.M. Pinto, Anti-quorum sensing activity of phenolic extract from *Eugenia brasiliensis* (Brazilian cherry), *Food Sci. Technol.* 36 (2) (2016) 337–343, <https://doi.org/10.1590/1678-457x.0089>.
- [57] S. Doğan, B. Gökalsın, I. Şenkardeş, A. Doğan, A. Sesal, Anti-quorum sensing and anti-biofilm activities of *Hypericum perforatum* L. extracts against *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Ethnopharmacol.* 235 (2019) 293–300 <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.02.020>.
- [58] A. Bouyahya, J. Abrini, N. Dakka, Y. Bakri, Essential oils of *Origanum compactum* induce membrane permeability, disturb cell membrane, and suppress quorum-sensing phenotype in bacteria, *J. Pharm. Anal.* (2019), <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.03.001>.
- [59] M.V. Alvarez, L.A. Ortega-Ramirez, M.M. Gutierrez-Pacheco, A.T. Bernal-Mercado, I. Rodriguez-Garcia, G.A. Gonzalez-Aguilar, A. Ponce, R. Moreira Mdel, S.I. Roura, J.F. Ayala-Zavala, Oregano essential oil-pectin edible films as anti-quorum sensing and food antimicrobial agents, *Front. Microbiol.* 5 (2014) 699, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00699>.
- [60] R. Srinivasan, R. Mohankumar, A. Kannappan, V. Karthick Raja, G. Archunan, S. Karutha Pandian, K. Ruckmani, A. Veera Ravi, Exploring the anti-quorum sensing and antibiofilm efficacy of phytol against *Serratia marcescens* associated acute pyelonephritis infection in Wistar rats, *Front. Cell Infect. Microbiol.* 7 (2017) 498, <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00498>.
- [61] B.D. Oliveira, A.C. Rodrigues, B.M.I. Cardoso, A.L.C.C. Ramos, M.C. Bertoldi, J.G. Taylor, L.R. Cunha, U.M. Pinto, Antioxidant, antimicrobial and anti-quorum sensing activities of *Rubus rosaeifolius* phenolic extract, *Ind. Crop. Prod.* 84 (2016) 59–66, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.01.037>.

5.2 Artigo 2

ARTIGO ORIGINAL: Subinhibitory concentrations of biogenic silver nanoparticles affect motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*

Subinhibitory Concentrations of Biogenic Silver Nanoparticles Affect Motility and Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa*

Erika Kushikawa Saeki^{1*}, Amanda Yaeko Yamada¹, Larissa Amianti de Araujo¹, Laís Anversa², Doroti de Oliveira Garcia³, Renan Luiz Barros de Souza⁴, Heloisa Moreira Martins⁵, Renata Katsuko Takayama Kobayashi⁵ and Gerson Nakazato⁵

¹ Regional Laboratory of Presidente Prudente, Adolfo Lutz Institute, Presidente Prudente, Brazil, ² Regional Laboratory of Bauru, Adolfo Lutz Institute, Bauru, Brazil, ³ Regional Laboratory of Marília, Adolfo Lutz Institute, Marília, Brazil, ⁴ University of Western São Paulo, UNOESTE, Presidente Prudente, Brazil, ⁵ Laboratory of Basic and Applied Bacteriology, Department of Microbiology, Center of Biological Sciences, State University of Londrina, Londrina, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Mingkai Li,
Fourth Military Medical University,
China

Reviewed by:

Michelle B. Visser,
University at Buffalo, United States
Graciela Castro Escarpullí,
Instituto Politécnico Nacional de
México (IPN), Mexico

*Correspondence:

Erika Kushikawa Saeki
erikaksaeki@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Molecular Bacterial Pathogenesis,
a section of the journal
Frontiers in Cellular and
Infection Microbiology

Received: 21 January 2021

Accepted: 15 March 2021

Published: 01 April 2021

Citation:

Saeki EK, Yamada AY, de Araujo LA, Anversa L, Garcia DO, de Souza RLB, Martins HM, Kobayashi RKT and Nakazato G (2021) Subinhibitory Concentrations of Biogenic Silver Nanoparticles Affect Motility and Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11:656984. doi: 10.3389/fcimb.2021.656984

Biogenic silver nanoparticles (bio-AgNPs) are increasingly recognized as an antibiofilm and antivirulence strategy against *P. aeruginosa*, a bacterium that causes chronic infections in immunocompromised and cystic fibrosis patients. This study aimed to investigate the effects of subinhibitory concentrations of bio-AgNPs on motility and biofilm formation in *P. aeruginosa*. Bio-AgNPs were synthesized via reduction of ionic silver catalyzed by cell-free culture filtrate from *Fusarium oxysporum*. A total of 17 *P. aeruginosa* isolates and strains were evaluated for swarming, swimming, and twitching motility in the presence and absence (control) of bio-AgNPs, including 10 clinical isolates from patients with and without cystic fibrosis, 5 environmental isolates obtained from the public water supply system, and 2 reference strains (PAO1 and PA14). Isolates were identified by biochemical and molecular methods. Minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined by the broth microdilution method. Swarming, swimming, and twitching motility assays were performed in Petri dishes. Biofilm formation capacity was assessed quantitatively by the crystal violet method. MIC values ranged from 15.62 to 62.50 μM . The results showed that subinhibitory concentrations of bio-AgNPs ($\frac{1}{2}$ MIC, 7.81–31.25 μM) significantly increased ($p < 0.05$) swarming, swimming, and twitching motility in 40.0, 40.0, and 46.7% of isolates, respectively. Subinhibitory bio-AgNP treatment enhanced ($p < 0.05$) biofilm formation capacity in PA14 and a cystic fibrosis isolate (P11). It is concluded that subinhibitory concentrations of bio-AgNPs increased biofilm formation and swarming, swimming, and twitching motility in PA14 and some *P. aeruginosa* isolates. These virulence factors are directly involved with quorum-sensing systems. Further research should investigate the effects of AgNPs on *P. aeruginosa* quorum sensing to help elucidate their mechanism of action at subinhibitory concentrations.

Keywords: antibiofilm, antivirulence, virulence factor, metal nanoparticle, quorum sensing

INTRODUCTION

Silver nanoparticles (AgNPs) are one of the most widely studied nanomaterials (Guo et al., 2019; Kawish et al., 2020; Saeed et al., 2020) because of their chemical stability, malleability, flexibility, high electrical and thermal conductivity, catalytic activity, relatively low cost, and, mainly, potent antimicrobial action (Durán et al., 2019). These unique properties have led AgNPs to find application in the medical industry (wound dressing, surgical instrument, and bone prosthesis production), textile industry (garment production), food industry (food packaging, countertop, and cutting board materials), and wastewater treatment (McNamara and Tofail, 2017; Gadkari et al., 2018).

AgNPs were shown to have antimicrobial properties against several pathogenic microorganisms (Scandorieiro et al., 2016; Figueiredo et al., 2019), including *Pseudomonas aeruginosa* (Liao et al., 2019; D'Lima et al., 2020). This bacterium can be found in various environments, such as hospitals, natural resources, and water supply systems (Dobias and Bernier-Latmani, 2013; Anversa et al., 2019; Esmaeili et al., 2019). *P. aeruginosa* may express different virulence factors and is closely related to healthcare-related infections and diseases in immunocompromised, cystic fibrosis, and severely burned patients. Because of these factors and its multi-antimicrobial resistance, *P. aeruginosa* constitutes a public health problem (Matar, 2018; Ahmed et al., 2019).

Chronic *P. aeruginosa* infection is established mainly through biofilm formation. Motility plays an essential role in the initial adhesion of bacterial cells to biotic and abiotic surfaces (Khan et al., 2020). Biofilm formation contributes to the survival of *P. aeruginosa* under adverse environmental conditions, provides protection against the host's immune system, and confers antimicrobial resistance. This specific bacterial response is triggered by proximity to surfaces and involves complex chemical signaling networks, including quorum sensing (QS) (Khan et al., 2019; Olivares et al., 2020).

Biofilm development can be divided into four steps: (1) reversible adhesion of bacterial cells to a surface; (2) sessile growth and increased production, release, and detection of autoinducer molecules by QS systems; (3) biofilm maturation with the formation of mushroom-like structures enveloped by exopolysaccharides; and (4) disruption through the release of cells (Saxena et al., 2019). These important steps in *P. aeruginosa* biofilm formation depend on appendages such as flagella and type IV pili, both of which are necessary for bacterial motility (Otton et al., 2017).

P. aeruginosa is capable of three types of movement: swarming, swimming, and twitching. Swarming is performed on semi-solid surfaces (0.5 to 0.7% agar) via multicellular motion dependent on rotating helical flagella and typically involves type IV pili and a class of surfactants known as rhamnolipids (Köhler et al., 2000; Kearns, 2010). Swimming is another type of motility whereby bacteria swim on a low-viscous (0.3% agar) liquid surface using rotating flagella (Kearns, 2010; Sun et al., 2018). Twitching motility is mediated by type IV pili, occurring on solid surfaces or media with moderate viscosity (1% agar) by extension and retraction of pili (Kearns, 2010; Otton et al., 2017).

Due to the increase in multidrug resistance to antimicrobials, several studies have been carried out searching for new alternatives to interfere in the regulation of bacterial virulence and control the spread of multidrug-resistant bacteria (Shah et al., 2019; Ahmed et al., 2020; Piewngam et al., 2020). A major concern is that in these studies, subinhibitory concentrations of the compounds are used and we do not know for sure the bacterial response to these nanometals. The present study aimed to assess the effect of subinhibitory concentrations of biogenic AgNPs (bio-AgNPs) on the motility and biofilm formation capacity of *P. aeruginosa*.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Isolates and *P. aeruginosa* Identification

This study was conducted at the Laboratory of Food Bacteriology and Microbiology of Adolfo Lutz Institute, Presidente Prudente, São Paulo, Brazil. A total of 15 isolates of *P. aeruginosa* from different origins were analyzed. Environmental isolates (E, P1–P5, $n = 5$) were obtained from the public water supply system of São Paulo State, Brazil. Clinical isolates from patients without cystic fibrosis (non-FC, P6–P10, $n = 5$) were obtained from the Presidente Prudente Regional Hospital, São Paulo State, Brazil. Cystic fibrosis isolates (FC, P11–P15, $n = 5$) were obtained from the University of São Paulo Clinics Hospital, Brazil. Two *P. aeruginosa* reference strains were used, PAO1 and UCBPP-PA14 (hereafter referred to as PA14). Information on bacterial isolates is summarized in **Table 1**.

Isolates were seeded on Cetrimide agar (Acumedia, USA) and M-PA-C Agar (BBL, USA) and incubated at 37 and 42°C, respectively. Identification was achieved by analysis of colony morphology and biochemical characteristics (catalase, oxidase, and glucose fermentation tests). Stock cultures were maintained at –80°C in Luria-Bertani (LB) broth (Neogen, USA) containing 20% (v/v) glycerol (Synth, Brazil).

Molecular Confirmation of *P. aeruginosa* Isolates

All isolates biochemically identified as *P. aeruginosa* were confirmed by polymerase chain reaction (PCR) using a set of primers (forward, 5'-AATTCGGCAAATTTGCTGCG-3'; reverse, 5'-GGAGCTGTCGTACTCGAAGT-3') specific to the *oprL* gene (209 bp) (Wong et al., 2014).

Bacterial DNA was extracted by the thermal lysis method. PCR was performed in a final volume of 20 µL containing 6.4 µL of ultrapure water, 0.8 µL of each primer (10 µM), 10 µL of GoTaq[®] Colorless Master Mix (Promega), and 2 µL of DNA. Amplification consisted of initial denaturation at 95°C for 10 min, followed by 30 cycles of 95°C for 1 min, 52°C for 30 s, and 72°C for 1 min, and final extension at 72°C for 5 min on a Veriti thermal cycler (Applied Biosystems, IL, USA). The amplified products were subjected to electrophoresis in agarose gel (1.5%) stained with 0.1 µL/mL SYBR Safe (Invitrogen, USA)

TABLE 1 | *Pseudomonas aeruginosa* strains and bacterial isolates (Environmental, non-CF, and CF isolates), Minimum inhibitory concentration, and 1/2 MIC of bio-AgNP used in this study.

Reference strains or isolates	Type	Origin	bio-AgNP (μM)	
			MIC	1/2 MIC
PAO1	C	Wound patient	62.50	31.25
PA14	C	Burn patient	62.50	31.25
P1	E	Water from the public supply system	15.62	7.81
P2	E	Water from the public supply system	31.25	15.62
P3	E	Water from the public supply system	15.62	7.81
P4	E	Water from the public supply system	31.25	15.62
P5	E	Water from the public supply system	31.25	15.62
P6	non-CF	Tracheal secretion	31.25	15.62
P7	non-CF	Pleural fluid	31.25	15.62
P8	non-CF	Knee wound	31.25	15.62
P9	non-CF	Tracheal secretion	31.25	15.62
P10	non-CF	Sacral area	31.25	15.62
P11	CF	Sputum and oropharyngeal	15.62	7.81
P12	CF	Sputum and oropharyngeal	15.62	7.81
P13	CF	Sputum and oropharyngeal	15.62	7.81
P14	CF	Sputum and oropharyngeal	15.62	7.81
P15	CF	Sputum and oropharyngeal	15.62	7.81

C, clinical isolates.

E, environmental isolates.

Non-CF, clinical isolates obtained from non-cystic fibrosis patients.

CF, clinical isolates obtained from cystic fibrosis patients.

MIC, Minimum inhibitory concentration.

for 40 min at 100 V. Gels were visualized under ultraviolet light (296 nm) using a transilluminator (Syngene[®], DigiGenius, MD, USA), and images were captured and processed using EOS Utility[®] software (Canon, USA).

Preparation of Bio-AgNPs

Bio-AgNPs were synthesized according to a method previously described by Durán et al. (2005; 2006) (Patent, 2006, PI 0605681-4A2; <http://www.inpi.gov.br>). Bio-AgNPs were prepared by reduction of silver nitrate catalyzed by a cell-free enzyme preparation from *Fusarium oxysporum* (strain 551). The fungal inoculum was obtained from the culture collection of the Laboratory of Molecular Genetics, Luiz de Queiroz College of Agriculture (ESALQ), University of São Paulo, Piracicaba, São Paulo State, Brazil. First, *F. oxysporum* was grown for 7 days at 28°C on medium containing 0.5% (w/v) yeast extract (Neogen, USA), 2% (w/v) malt extract (Neogen, USA), 2% (w/v) agar (Acumedia, USA), and distilled water. Then, the fungal biomass (0.1 g/mL) was mixed with sterile distilled water and incubated at 28°C for 72 h under constant stirring (150 rpm). After filtration, the cell-free filtrate was mixed with 0.01 M silver nitrate (AgNO_3 , Nuclear, Brazil) and incubated for 15 days at 28°C in the dark. Bio-AgNPs were washed with distilled water, centrifuged at $27\,000 \times g$ and 4°C for 30 min, and incubated in an ultrasonic bath for 30 min. Washing steps were repeated three times. Quantification of Ag was performed on an EDX-7000 energy dispersive X-ray fluorescence spectrometer (Shimadzu, Japan). Particle diameter and zeta potential were determined by photon correlation spectroscopy using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, United Kingdom). Transmission electron microscopy was performed at the State University of Maringá, Paraná, Brazil.

Minimum Inhibitory Concentration (MIC) Determination

The MIC of bio-AgNPs for *P. aeruginosa* isolates was determined by the broth microdilution method in 96-well plates, as recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015). Bio-AgNPs were diluted in Mueller–Hinton broth (Difco, USA) to concentrations of 1000 to 7.81 μM . After incubation at 37°C for 24 h, MIC values were defined as the lowest concentration of bio-AgNPs capable of preventing visible microbial growth. Positive (*P. aeruginosa* incubated in the absence of bio-AgNPs) and negative (bio-AgNPs and broth only) controls were used.

Virulence Factor Analysis

Swarming Motility

P. aeruginosa isolates were grown in LB broth (Neogen, USA) for 24 h at 30°C. Then, swarming agar plates containing 1% glucose (Synth, Brazil), 0.5% peptone (Acumedia, USA), 0.2% yeast extract (Bacto, Difco, USA), and 0.5% agar (Acumedia, USA) were equilibrated to room temperature and inoculated at the center with 10 μL of a *P. aeruginosa* suspension containing 10^8 colony-forming units (CFU)/mL in the presence and absence (control) of subinhibitory concentrations ($\frac{1}{2}$ MIC) of bio-AgNPs. Plates were incubated without inversion for 24 h at 30°C (Norizan et al., 2013).

Swimming Motility

P. aeruginosa isolates were seeded on LB agar (Neogen, USA) and incubated at 37°C for 24 h. Then, one colony of each isolate was inoculated, in the presence and absence (control) of $\frac{1}{2}$ MIC bio-AgNPs, on the surface of swimming agar plates containing 1.0% tryptone (Acumedia, USA), 0.5% sodium chloride (Casa

Americana, Brazil), and 0.3% agar (Acumedia, USA), previously equilibrated to room temperature. Plates were incubated without inversion for 24 h at 30°C (Inoue et al., 2008).

Twitching Motility

P. aeruginosa isolates were seeded on LB agar (Neogen, USA) and incubated at 37°C for 24 h. Then, one colony of each isolate was inoculated, in the presence and absence (control) of ½ MIC bio-AgNPs, to the bottom of twitching agar plates containing 1.0% tryptone (Acumedia, USA), 0.5% yeast extract (Bacto, Difco, USA), 1.0% sodium chloride (Synth, Brazil), and 1.0% agar (Acumedia, USA). Plates were inverted and incubated at 37°C for 24 h. Subsequently, the agar was carefully removed, and the motility zone was measured to the nearest millimeter after staining with 2% crystal violet (Laborclin, Brazil) for 2 h (Otton et al., 2017). As a negative control, each isolate was inoculated in tryptone soy agar (Difco, USA) under the same conditions.

Biofilm Formation

Biofilm formation was analyzed on 96-well polystyrene microtiter plates by the modified crystal violet method described by Ramos-Vivas et al. (2019). *P. aeruginosa* isolates were grown on LB agar (Neogen, USA) at 37°C for 24 h. Then, 180 µL of LB broth (Neogen, USA) and 20 µL of *P. aeruginosa* suspension (initial concentration of 1.5×10^6 CFU/mL) were added to each well and incubated at 37°C for 24 h in the presence and absence (control) of ½ MIC bio-AgNPs. After incubation, the supernatants were discarded, and the wells were washed three times with phosphate-buffered saline (pH 7.2), fixed with 250 µL of methanol (Merck, Germany) for 10 min, and stained with a 1.0% crystal violet aqueous solution (Merck, Germany) for 15 min. Subsequently, the crystal violet was discarded and the wells washed three times with purified water. Adhered cells were resuspended in 250 µL of 33% (v/v) glacial acetic acid (Merck, Germany). Absorbance was read spectrophotometrically (Multiskan™ FC, Thermo Fisher Scientific, USA) at 620 nm.

Statistical Analysis

All experiments were conducted in triplicate on three separate occasions. Statistical analyses were performed using RStudio software version 1.2.5001. Graphical representations were constructed using GraphPad Prism version 8.4.2 (GraphPad Software Inc., USA).

RESULTS

P. aeruginosa Isolates

P. aeruginosa isolates were identified as oxidase-positive, catalase-positive, non-fermenter Gram-negative rods capable of growth on Cetrimide and M-PA-C agar. Isolates were confirmed to be *P. aeruginosa* by *oprL* gene detection (Figure 1).

Characterization of Bio-AgNPs

The X-ray fluorescence spectra of bio-AgNPs showed a plasmonic absorption band in the visible region (near 440 nm). Nanoparticles had a spherical shape and mean size of 73.04 nm, as demonstrated by transmission electron microscopy (Figure 2). The surface charge (zeta potential) of bio-AgNPs was -18.77 mV.

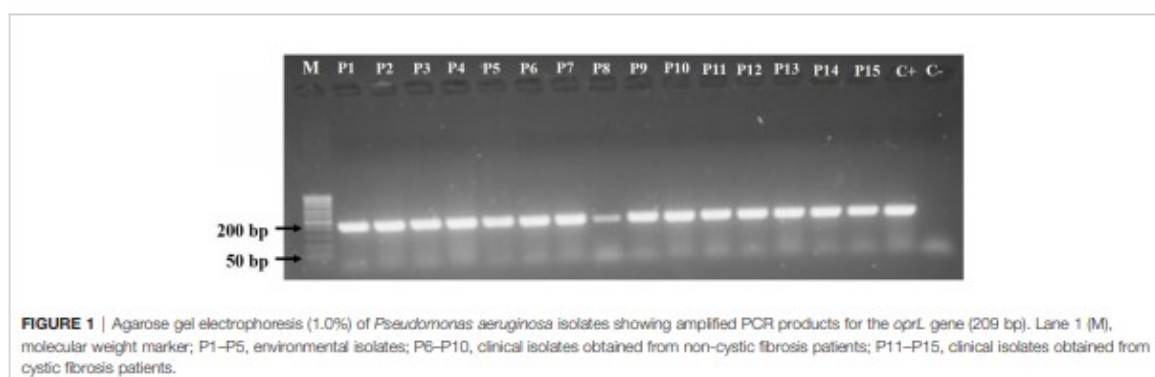
MIC of Bio-AgNPs

The MIC of bio-AgNPs for *P. aeruginosa* PAO1 and PA14 was 62.5 µM. MICs for environmental and clinical isolates are described in Table 1. Bio-AgNPs were used at ½ MIC (31.25, 15.62, or 7.81 µM) to test their action against *P. aeruginosa* motility and biofilm formation.

Effect of Bio-AgNPs on *P. aeruginosa* Motility

We tested the sub-MIC effects of bio-AgNPs on the three types of *P. aeruginosa* motility (swarming, swimming, and twitching), measured in diameter (mm). According to Table 2, bio-AgNPs exerted distinct effects on the motility of reference strains PAO1 and PA14. In PAO1, bio-AgNPs significantly reduced swarming ($p = 0.092$) and swimming ($p < 0.001$). In PA14, however, nanoparticles enhanced swarming ($p = 0.002$) and twitching ($p = 0.008$) motility.

Most *P. aeruginosa* isolates showed an increase in swarming motility after bio-AgNP treatment, except for P12, P14, and P15 (all obtained from CF). The swarming motility diameters of six isolates (40.0%) were significantly higher ($p < 0.050$) in the presence of bio-AgNPs (Table 2). A similar result was observed for swimming motility (Table 2). This parameter increased in all isolates with bio-AgNP treatment, except P7 and P14 (non-CF and CF, respectively). Swimming motility diameters were significantly



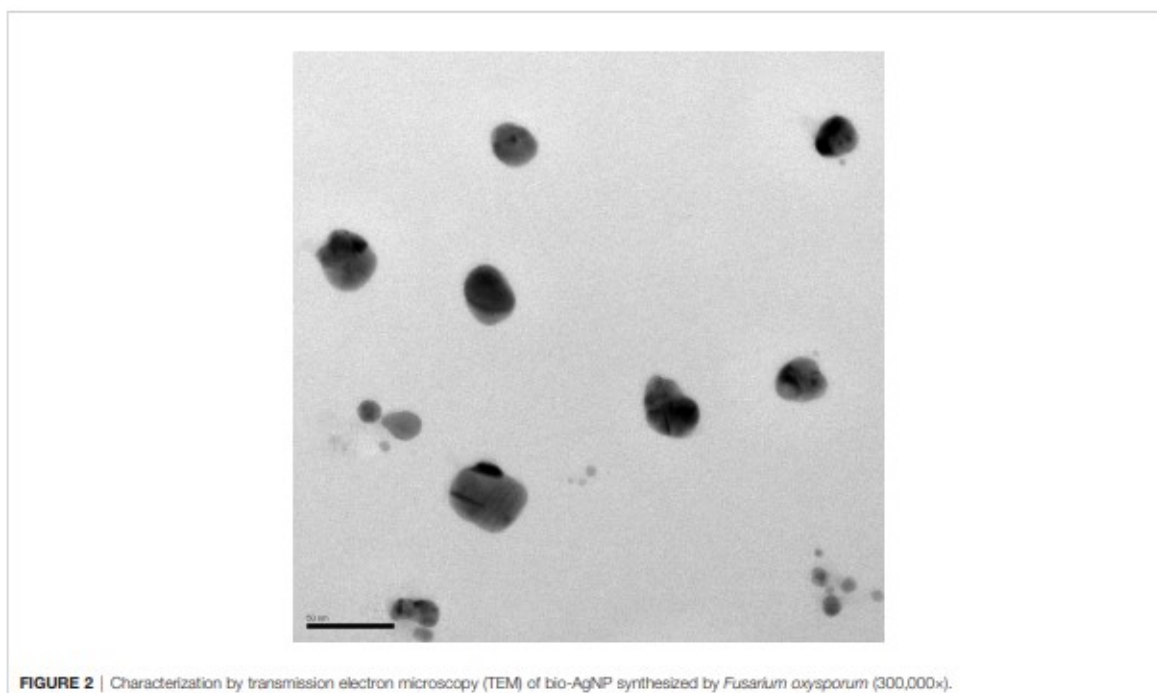


FIGURE 2 | Characterization by transmission electron microscopy (TEM) of bio-AgNP synthesized by *Fusarium oxysporum* (300,000x).

TABLE 2 | Swarming, swimming, and twitching motility in reference strains (PAO1 and PA14), environmental isolates, and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in the presence and absence of biogenic silver nanoparticles (bio-AgNPs) at 1/2 MIC.

Reference strains or isolates	Type	Swarming (mm)		Swimming (mm)		Twitching (mm)	
		Control	bio-AgNP	Control	bio-AgNP	Control	bio-AgNP
PAO1	C	58.9 ± 10.4	45.7 ± 19.1**	41.0 ± 2.5	29.3 ± 3.6***	11.6 ± 0.5	11.0 ± 0.8
PA14	C	13.9 ± 4.8	45.0 ± 20.8**	34.7 ± 4.0	36.1 ± 3.6	13.7 ± 1.7	19.1 ± 1.1**
P1	E	38.8 ± 16.1	47.3 ± 22.2	43.9 ± 2.5	46.3 ± 5.2	4.2 ± 2.1	4.4 ± 1.9
P2	E	19.0 ± 8.2	21.4 ± 5.4	38.7 ± 6.0	48.8 ± 10.6**	5.6 ± 1.0	5.2 ± 1.3
P3	E	10.1 ± 0.6	15.6 ± 4.8**	41.2 ± 3.4	46.3 ± 10.6	5.0 ± 1.6	5.2 ± 1.3
P4	E	17.0 ± 5.2	25.6 ± 14.9	34.1 ± 7.3	34.8 ± 9.8	5.0 ± 1.1	6.3 ± 1.1**
P5	E	39.1 ± 20.4	44.2 ± 25.0	41.1 ± 3.6	49.7 ± 13.9	4.9 ± 0.9	5.3 ± 1.0**
P6	non-CF	10.9 ± 0.8	32.1 ± 29.2**	41.6 ± 7.6	43.3 ± 11.1	9.1 ± 1.9	12.1 ± 5.6*
P7	non-CF	8.7 ± 0.7	13.2 ± 1.2**	49.6 ± 5.0	46.2 ± 8.9	3.5 ± 0.9	5.0 ± 1.3*
P8	non-CF	13.3 ± 2.4	17.8 ± 4.2**	33.8 ± 3.6	44.3 ± 4.0***	5.1 ± 0.3	6.3 ± 3.3*
P9	non-CF	14.0 ± 1.5	28.6 ± 8.2**	41.2 ± 3.2	53.4 ± 10.6*	7.1 ± 3.3	8.1 ± 4.9
P10	non-CF	16.4 ± 6.4	47.8 ± 8.7***	25.2 ± 7.3	36.2 ± 6.0**	2.8 ± 1.3	3.9 ± 0.9
P11	CF	16.4 ± 6.9	20.6 ± 6.1	42.2 ± 2.5	48.6 ± 9.2*	7.1 ± 0.8	6.2 ± 1.7
P12	CF	32.7 ± 21.6	25.8 ± 13.2	42.6 ± 5.4	48.9 ± 8.1*	5.6 ± 1.1	5.3 ± 1.6
P13	CF	68.3 ± 15.5	73.0 ± 13.3	38.4 ± 5.1	43.0 ± 10.7	4.0 ± 0.6	3.6 ± 1.9
P14	CF	53.6 ± 30.0	52.9 ± 30.5	40.3 ± 8.7	39.3 ± 15.4	4.1 ± 0.7	4.8 ± 0.6**
P15	CF	43.9 ± 30.6	41.2 ± 27.8	45.8 ± 6.5	46.9 ± 9.1	4.1 ± 0.9	4.4 ± 1.2**

The results were obtained by the mean ± standard deviation of three independent experiments.

* $P < 0.05$, ** < 0.01 , and *** < 0.001 , comparing the control bacteria (without treatment) with the treated (bio-AgNP).

Bio-AgNP, silver nanoparticles.

C, clinical isolates.

E, environmental isolates.

Non-CF, clinical isolates obtained from non-cystic fibrosis patients.

CF, clinical isolates obtained from cystic fibrosis patients.

higher ($p < 0.050$) in the presence of bio-AgNPs in six isolates (40.0%). Twitching motility diameters increased ($p < 0.050$) with bio-AgNP treatment in seven isolates (46.7%).

As shown in **Figure 3A**, the swarming motility zone of P2 in the absence of bio-AgNPs was 19.0 ± 8.2 mm, which increased to 21.4 ± 5.4 mm after bio-AgNPs were added to the culture medium. Among the tested isolates, the increase in swarming motility ranged from 6.9 to 194.5%.

The swimming motility zone of P2 was 38.7 ± 6.0 mm without bio-AgNP treatment and 48.8 ± 10.6 mm with treatment (**Figure 3C**). Bio-AgNPs increased swimming motility in *P. aeruginosa* isolates by 2.4 to 43.7%.

P6 showed a twitching motility of 9.1 ± 1.9 mm in the absence of bio-AgNPs and 12.1 ± 5.6 mm in the presence of bio-AgNPs (**Figure 3E**). Bio-AgNP treatment increased twitching motility in *P. aeruginosa* isolates by 4.0 to 42.9%. The mean swarming, swimming, and twitching diameters of *P. aeruginosa* isolates are detailed in **Figures 3B, D, F**, respectively.

Effect of Bio-AgNPs on *P. aeruginosa* Biofilm Formation

Bio-AgNP treatment promoted biofilm formation in most *P. aeruginosa* isolates (73.3%), except P5, P9 (non-FC), P12, P13 (FC isolates) (**Figure 4**). Similar effects were exerted on

PAO1 and PA14. However, a significant increase in biofilm formation was only observed in the PA14 reference strain ($p = 0.040$) and the P11 isolate ($p = 0.034$), obtained from a patient with cystic fibrosis (**Figure 4**).

DISCUSSION

The antibacterial activity of bio-AgNPs against *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, and *Salmonella* Enteritidis at inhibitory concentrations was previously described by Scandoriceiro et al. (2016) and Figueiredo et al. (2019). Few studies, however, have investigated the subinhibitory effects of AgNPs on clinical isolates or environmental microorganisms (Yang and Alvarez, 2015; Garuglieri et al., 2016; Grün et al., 2018).

Motility is fundamental for bacterial colonization of certain surfaces; it allows microorganisms to move toward more favorable environments and away from unfavorable conditions. Motility is also important for pathogenicity, as it is involved in host cell adhesion, colonization, biofilm formation, and survivability (Sun et al., 2018).

In the present study, the PAO1 reference strain showed a significant reduction in swarming and swimming motility with

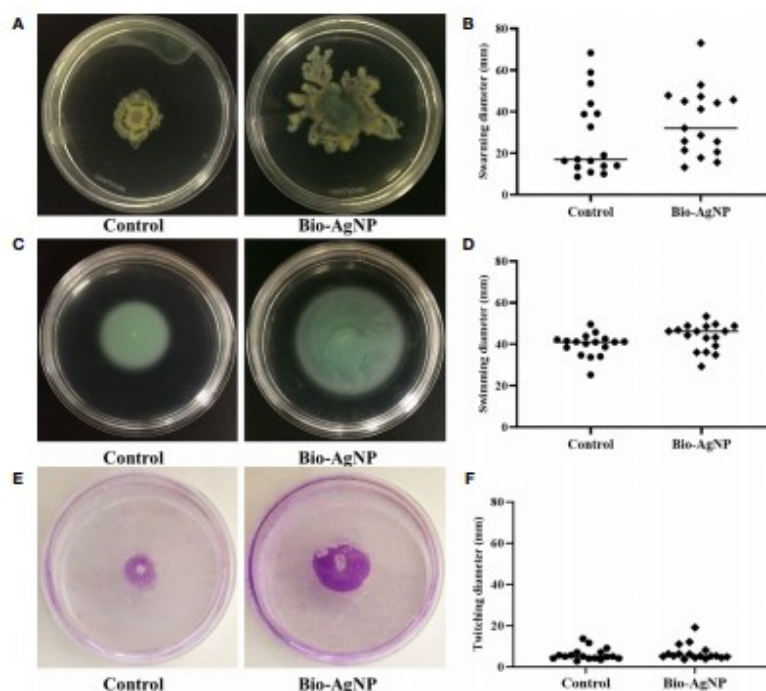


FIGURE 3 | *Pseudomonas aeruginosa* motility in the absence (control) and presence of biogenic silver nanoparticles (bio-AgNPs). **(A)** Swarming motility of P2 isolate, **(B)** mean swarming motility, **(C)** swimming motility of P2 isolate, **(D)** mean swimming motility, **(E)** twitching motility of P6 isolate, and **(F)** mean twitching motility.

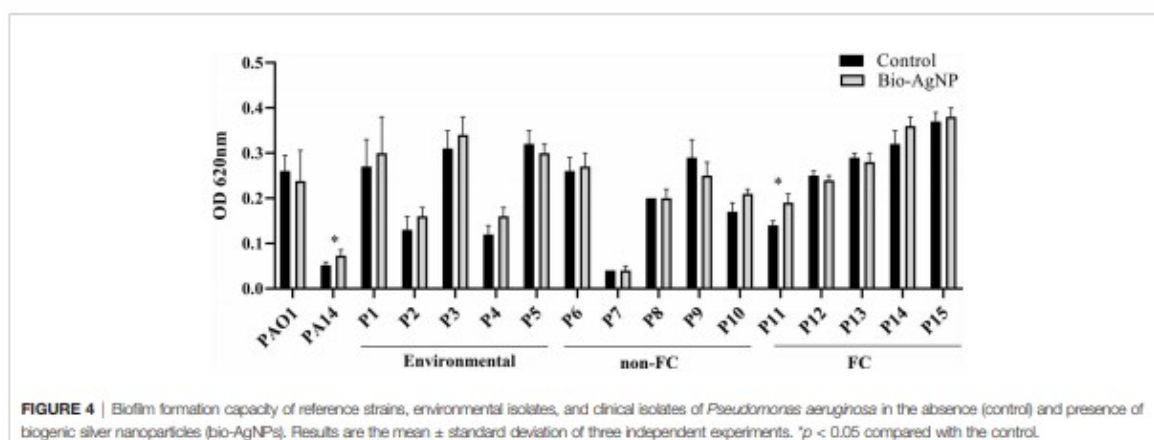


FIGURE 4 | Biofilm formation capacity of reference strains, environmental isolates, and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in the absence (control) and presence of biogenic silver nanoparticles (bio-AgNPs). Results are the mean \pm standard deviation of three independent experiments. * $p < 0.05$ compared with the control.

bio-AgNP treatment. In contrast, PA14 showed a significant increase in swarming and twitching motility. These reference strains differ in origin and genomic characteristics. *P. aeruginosa* PAO1, isolated from a wound, is a moderately virulent strain belonging to a relatively rare clonal group. PA14 is highly virulent in several infection models and is part of the most common clonal group worldwide. Among other factors, differences between strains may be due to the presence of two pathogenicity islands (PAPI-1 and PAPI-2) in PA14 but not in PAO1 (Harrison et al., 2010; Mikkelsen et al., 2011). PAPI-1 encodes several virulence-associated factors, including type IVB pili (*pilS2* gene) (Bahramian et al., 2019) and PvrR, a response regulator involved in the synthesis of bacterial biofilms (Gula et al., 2019). PAPI-2 encodes ExoU cytotoxin, a potent phospholipase (Harrison et al., 2010). Researchers have shown that exclusion of one or both pathogenicity islands affects the virulence of PA14 in murine models of acute pneumonia and bacteremia (Harrison et al., 2010). According to Mikkelsen et al. (2011), even though PA14 has pathogenicity islands that are not found in PAO1, the presence or absence of specific gene clusters is not predictive of virulence. The referred study found that PA14 has an acquired mutation in the *ladS* gene that has a deleterious impact on biofilm formation but promotes the activity of type III secretion systems and cytotoxicity in mammalian cells. This could explain why PA14 had a lower biofilm-forming capacity than PAO1 in the present study.

Our results showed that about 40% of isolates increased swarming, swimming, and twitching activity after treatment with bio-AgNPs at sub-MIC. Villa et al. (2012) demonstrated that sublethal concentrations of oxidizing biocides increase swarming and swimming motility in the soil bacterium *Azotobacter vinelandii*, representing a strategy to mitigate adverse conditions. Ortega-Calvo et al. (2011) also presented evidence that AgNPs induce a repellent response in *Pseudomonas putida*. The mechanism that causes repellence remains unknown but it is believed to involve physiological changes caused by accumulation of AgNPs in the cell membrane and/or within cells, modifying microbial performance. The size of AgNPs also seems to influence repellence. Another study revealed that subinhibitory concentrations of AgNPs stimulated

swarming and swimming in *E. coli* and *Bacillus subtilis* under aerobic and anaerobic conditions (Garuglieri et al., 2016).

Singh et al. (2019) investigated the effects of AgNPs and silver ions on *P. aeruginosa* PAO1. Treatment with 3.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AgNP increased the expression of motility-related genes, such as *bswR* (swarming motility regulator) and *pilG* (twitching motility protein), and the activation of flagellum-related genes (*flgC*, *fliG*, *fliH*, and *fliP*).

In this study, after 24 h of incubation with $\frac{1}{2}$ MIC bio-AgNPs, there was an increase in biofilm production in the reference strain PA14 and isolate P11. Such an increase can be explained by one of the mechanisms of action of AgNPs in bacterial cells: formation of reactive oxygen species (ROS), which cause oxidative stress (Wang et al., 2017). The high ROS concentrations occurring under oxidative stress may lead to adverse modifications in cellular components and damage to proteins, DNA, and lipids (Su et al., 2019). Villa et al. (2012) reported that oxidative stress in *A. vinelandii* increased with oxidizing biocide treatment. It is probable that high oxidative stress exerted selective pressure at the initial stage of biofilm development, enhancing biofilm formation capacity.

Pseudomonas biofilms are composed of at least three types of polysaccharides: Psl, Pel, and alginate. Research has shown that *pslA* expression decreased in the presence of AgNPs and that expression of *pslD* (a gene encoding an outer membrane protein) decreased in the presence of silver ions. On the other hand, AgNPs and silver ions increased the expression of genes associated with glycosyltransferases, *pslC*, *pslL*, and *pslE* (Wzz/Wzc-like protein) (Singh et al., 2019).

Guo et al. (2019) observed that subinhibitory doses of AgNPs enhanced polysaccharide and protein production in *P. aeruginosa* CCM 3955 compared with the control, significantly altering biofilm structure. The major form of protection of bacteria against low AgNP concentrations was to increase exopolysaccharide secretion.

According to Yang and Alvarez (2015), exposure of *P. aeruginosa* PAO1 to sublethal AgNP concentrations improved biofilm development and increased expression of genes related to QS (*lasI* and *lasR*). *P. aeruginosa* has three known QS systems:

las, rhl, and PQS (Lee and Zhang, 2015; Cornelis, 2020). QS systems allow communication between microorganisms through the production and diffusion of chemical or signaling molecules that control a variety of physiological functions, such as biofilm formation and motility activity (Saeki et al., 2020). Rasamiravaka et al. (2015) reported that the three QS systems of *P. aeruginosa* play important roles in biofilm formation and development.

Contrasting results were obtained by Hussain et al. (2019) when testing the effects of AgNPs (10–50 nm) on different microorganisms, including *P. aeruginosa* PAO1. At subinhibitory concentrations (1/16, 1/8, 1/4, and 1/2 MIC), there was a 42–81% reduction in swarming motility and a 22–79% reduction in biofilm formation. Another study showed that subinhibitory concentrations of gold nanoparticles (mean size of 53 nm) significantly reduced ($p < 0.01$) swarming, swimming, twitching, and biofilm formation (Khan et al., 2019). These differences may be related to nanoparticle size. Liao et al. (2019) showed that larger nanoparticles have lower antibacterial activity than smaller nanoparticles. The bio-AgNPs prepared in this study had a mean size of 75 nm. Other studies have shown that size may not be a determinant of virulence factor regulation. Garuglieri et al. (2016) showed that treatment with AgNPs sized 14 ± 0.3 nm increased motility and Grün et al. (2018) found that treatment with 30–70 nm AgNPs enhanced biofilm formation.

Currently, there are several commercial AgNP products widely used in the medical and food industries and water treatment plants (McNamara and Tofail, 2017; Gadkari et al., 2018; Jaiswal et al., 2019). This wide use implies that metal compounds are constantly released into the aquatic environment through sewage and wastewater disposal (Das et al., 2012; Singh et al., 2019). The release of AgNPs, even at subinhibitory concentrations, is a cause of environmental concern (Yang and Alvarez, 2015; Grün et al., 2018).

Overall, it can be inferred that the increase in phenotypic expression of biofilm and bacterial motility after exposure to bio-AgNPs may be associated with chemical signaling, as these virulence factors are regulated by the QS system. Therefore, further research is needed on the action of AgNPs in the QS system of *P. aeruginosa* for a better understanding of their effects at subinhibitory concentrations. Moreover, it is necessary to

explore other forms of AgNP use with the aim of reducing antimicrobial resistance as well as environmental impacts.

Upon exposure to subinhibitory concentrations of bio-AgNPs, the PA14 reference strain and some *P. aeruginosa* isolates showed increased swarming, swimming, and twitching motility and biofilm formation. Unfortunately, some studies have also described that low doses of nanoparticles can significantly induce biofilm formation and virulence factors *in vitro*. This increase in bacterial exposure to nanoparticles is a cause for concern, given all the adverse effects that have not been fully clarified. Therefore, the use of subinhibitory concentrations bio-AgNPs especially in therapeutic applications must be performed with precaution.

These results are an initial contribution to broaden our understanding of the effects of subinhibitory concentrations of bio-AgNPs on bacterial behavior, an important but little-studied phenomenon. However, it is still necessary to elucidate the regulation of virulence factors in bio-AgNP-treated bacteria. Further research on the interference mechanisms of subinhibitory concentrations of bio-AgNPs in *P. aeruginosa* QS systems is recommended.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

EKS designed the study, interpreted the clinical data, and wrote the paper. AYY and LAA analyzed the virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa*. LA performed the genomics experiments. DOG and RLBS discussed the results and implications and wrote the manuscript. RKTK and GN interpreted the clinical data. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

REFERENCES

- Ahmed, S. A. K. S., Rudden, M., Smyth, T. J., Dooley, J. S. G., Marchant, R., and Banat, I. M. (2019). Natural quorum sensing inhibitors effectively downregulate gene expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103 (8), 3521–3535. doi: 10.1007/s00253-019-09618-0
- Ahmed, T., Pattnaik, S., Khan, M. B., Ampasala, D. R., Busi, S., and Sarma, V. V. (2020). Inhibition of quorum sensing-associated virulence factors and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by *Mycocleptodiscus indicus* PUTY1. *Braz. J. Microbiol.* 51 (2), 467–487. doi: 10.1007/s42770-020-00235-y
- Anversa, L., Stancari, R. C. A., Garbelotti, M., Ruiz, L. S., Pereira, V. B. R., Nascentes, G. A. N., et al. (2019). *Pseudomonas aeruginosa* in public water supply. *Water Pract. Technol.* 14 (3), 732–737. doi: 10.2166/wpt.2019.057
- Bahramian, A., Khoshnood, S., Shariati, A., Doustdar, F., Chirani, A. S., and Heidary, M. (2019). Molecular characterization of the *pilS2* gene and its association with the frequency of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pKLC102 and PAPI-1 pathogenicity island. *Infect. Drug Resist.* 12, 221–227. doi: 10.2147/IDR.S188527
- CLSI (2015). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Approved Standard—Tenth Edition. CLSI document M07-A10. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Cornelis, P. (2020). Putting an end to the *Pseudomonas aeruginosa* IQS controversy. *Microbiologyopen* 9 (2), e962. doi: 10.1002/mbo3.962
- Das, P., Williams, C. J., Fulthorpe, R. R., Hoque, M. E., Metcalfe, C. D., and Xenopoulos, M. A. (2012). Changes in Bacterial Community Structure after Exposure to Silver Nanoparticles in Natural Waters. *Environ. Sci. Technol.* 46 (16), 9120–9128. doi: 10.1021/es3019918
- Dobias, J., and Bernier-Latmani, R. (2013). Silver release from silver nanoparticles in natural waters. *Environ. Sci. Technol.* 47 (9), 4140–4146. doi: 10.1021/es304023p
- D’Lima, L., Phadke, M., and Ashok, A. D. (2020). Biogenic silver and silver oxide hybrid nanoparticles: a potential antimicrobial against multi drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *New J. Chem.* 12 (44), 4935–4941. doi: 10.1039/c9nj04216d
- Durán, N., Marcato, P. D., Alves, O. L., Souza, G. I. H., and Esposito, E. (2005). Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. *J. Nanobiotechnol.* 3 (8), 1–7. doi: 10.1186/1477-3155-3-8

- Durán, N., Alves, O. L., Esposito, E., de Souza, G. I., and Marcato, P. D. (2006). *Processo de produção de nanopartículas de prata estabilizadas por proteínas na produção de produtos têxteis antibacterianos e o tratamento dos efluentes produzidos* (Campinas: BR. Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI). Braz. patent PI 0605681-4 A.
- Durán, N., Rolim, W. R., Durán, M., Fávoro, W. J., and Seabra, A. B. (2019). Nanotoxicologia de nanopartículas de prata: toxicidade em animais e humanos. *Quim. Nova* 42 (2), 206–213. doi: 10.21577/0100-4042.20170318
- Esmaili, D., Daymad, S. F., Neshani, A., Rashki, S., Marzhooseyni, Z., and Khaledi, A. (2019). Alerting prevalence of MBLs producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Gene Rep.* 16:100460. doi: 10.1016/j.genrep.2019.100460
- Figueiredo, E. P., Ribeiro, J. M., Nishio, E. K., Scandorieiro, S., Costa, A. F., Cardozo, V. F., et al. (2019). New Approach For Simvastatin As An Antibacterial: Synergistic Effect With Bio-Synthesized Silver Nanoparticles Against Multidrug-Resistant Bacteria. *Int. J. Nanomed.* 14, 7975–7985. doi: 10.2147/IJN.S211756
- Gadkari, R. R., Ali, S. W., Alagirusamy, R., and Das, A. (2018). "Silver Nanoparticles in Water Purification: Opportunities and Challenges," in *Modern Age Environmental Problems and their Remediation*. Eds. M. Oves, M. Zain Khan and I. M.I. Ismail (Cham: Springer). doi: 10.1007/978-3-319-64501-8_13
- Garuglieri, E., Cattò, C., Villa, F., Zanchi, R., and Cappitelli, F. (2016). Effects of sublethal concentrations of silver nanoparticles on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* under aerobic and anaerobic conditions. *Biointerphases* 11 (4), 04B308. doi: 10.1116/1.4972100
- Grün, A. Y., App, C. B., Breidenbach, A., Meier, J., Metreveli, G., Schaumann, G. E., et al. (2018). Effects of low dose silver nanoparticle treatment on the structure and community composition of bacterial freshwater biofilms. *PLoS One* 13 (6), p.e0199132. doi: 10.1371/journal.pone.0199132
- Gula, G., Dorotkiewicz-Jach, A., Korzekwa, K., Valvano, M. A., and Drulis-Kawa, Z. (2019). Complex Signaling Networks Controlling Dynamic Molecular Changes in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm. *Curr. Med. Chem.* 26 (11), 1979–1993. doi: 10.2174/0929867325666180912110151
- Guo, J., Qin, S., Wei, Y., Liu, S., Peng, H., Li, Q., et al. (2019). Silver nanoparticles exert concentration-dependent influences on biofilm development and architecture. *Cell Prolif.* 52 (4), p.e12616. doi: 10.1111/cpr.12616
- Harrison, E. M., Carter, M. E., Luck, S., Ou, H., He, X., Deng, Z., et al. (2010). Pathogenicity islands PAPI-1 and PAPI-2 contribute individually and synergistically to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14. *Infect. Imm.* 78 (4), 1437–1446. doi: 10.1128/JAI.00621-09
- Hussain, A., Alajimi, M. F., Khan, M. A., Pervez, S. A., Ahmed, F., Amir, S., et al. (2019). Biosynthesized Silver Nanoparticle (AgNP) From *Pandanus odorifer* Leaf Extract Exhibits Anti-metastasis and Anti-biofilm Potentials. *Front. Microbiol.* 10 (8), doi: 10.3389/fmicb.2019.00008
- Inoue, T., Shingaki, R., and Fukui, K. (2008). Inhibition of swarming motility of *Pseudomonas aeruginosa* by branched-chain fatty acids. *FEMS Microbiol. Lett.* 281 (1), 81–86. doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01089.x
- Jaiswal, L., Shankar, S., and Rhim, J.-W. (2019). "Chapter 3 - Applications of nanotechnology in food microbiology," In: V. Gurtler, A. S. Ball and S. Soni (eds) *Methods in Microbiology*. Australia: Academic Press. doi: 10.1016/b.s.mim.2019.03.002
- Kawish, M., Ullah, F., Ali, H. S., Saifullah, S., Ali, L., ur Rehman, J., et al. (2020). "Chapter 10 - Bactericidal potentials of silver nanoparticles: novel aspects against multidrug resistance bacteria," In: Shah M. R., Imran M. and Ullah S. (eds) *Micro and Nano Technologies, Metal Nanoparticles for Drug Delivery and Diagnostic Applications*. Pakistan: Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-816960-5.00010-0
- Kearns, D. B. (2010). A field guide to bacterial swarming motility. *Nat. Rev. Microbiol.* 8 (9), 634–644. doi: 10.1038/nrmicro2405
- Khan, F., Manivasagan, P., Lee, J. W., Pham, D. T. N., Oh, J., and Kim, Y. M. (2019). Pseudoan-Stabilized Gold Nanoparticle-Mediated Biofilm Inhibition, Attenuation of Virulence and Motility Properties in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Mar. Drugs* 17 (4), 208. doi: 10.3390/md17040208
- Khan, F., Pham, D. T. N., Oloketuyi, S. F., and Kim, Y. M. (2020). Regulation and controlling the motility properties of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104 (1), 33–49. doi: 10.1007/s00253-019-10201-w
- Köhler, T., Curty, L. K., Barja, F., van Delden, C., and Pechère, J. C. (2000). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J. Bacteriol.* 182 (21), 5990–5996. doi: 10.1128/jb.182.21.5990-5996.2000
- Lee, J., and Zhang, L. (2015). The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell* 6 (1), 26–41. doi: 10.1007/s13238-014-0100-x
- Liao, S., Zhang, Y., Pan, X., Zhu, F., Jiang, C., Liu, Q., et al. (2019). Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Nanomed.* 14, 1469–1487. doi: 10.2147/IJN.S191340
- Matar, G. M. (2018). Editorial: *Pseudomonas* and *Acinetobacter*: From drug resistance to pathogenesis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 68 (8), 1–3. doi: 10.3389/fcimb.2018.00068
- McNamara, K., and Tofail, S. A. M. (2017). Nanoparticles in biomedical applications. *Adv. Phys.* 2 (1), 54–88. doi: 10.1080/23746149.2016.1254570
- Mikkelsen, H., McMullan, R., and Filloux, A. (2011). The *Pseudomonas aeruginosa* reference strain PA14 displays increased virulence due to a mutation in ladS. *PLoS One* 6 (12), p.e29113. doi: 10.1371/journal.pone.0029113
- Norizan, S. N., Yin, W. F., and Chan, K. G. (2013). Caffeine as a potential quorum sensing inhibitor. *Sensors* 13 (4), 5117–5129. doi: 10.3390/s130405117
- Oliveira, E., Badel-Berchoux, S., Provot, C., Prévost, G., Bernardi, T., and Jehl, F. (2020). Clinical Impact of Antibiotics for the Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Infections. *Front. Microbiol.* 9, 2894 (10):2894. doi: 10.3389/fmicb.2019.02894
- Ortega-Calvo, J. J., Molina, R., Jimenez-Sanchez, C., Dobson, P. J., and Thompson, I. P. (2011). Bacterial tactic response to silver nanoparticles. *Environ. Microbiol. Rep.* 3 (5), 526–534. doi: 10.1111/j.1758-2229.2011.00252.x
- Otton, L. M., Campos, M. S., Meneghetti, K. L., and Corção, G. (2017). Influence of twitching and swarming motilities on biofilm formation in *Pseudomonas* strains. *Arch. Microbiol.* 199 (5), 677–682. doi: 10.1007/s00203-017-1344-7
- Piewngam, P., Chiou, J., Chatterjee, P., and Otto, M. (2020). Alternative approaches to treat bacterial infections: targeting quorum-sensing. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 18 (6), 499–510. doi: 10.1080/14787210.2020.1750951
- Ramos-Vivas, J., Chapartegui-González, I., Fernández-Martínez, M., González-Rico, C., Fortún, J., Escudero, R., et al. (2019). Biofilm formation by multidrug resistant Enterobacteriaceae strains isolated from solid organ transplant recipients. *Sci. Rep.* 9 (1), 8928. doi: 10.1038/s41598-019-45060-y
- Rasamiravaka, T., Labtani, Q., Duez, P., and El Jaziri, M. (2015). The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: a review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. *BioMed. Res. Int.* 2015 (759348), 1–17. doi: 10.1155/2015/759348
- Saeed, S., Iqbal, A., and Ashraf, M. A. (2020). Bacterial-mediated synthesis of silver nanoparticles and their significant effect against pathogens. *Environ. Sci. Pollut. R.* 27, 37347–37356. doi: 10.1007/s11356-020-07610-0
- Saeki, E. K., Kobayashi, R. K. T., and Nakazato, G. (2020). Quorum sensing system: Target to control the spread of bacterial infections. *Microb. Pathog.* 142:104068. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104068
- Saxena, P., Joshi, Y., Rawat, K., and Bisht, R. (2019). Biofilms: Architecture, Resistance, Quorum Sensing and Control Mechanisms. *Indian J. Microbiol.* 59, 3–12. doi: 10.1007/s12088-018-0757-6
- Scandorieiro, S., de Camargo, L. C., Lancheros, C. A., Yamada-Ogata, S. F., Nakamura, C. V., Oliveira, A. G., et al. (2016). Synergistic and Additive Effect of Oregano Essential Oil and Biological Silver Nanoparticles against Multidrug-Resistant Bacterial Strains. *Front. Microbiol.* 7, 760. doi: 10.3389/fmicb.2016.00760
- Shah, S., Gaikwad, S., Nagar, S., Kulshrestha, S., Vaidya, V., Nawani, N., et al. (2019). Biofilm inhibition and anti-quorum sensing activity of phytosynthesized silver nanoparticles against the nosocomial pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Biofouling* 35 (1), 34–49. doi: 10.1080/08927014.2018.1563686
- Singh, N., Paknikar, K. M., and Rajwade, J. (2019). RNA-sequencing reveals multitude effects of silver nanoparticles on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environ. Sci.: Nano* 6 (6), 1812–1828. doi: 10.1039/C8EN01286E
- Su, L., Zhang, J., Gomez, H., Murugan, R., Hong, X., Xu, D., et al. (2019). Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2019:5080843. doi: 10.1155/2019/5080843
- Sun, E., Liu, S., and Hancock, R. E. W. (2018). Surfing Motility: a Conserved yet Diverse Adaptation among Motile Bacteria. *J. Bacteriol.* 200 (23), p.e00394-18. doi: 10.1128/JB.00394-18

- Villa, F., Remelli, W., Forlani, F., Gambino, M., Landini, P., and Cappitelli, F. (2012). Effects of chronic sub-lethal oxidative stress on biofilm formation by *Azotobacter vinelandii*. *Biofouling* 28 (8), 823–833. doi: 10.1080/08927014.2012.715285
- Wang, L., Hu, C., and Shao, L. (2017). The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *Int. J. Nanomed.* 12, 1227–1249. doi: 10.2147/IJN.S121956
- Wong, Y. P., Chua, K. H., and Thong, K. L. (2014). One-step species-specific high resolution melting analysis for nosocomial bacteria detection. *J. Microbiol. Methods* 107, 133–137. doi: 10.1016/j.mimet.2014.10.001
- Yang, Y., and Alvarez, P. J. J. (2015). Sublethal Concentrations of Silver Nanoparticles Stimulate Biofilm Development. *Environ. Sci. Technol. Lett.* 2 (8), 221–226. doi: 10.1021/acs.estlett.5b00159

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Saeki, Yamada, de Araujo, Anversa, Garcia, de Souza, Martins, Kobayashi and Nakazato. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

5.3 Artigo 3

Efeito das nanopartículas de prata biogênicas no *Sistema Quorum Sensing* de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 e PA14

Erika Kushikawa Saeki¹; Heloísa Moreira Martins²; Laís Anversa³; Eliandro Reis Tavares⁴; Sueli Fumie Yamada-Ogatta⁴; Lucy Megumi Yamauchi Lioni⁴; Renata Katsuko Takayama Kobayashi²; Gerson Nakazato²

¹Centro de Laboratório Regional, Instituto Adolfo Lutz, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil.

²Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada, Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil

³Centro de Laboratório Regional, Instituto Adolfo Lutz, Bauru, São Paulo, Brasil.

⁴Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos, Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil

RESUMO

O aumento dos microrganismos multirresistentes representa uma crise global que exige o desenvolvimento de novos compostos antimicrobianos ou novas estratégias no combate à infecção bacteriana. O controle da virulência e patogenicidade de *Pseudomonas aeruginosa* através de compostos com atividade antivirulência são considerados alvos promissores. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito das nanopartículas de prata biogênicas (bio-AgNPs) no crescimento, formação de biofilmes, produção de fatores de virulência e expressão dos genes relacionados ao sistemas de *Quorum Sensing* (QS) de *P. aeruginosa*. As bio-AgNPs foram sintetizadas pelo método de redução da prata iônica pelo fungo *Fusarium oxysporum* e os ensaios foram realizados com cepas de *P. aeruginosa* PAO1 e PA14. Inicialmente, as concentrações inibitórias mínimas (CIM) e bactericidas mínimas (CBM) foram determinadas. Os ensaios para formação de biofilmes e produção de fatores de virulência (motilidade, ramnolipídeos, protease alcalina, elastase e piocianina) foram realizados para avaliação da atividade antivirulência. O ensaio de RT-qPCR foi realizado para determinar o efeito da bio-AgNP nos genes reguladores de QS: *lasI*, *lasR*, *rhlI*, *rhlR*, *pqsA* e *mvfR*. Os valores de CIM=62,50 uM e CBM=125 uM foram identificadas para ambas as cepas. Em seguida, as concentrações sub-CIM de 31,25; 15,62 e 7,81 µM (1/4, 1/8 e 1/16 CIM) foram utilizadas para os ensaios fenotípicos e genotípicos. Os resultados experimentais mostraram que o tratamento com as sub-CIM de bio-AgNPs em *P. aeruginosa* PAO1 não afetaram a produção de protease e biofilme. Entretanto, houve redução significativa ($p < 0,05$) na motilidade, produção de ramnolipídeos e elastase. Na cepa PA14 houve estímulo na motilidade *swarming* e *twitching*, além da produção de elastase, piocianina e formação de biofilmes. O tratamento com bio-AgNPs também aumentou a expressão ($p < 0,05$) dos genes controladores do sistema QS em *P. aeruginosa* PAO1 e PA14. Estes resultados sugerem que a exposição bacteriana as baixas concentrações de bio-AgNPs pode promover o aumento na expressão dos genes reguladores do Sistema QS em *P. aeruginosa*, e consequentemente induzir a produção de fatores de virulência como a formação de biofilmes, elastase e piocianina. Por isso, o uso de bio-AgNP como composto para terapia antivirulência deve ser avaliado com precaução, para que a virulência bacteriana seja controlada de maneira eficaz.

Palavras-chave: antivirulência, *P. aeruginosa*, regulação gênica, quorum-quenching.

1 INTRODUÇÃO

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria Gram-negativa, móvel, aeróbica e não formadora de esporos. Devido ao seu metabolismo versátil, é capaz de crescer em ambientes aquáticos, no solo e causar infecções em plantas e animais, podendo gerar várias doenças humanas, especialmente em pacientes imunocomprometidos (Azam e Khan, 2019; Cillóniz et al., 2019).

A dificuldade no tratamento das infecções por *P. aeruginosa* foi reconhecida pela Organização Mundial da Saúde, que inseriu esta bactéria em uma lista de microrganismos prioritários para a busca de novos fármacos capazes de combater as infecções com isolados resistentes à carbapenems (Tacconelli et al., 2018), uma vez que este é considerado uma grande ameaça à saúde pública.

Por isso, os estudos sobre compostos com atividade antivirulência, que visam o controle da patogenicidade sem exercer uma ação bacteriostática ou bactericida são propostos como uma nova alternativa (Fleitas Martínez et al., 2019; Piewngam et al., 2020). A interferência no sistema *Quorum Sensing* (QS) pode ser alcançada pela atenuação dos sistemas de comunicação QS, pela interrupção das proteínas receptoras, degradação dos sinais autoindutores, inibição da síntese de moléculas sinalizadoras de QS ou utilização de compostos sintéticos análogos a moléculas sinalizadoras (Kalia, 2013; García-Contreras, 2016). Neste sentido, o sistema QS é o centro regulatório dos fatores de virulência mais estudados como alvo da terapia antivirulência (Defoirdt, 2018; Piewngam et al., 2020).

O QS é um mecanismo de comunicação celular entre as bactérias que ocorre a partir da secreção de moléculas sinalizadoras extracelulares (autoindutores), e sua concentração é dependente da densidade microbiana. Em geral, este sistema consiste em uma enzima que catalisa a síntese dos sinais químicos, e um receptor que liga ao sinal e induz a expressão de genes responsáveis por diversos mecanismos fisiológicos; tais como a densidade celular e a produção de inúmeros fatores de virulência (Castillo-Juárez et al., 2015; Goswami, 2017). A comunicação química através do Sistema QS é uma característica central da vida bacteriana permite que as bactérias permaneçam em comunidade e definam seus comportamentos coletivos (Papenfort e Bassler, 2016).

O QS em *P. aeruginosa* é composto por três sistemas organizados hierarquicamente: *las*, *rhl* e *pqs* (Lee et al., 2013; Lee e Zhang, 2015; Cornelis, 2020). Por causa da importância na patogenicidade bacteriana, muitas investigações foram feitas sobre a interferência no QS, e alguns agentes potenciais com atividade sobre este sistema são estudados com frequência, dentre eles as nanopartículas metálicas (Khan et al., 2019; Saleh et al., 2019; Ahmed et al., 2020).

Neste sentido, os estudos que envolvem o Sistema QS e sua regulação em *P. aeruginosa* são de grande importância para melhor compreensão da resposta bacteriana à exposição às nanopartículas metálicas. E por isso, para que esta abordagem seja bem sucedida, os mecanismos responsáveis pela patogenicidade bacteriana precisam ser detalhadamente compreendidos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito das nanopartículas de prata biogênicas no crescimento, nos fatores de virulência, formação de biofilmes e no Sistema QS de *P. aeruginosa*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Bactérias e condições de cultura

As cepas de referência *P. aeruginosa* PAO1 e UCBPP-PA14 (PA14) utilizadas neste estudo foram gentilmente cedidas pela Dra. Regina Lúcia Baldini da Universidade de São Paulo (USP) e Dra. Laurence G. Rahme (Universidade de Harvard). As culturas de estoque foram mantidas a -80 °C em caldo Luria-Bertani (LB, Neogen, EUA) contendo 20 % (v / v) de glicerol (Synth, BR).

2.2 Nanopartículas de prata (bio-AgNP)

As nanopartículas de prata biogênicas (bio-AgNPs) foram sintetizadas conforme método previamente estabelecido por Durán et al. (2005, 2006) (Patent, 2006, PI 0605681-4A2; <http://www.inpi.gov.br>), com modificações. As bio-AgNP foram obtidas após a redução do nitrato de prata por enzimas de *Fusarium oxysporum*, cepa 551, da coleção de culturas do Laboratório de Genética Molecular da ESALQ-USP (Piracicaba, São Paulo, Brasil). A cepa de *F. oxysporum* foi

cultivada em meio contendo extrato de levedura a 0,5 % (m /v) (Neogen, EUA), extrato de malte a 2 % (m /v) (Neogen, EUA), ágar a 2 % (m /v) (Difco, EUA) e água destilada, a 28 °C durante 7 dias. A biomassa fúngica (0,1 g/mL) foi adicionada à água destilada esterilizada, e incubada a 28 °C por 72 h sob agitação (150 rpm). Foi adicionado ao filtrado nitrato de prata (AgNO₃, Sigma-Aldrich, EUA) a 0,01 M, e o sistema foi incubado por 15 dias a 28°C na ausência de luz. A lavagem de bio-AgNP foi realizada com água purificada, seguida de centrifugação (27.000 g, 4 °C, 30 min) e incubação em banho ultrassônico (30 min), ambas as etapas foram repetidas três vezes. A quantificação de Ag foi realizada em Espectrômetro Dispersivo de Fluorescência de Raios-X EDX-7000. O diâmetro e o potencial zeta das nanopartículas foram determinados por espectroscopia de correlação de fótons usando ZetaSizer NanoZS (Malvern).

2.3 Concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) da bio-AgNP

A CIM das bio-AgNPs para *P. aeruginosa* PAO1 e PA14 foi determinada pela técnica de microdiluição em placas de 96 poços, conforme proposto pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015). As nanopartículas foram diluídas em caldo Mueller-Hinton (MHB, Difco, EUA) variando as concentrações de 1000 a 7,81 µM. Após a incubação a 37 °C por 24 h, a CIM foi definida como a menor concentração da bio-AgNP capaz de impedir o crescimento microbiano visível. Os controles positivos (com crescimento de *P. aeruginosa* na ausência de bio-AgNP) e negativos (apenas bio-AgNPs e MHB) foram realizados. A CBM foi determinada pelo subcultivo de 10 µL da diluição correspondente a CIM em ágar Mueller-Hinton (MHA, Difco). A CBM foi definida como a menor concentração que elimina ≥ 99,9 % das bactérias após 24 h (NCCLS, 1999). Todos os ensaios foram realizados em triplicata e pelo menos três eventos.

2.4 Análise da curva de crescimento

O efeito das bio-AgNPs sobre a cinética de crescimento de PAO1 e PA14 foram determinados de acordo com o método de plaqueamento conforme descrito

por Jorgensen (1993). O crescimento bacteriano foi realizado em caldo Luria Bertani (LB, Neogen, EUA) com bio-AgNPs nas concentrações de 1/2 CIM, 1/4 CIM, 1/8 CIM, no qual foram comparadas com a curva de crescimento controle (sem tratamento) a 37 °C por 48 h. As análises dos resultados foram realizadas em 6 tempos de tratamento (0 h, 4 h, 8 h, 24 h, 32 h e 48 h).

2.5 Fatores de virulência

2.5.1 Ensaio de formação de biofilmes

A capacidade de formação de biofilmes foi analisada em placas de 96 poços de poliestireno pelo método de Cristal Violeta descrito por Ramos-Vivas et al. (2019), com modificações. Os isolados bacterianos foram cultivados em ágar LB (Neogen, EUA) a 37 °C por 24 h. Em cada poço da placa foram adicionados 180 µL de caldo LB (Neogen, EUA) e 20 µL *P. aeruginosa* (densidade celular de $1,5 \times 10^6$ UFC/mL). Após a incubação a 37 °C por 24 h, o conteúdo da placa foi descartado e os poços foram lavados três vezes com solução tampão fosfato (PBS, pH 7,2), fixados com 250 µL de metanol absoluto PA (Merck, DE) por 10 min e corados com solução aquosa de cristal violeta 1,0 % (Merck, DE) por 15 min. Posteriormente, o corante foi descartado e os poços foram lavados por três vezes com água purificada ultrapura. O corante ligado às células aderidas foi removido pela adição de 250 µL de ácido acético glacial (Merck, DE) a 33 % (v/v) por poço. Os ensaios foram testados na presença (1/2 CIM, 1/4 CIM, 1/8 CIM) ou ausência de bio-AgNP. A leitura foi realizada em Espectrofotometro (Multiskan™ FC, Thermo Scientific™, EUA) a 620 nm (Ramos-Vivas et al., 2019). Os ensaios foram realizados 4 vezes para cada isolado e determinado a média \pm desvio padrão.

2.5.2 Ensaio de motilidade *swarming*

Os isolados de *P. aeruginosa* foram crescidos em caldo LB (Neogen, EUA) a 30 °C por 24h. Em seguida, uma suspensão de 10 µL ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) de *P. aeruginosa* foi inoculada no centro da placa de Ágar *Swarming* contendo glicose 1,0 % (Synth, BR), peptona 0,5 % (Acumedia, EUA), extrato de levedura 0,2 % (Bacto, Difco, EUA) e ágar 0,5 % (Acumedia, EUA), previamente mantidos em temperatura

ambiente, na presença de bio-AgNP (1/2 CIM, 1/4 CIM e 1/8 CIM) ou ausência. As placas foram incubadas a 30°C sem inverter por 24 h (Norizan et al., 2013).

2.5.3 Ensaio de motilidade *swimming*

Os isolados de bacterianos foram semeados em ágar LB (Neogen, EUA) e incubados a 37°C por 24 h. Em seguida, uma colônia de cada isolado foi inoculada na superfície do Ágar *Swimming* contendo triptona 1,0 % (Acumedia, EUA), cloreto de sódio 0,5 % (Synth, BR) e ágar 0,3 % (Acumedia, EUA), previamente mantidos em temperatura ambiente, na presença de bio-AgNP (1/2 CIM, 1/4 CIM e 1/8 CIM) ou ausência. As placas foram incubadas a 30 °C sem inverter por 24 h (Inoue et al., 2008).

2.5.4 Ensaio de motilidade *twitching*

Os isolados de *P. aeruginosa* foram semeados em ágar LB (Neogen, EUA) e incubados a 37 °C por 24 h. Em seguida, uma colônia de cada isolado foi perfurada até o fundo da placa de Ágar *Twitching* contendo triptona 1,0 % (Acumedia, EUA), extrato de levedura 0,5 % (Bacto, Difco, EUA), cloreto de sódio 1,0 % (Synth, BR) e ágar 1,0 % (Acumedia, EUA) na presença de bio-AgNP (1/2 CIM, ¼ CIM e 1/8 CIM) ou ausência. As placas foram invertidas e incubadas a 37 °C por 24 h. Posteriormente, o ágar foi cuidadosamente removido e a zona de motilidade foi medida em milímetros (mm) após coloração com solução aquosa de cristal violeta a 2 % (Laborclin, BR) por 2 h (Otton et al., 2017). Para controle negativo, cada isolado foi inoculado em ágar triptona de soja (TSA, Difco, EUA) sob as mesmas condições.

2.5.5 Ramnolipídeos

A cultura de *P. aeruginosa* foi cultivada na presença (1/2 CIM, 1/4 CIM, 1/8 CIM) ou na ausência de bio-AgNP em caldo LB (Neogen, EUA) a 37 °C por 24 h. Em seguida, 10 µL do inóculo foram depositados no centro do Ágar Brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) modificado contendo fosfato de potássio monobásico 0,09 % (Synth, BR), fosfato de sódio bibásico 0,11 % (Synth, BR), nitrato de sódio 0,25 % (Synth, BR), cloreto de cálcio 0,01 % (Synth, BR), sulfato de magnésio 0,04 %

(Synth, BR), brometo de cetiltrimetilamonio 0,2 % (Sigma-Aldrich, DE), azul de metileno 0,005 % (Synth, BR), glicose 0,5% (Synth, BR) e ágar 2,0% (Acumedia, EUA) a 37°C por 48 h (Siegmund e Wagner, 1991). A produção de ramnolipídeos foi determinada pelo tamanho do halo de precipitação azul formado ao redor das colônias.

2.5.6 Protease alcalina

As culturas de *P. aeruginosa* foram cultivadas em caldo LB (Neogen, EUA) a 37 °C por 24 h na presença (1/2 CIM, 1/4 CIM, 1/8 CIM) ou na ausência de bio-AgNPs. Resumidamente, 10 µL de sobrenadante de células de *P. aeruginosa* PAO1 e PA14 tratados e não tratados foram adicionados à placa de Ágar leite contendo leite em pó 1,0 % (Acumedia, EUA), peptona 0,1 % (Acumedia, EUA), NaCl 0,5 % (Synth, BR), ágar 2,0 % (Acumedia, EUA), pH 10,0 e incubados a 37 °C por 24 h. A produção de protease alcalina foi confirmada pela formação de uma zona clara ao redor das colônias e os diâmetros dos halos foram medidos e comparados com o controle (Aybey e Demirkan, 2016).

2.5.7 Elastase B (LasB)

O método elastina em vermelho congo (ECR) foi utilizado para investigar a atividade de LasB (Banerjee et al., 2017). A cultura de *P. aeruginosa* foi cultivada em caldo LB (Neogen, EUA) a 37 °C por 24 h na presença (1/2 CIM, ¼ CIM, 1/8 CIM) ou na ausência de bio-AgNP. Após a centrifugação (8000 rpm/10 min), 500 µL de sobrenadante foram adicionados a 500 µL de tampão ECR (Tris-HCl 100 mM, pH 7,5) contendo 10 mg de elastina vermelho congo (Sigma-Aldrich, DE). A mistura foi incubada a 37 °C por 6 h sob agitação de 120 rpm. Após a centrifugação (8000 rpm/10 min), a absorbância das amostras foi medida a 495 nm no espectrofotômetro da Thermo Scientific™ Multiskan™ GO.

2.5.8 Piocianina

O meio líquido descrito por El-Mowafy et al. (2017) foi utilizado para avaliar a produção de piocianina, que consiste em Peptona 2,0 % (Neogen, EUA), Cloreto de

Magnésio 0,14 % (Synth, BR), Sulfato de Magnésio 1,0 % (Synth, BR). Um mililitro de uma cultura de *P. aeruginosa* (0,5 de McFarland) crescida em caldo LB (Neogen, EUA) foi inoculado em 30 mL de meio contendo (1/2 CIM, 1/4 CIM, 1/8 CIM) ou não bio-AgNP e as células foram incubadas a 37 °C por 24 h. Em seguida, as culturas foram centrifugadas e 7,5 mL do sobrenadante foram transferidos para um tubo contendo 4,5 mL de clorofórmio (Merck, DE). Esta mistura foi vigorosamente homogeneizada em vortex por 20 s. A fase orgânica foi recolhida (3 mL) e acidificada com 1,5 mL de ácido clorídrico a 0,2 M, homogeneizada por 20 s e centrifugada a 4600 rpm por 10 min. Este procedimento produziu uma solução de coloração rosa e a absorbância foi medida a 520 nm em espectrofotômetro SPECORD S600 UV/VIS (Analytica Jena, DE), e a concentração de piocianina foi expressa em µg/mL multiplicando a DO 520 por 17.072 x 1,5.

2.6 Extração de RNA e reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR)

Para verificar os níveis de expressão dos genes relacionados ao QS, o RNA total foi extraído usando o reagente TRIzol (Invitrogen, EUA) e o RNeasy Mini Kit (QIAGEN, DE) das células *P. aeruginosa* PAO1 e PA14 crescidas em ausência (referência) e presença de bio-AgNP (1/2 CIM). A contaminação do DNA da amostra foi eliminada pelo kit RQ1-DNAse (Promega, EUA). A qualidade do RNA extraído foi verificada medindo a absorbância A260/A280 e avaliada por eletroforese em gel de agarose. As sequências dos genes foram obtidas no GenBank e os iniciadores foram desenhados e avaliados nos programas *Primer Blast* e *Software BioEdit Sequence Alignment Editor*. As sequências dos iniciadores estão listadas Tabela 1. O RT-qPCR foi realizado usando o kit QuantiNova SYBR Green RT-PCR (QIAGEN, DE) em volume final de 20 µL, incluindo 10 µL de Master Mix de RT-PCR SYBR Green, 0,2 µL de RT-mix, 1 µL (20 µM) de cada iniciador, 5 µL de RNA bacteriano (50 ng/µL) e 2,8 µL de água livre de RNase. A reação foi realizada no Rotor-Gene Q 2plex (QIAGEN, DE) e envolveu as etapas de transcrição reversa (RT) por 10 min a 50 °C; desnaturação inicial por 2 min a 95 °C, seguida de 40 ciclos de 95 °C por 5 s, hibridação e extensão a 60 °C por 10 s. O gene normalizador *proC* foi selecionado como controle interno e usado para normalizar a expressão dos genes-alvo.

2.7 Análise estatística

Para as análises estatísticas foi utilizado o software R Studio (1.2.5001) e para as representações gráficas o GraphPad Prism 8.4.2 (GraphPad Software Inc., EUA). O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. As análises de variância foram comparadas pela ANOVA seguida do teste de Tukey. Para qRT-PCR, testes de randomização usando o software REST 2009 V2.0.13 foram usados para indicar diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

3 RESULTADOS

3.1 Características das bio-AgNPs

As bio-AgNPs apresentaram uma banda de absorção plasmônica na região do espectro visível em torno de 440 nm, formato esférico e tamanho médio de 73,04 nm. Além disso, a carga superficial (potencial zeta) das nanopartículas foi de -18,77 mV.

3.2 CIM, CBM e efeitos da bio-AgNP no crescimento de *P. aeruginosa*

Antes de analisar o efeito das nanopartículas nos fatores de virulência e sistema QS, a CIM e CBM foram avaliadas em diferentes concentrações (1000 a 7,81 μM) de bio-AgNP. As CIM e CBM de bio-AgNP para *P. aeruginosa* PAO1 e PA14 foram 62,5 μM e 125 μM , respectivamente. Em seguida, as concentrações subinibitórias de 31,25; 15,62 e 7,81 μM (1/2, 1/4 e 1/8 CIM) foram testadas para avaliar se os tratamentos teriam qualquer efeito sobre o crescimento de PAO1 e PA14.

Conforme Figura 1A e 1B, os resultados revelaram que na presença de cada concentração subinibitória (sub-CIM) de bio-AgNPs, o crescimento de *P. aeruginosa* PAO1 e PA14 não foi afetado após 24 e 48 h ($p > 0,05$).

3.3 Efeito da bio-AgNP nos fatores de virulência de *P. aeruginosa*

Os efeitos das concentrações subinibitórias de bio-AgNP (7,81 μ M, 15,62 μ M e 31,25 μ M) foram testados em fatores de virulência controlados pelo QS, incluindo formação de biofilmes, motilidades, ramnolipídeos, protease alcalina, elastase b e piocianina.

3.3.1 Formação de biofilmes

O método por cristal violeta revelou que não houve alteração significativa na formação de biofilmes em *P. aeruginosa* em PAO1 após os tratamentos (Tabela 2). No entanto, a formação de biofilmes na cepa PA14 foi significativamente maior ($p < 0,05$) após os três tratamentos com bio-AgNP, com taxas de aumento de 41,22 a 127,86 %.

3.3.2 Efeito nas motilidades *swarming*, *swimming* e *twitching*

No presente estudo, o efeito das sub-CIM de bio-AgNPs nos tipos de motilidades de *P. aeruginosa* (*swarming*, *swimming* e *twitching*) foram estudados e interpretados utilizando medidas de diâmetro (mm) da zona de motilidade. Conforme a Figura 2A1, a bio-AgNP mostrou um efeito de inibição na motilidade *swarming* da cepa PAO1. Após o tratamento com 31,25 μ M, a média do diâmetro da zona de motilidade foi de 45,67 mm com taxa de inibição de 22,45 % em comparação com a zona de motilidade de 58,89 mm da cepa controle (sem tratamento). Na cepa PA14, as bio-AgNP induziram um efeito de aumento significativo ($p < 0,05$) da zona de motilidade *swarming* (Figura 2A2). Após os três tratamentos, houve aumento de motilidade *swarming* de 13,89 mm (sem tratamento) para valores médios de 45,00 a 45,89 mm, com aumento de até 230,40 %.

Da mesma maneira, outro tipo de motilidade conhecido *swimming* foi analisado. De acordo com a Figura 2B1, houve efeito inibitório significativo ($p < 0,05$) após os três tratamentos realizados na cepa PAO1. O controle apresentou resultados médios de motilidade de 41,00 mm, enquanto que após o tratamento, a zona de motilidade *swimming* variou de 29,33 a 32,78 mm, com redução de 20,05 a 28,46 %. Na cepa PA14 não houve diferença após os tratamentos para motilidade *swimming* (Figura 2B2).

Na motilidade *twitching*, também houve efeito inibitório significativo ($p < 0,05$) na cepa PAO1 após os tratamentos com 7,81 e 15,62 μM , com redução de 22,58 % e 12,90 %, respectivamente (Figura 2C1). Já na cepa PA14, houve aumento significativo de 34,15% e 39,84% ($p < 0,05$) na zona de motilidade *twitching* após o tratamento com 15,62 e 31,25 μM de bio-AgNP, respectivamente (Figura 2C2).

3.3.3 Ramnolipídeos

Após os diferentes tratamentos com as bio-AgNPs, verificou-se uma redução significativa ($p < 0,05$) na produção de ramnolipídeos em ágar CTAB na cepa PAO1 nos três tratamentos (Figura 3A1). Entretanto, não houve alteração na capacidade de formação dos ramnolipídeos nos tratamentos na cepa PA14 (Figura 3A2).

3.3.4 Protease alcalina

A produção de protease alcalina não alterou significativamente após o tratamento nas cepas testadas (Figura 3B1 e 3B2). Para a cepa PAO1 e PA14 os valores médios de halo de protease foram de 19,67 e 19,78 mm, respectivamente. Após o tratamento com bio-AgNP em PAO1, os halos médios foram entre 18,33 e 18,89 mm. Para a cepa PA14, os halos médios após os tratamentos foram de 19,67 a 20,22 mm.

3.3.5 Elastase b

Como apresentado na Figura 3C, a atividade da elastase foi monitorada após os tratamentos com as bio-AgNPs. Na cepa PAO1 houve redução significativa de 33,79 %, 30,27 % e 39,01 % ($p < 0,05$) nas concentrações 7,81; 15,62 e 31,25 μM respectivamente (Figura 3C1). Em contrapartida, após os três tratamentos com bio-AgNP na cepa PA14, houve aumento significativo 99,18 %, 93,76 % e 214,74 % ($p < 0,05$) na produção de elastase nas três concentrações de bio-AgNP, respectivamente (Figura 3C2).

3.3.6 Piocianina

A produção de piocianina de *P. aeruginosa* na presença de diferentes concentrações de bio-AgNPs foi determinada espectrofotometricamente a 520 nm. Em ambos os isolados testados (PAO1 e PA14) houve aumento na produção de piocianina em todos os tratamentos ($p < 0,05$). Na ausência de tratamento com bio-AgNP, as cepas PAO1 e PA14 apresentaram produção de piocianina de 13,51 $\mu\text{g/mL}$ e 14,74 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Após o tratamento com 31,25 μM , a cepa PAO1 apresentou a maior produção de piocianina com 16,16 $\mu\text{g/mL}$, um aumento de 19,70 %. Na cepa PA14 a maior produção foi na concentração 31,25 μM com 16,39 $\mu\text{g/mL}$ de piocianina, um aumento de 11,21 % (Figura 3D).

3.4 Análise da expressão gênica

A expressão relativa dos seis genes reguladores do sistema QS (*lasI*, *lasR*, *rhII*, *rhIR*, *pqsA* e *mvfR*) foi avaliada na ausência e presença de 31,25 μM de bio-AgNP em *P. aeruginosa* PAO1 e PA14 após 24 h, conforme Figura 4.

Os resultados mostraram que estes genes em *P. aeruginosa* PAO1 tratados com a bio-AgNP foram mais expressos que o controle ($p < 0,05$). A regulação positiva para PAO1 foi observada com aumento na expressão dos genes: *lasI* 2,0; *lasR* 1,1; *rhII* 2,1; *rhIR* 1,4; *pqsA* 2,1 e *mvfR* 2,1 vezes.

Na cepa PA14 os genes que apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) na expressão gênica após o tratamento com a bio-AgNP foram: *lasI* 3,3; *lasR* 1,4; *rhIR* 1,7; *pqsA* 3,3 e *mvfR* 3,5 vezes. Apenas o gene *rhII* apresentou regulação negativa, com redução significativa de 0,6 vezes ($p < 0,05$).

4 DISCUSSÃO

Em razão dos estudos relacionados com o controle das bactérias multirresistentes e que visam terapia antivirulência, realizamos esta pesquisa com as nanopartículas de prata biogênicas como alternativa para o controle bacteriano. A nanotecnologia e o desenvolvimento de nanopartículas que tem o sistema QS e/ou fatores de virulência como alvo estão em evidência na literatura em microrganismos como a *P. aeruginosa* (Li et al., 2018; Ahmed et al., 2020; Shah et al., 2019; Khan et al., 2019; Ouyang et al., 2020).

Verificou-se que houve diferenças significativas nos resultados fenotípicos entre as cepas de referência testadas. Para PAO1, as motilidades *swarming*, *swimming*, *twitching*, produção ramnolipídeos e elastase foram significativamente reduzidos na presença de bio-AgNP em níveis sub-CIM. Entretanto, para a cepa PA14, houve aumento significativo após o tratamento com as bio-AgNPs nos ensaios motilidades *swarming* e *twitching*, produção de elastase, piocianina e formação de biofilmes.

Estas cepas de referência possuem características genotípicas diferentes. *P. aeruginosa* PAO1 é uma cepa moderadamente virulenta e pertence a um grupo clonal relativamente raro (ST 549). Por outro lado, a cepa PA14 é altamente virulenta e representa o grupo clonal mais comum (ST 253) em todo o mundo. Além disso, a PA14 possui duas ilhas de patogenicidade (PAPI-1 e PAPI-2) que são ausentes em PAO1 (Harrison et al., 2010; Mikkelsen et al., 2011; Sawa et al., 2020). As cepas também diferem no tamanho do genoma (6,3 Mpb para PAO1 e 6,5 Mpb para PA14) e têm regiões genômicas únicas (54 regiões para PAO1 e 58 regiões para PA14) (Lee et al., 2006). Isso poderia explicar as diferentes respostas entre as duas cepas de referência após o tratamento com bio-AgNPs.

No ensaio para avaliar a formação de biofilmes sem tratamento com bio-AgNPs, verificou-se que a cepa PAO1 apresentou maior capacidade de formação de biofilmes quando comparado com a cepa PA14. A capacidade reduzida da cepa PA14 na formação de biofilmes pode ser devido a mutação no gene *ladS* na PA14 que tem um impacto deletério no biofilme (Mikkelsen et al., 2011).

Após o tratamento com bio-AgNPs, surpreendentemente, a cepa PA14 apresentou aumento significativo da formação de biofilmes. O mecanismo de formação de biofilmes é diferente nas cepas de referência PAO1 e PA14, pois cada cepa utiliza um EPS como componente estrutural predominante no biofilme. Enquanto a cepa PAO1 utiliza o sistema *Wsp* para produção do *psl* e PA14 utiliza o sistema *Pil-Chp* para produção do EPS *pel* (Colvin et al., 2011; Lee et al., 2020). A formação de biofilmes é dependente de diversos fatores como a síntese de exopolissacarídeos (EPS) denominados *psl* e *pel*; além dos alginatos, DNA extracelular (eDNA) e adesinas (flagelos e pili tipo IV) que associados contribuem para a maturação, resistência aos antibióticos e persistência do biofilme (Skariyachan et al., 2018). Os EPS são responsáveis pela adesão bacteriana na superfície, formação e estabilidade da arquitetura do biofilme (Thi et al., 2020). O

eDNA auxilia na motilidade *twitching* das bactérias e no fornecimento de nutrientes às células bacterianas (Brindhadevi et al., 2020).

É importante destacar que há uma ligação indireta entre a formação de biofilmes e sistema QS, através do controle das motilidades *swarming* e *twitching*, bem como a produção de ramnolipídeos (Rasamiravaka et al., 2015) e piocianina (Das et al., 2015). *P. aeruginosa* exibe três tipos de motilidade *swarming*, *swimming* e *twitching* que permitem a colonização de superfícies e exploração de novos ambientes (Newman et al., 2017). Na formação de biofilmes, a fixação inicial às superfícies ocorre por meio do flagelo polar e pela produção de adesão proteica no pili tipo IV, que fixa as bactérias na superfície e permite que as células se espalhem pela área circundante (Rossi et al., 2018).

No presente estudo, o aumento significativo nas motilidades *swarming*, *twitching*, e na produção piocianina após o tratamento com as bio-AgNPs na cepa PA14, favoreceu o aumento da formação do biofilme. Segundo Persat et al. (2015), os fatores de virulência podem ser ativados por elementos estruturais sensoriais (por exemplo, pili tipo IV), uma vez que a bactéria *P. aeruginosa* utiliza estas estruturas para reconhecimento da superfície e ativação de um sistema quimiossensorial Chp que regula o cAMP (segundo mensageiro) e induz a transcrição de genes de virulência. Por isso, o aumento expressivo na motilidade *swarming* e *twitching* que são mediados por pili tipo IV em PA14, pode ter favorecido o aumento dos demais fatores de virulência.

Ouyang et al. (2020) realizaram estudos com baixas concentrações de nanopartículas de zinco (0,5–30 mg/L) e observaram aumento na formação do biofilme em *P. putida* KT2440. Neste estudo, foi também observado o aumento da massa de proteínas e açúcares na massa do biofilme após o tratamento.

Garuglieri et al. (2016) verificam que as concentrações subinibitórias de AgNPs (0,01 µg/mL) podem causar aumento na motilidade *swimming* em *Escherichia coli* após tratamento. Saeki et al. (2021) também observaram o aumento das motilidades *swarming*, *swimming* e *twitching* após o tratamento as bio-AgNPs em isolados *P. aeruginosa* obtidos de fontes clínicas e ambientais. Nestes casos, as bio-AgNPs possivelmente estimulou uma resposta contra o estresse gerado, conforme descrito por Villa et al. (2012).

A cepa PAO1 apresentou redução significativa da produção de elastase B após os tratamentos com bio-AgNPs, enquanto que a cepa PA14 apresentou

aumento significativo ($p < 0,05$). A elastase B, também conhecida como pseudolisina está associada a inflamação vascular nas infecções por *P. aeruginosa* (Galdino et al., 2017). Em concordância o presente estudo no qual a cepa PA14 apresentou aumento na formação de biofilmes após o tratamento com bio-AgNPs, Yu et al. (2014) demonstraram que a elastase B é crucial para a formação de biofilmes. Aqueles autores observaram que o mutante $\Delta lasB$ diminuiu a formação de biofilmes através da regulação negativa da síntese de ramnolipídeos em *P. aeruginosa*.

Para o ensaio de protease alcalina não houve diferenças na sua produção nas cepas PAO1 e PA14 quando tratados com bio-AgNPs. A protease alcalina causa danos graves ao tecido do hospedeiro por distorção estruturas do citoesqueleto e capacidade de degradar fibronectina e laminina, componentes importantes do endotélio (Galdino et al., 2017). Tanto a protease alcalina quanto a elastase B são capazes de inibir a função dos neutrófilos, interferindo na quimiotaxia. Com isso, promovem uma vantagem às bactérias em escapar dos fagócitos do sistema de defesa do hospedeiro (Hoge et al., 2010).

A expressão gênica dos genes *lasI*, *rhII* e *pqsA* são necessários para a síntese de moléculas sinalizadoras do QS em *P. aeruginosa* e seus reguladores transcricionais *lasR*, *rhIR* e *mvfR* foram selecionados e analisados. Apesar da maioria dos fatores de virulência nos ensaios fenotípicos de PAO1 serem reduzidos após o tratamento com as bio-AgNPs, em ambas as cepas (PAO1 e PA14) os genes regulado,es aumentaram sua expressão gênica. Os genes na cepa PAO1 tratados com a bio-AgNP foram mais expressos (regulação positiva) que o controle ($p < 0,05$). Na cepa PA14 apenas o gene *rhII* apresentou regulação negativa. Os demais também foram mais expressos ($p < 0,05$) que o controle.

O sistema *las* é o regulador mestre do sistema QS que induz a expressão de ambas as vias *Rhl* e *Pqs* em *P. aeruginosa* (Rathinam et al., 2017). As proteínas *lasI* and *rhII* sintases são responsáveis pela produção de autoindutores 3-oxo-C12-AHL e C4-AHL, respectivamente. Quando a quantidade dessas moléculas atinge um limiar, a molécula 3-oxo-C12-AHL se liga com o receptor *lasR* e induz a expressão de fatores de virulência como elastase, exotoxina e proteases e também ativa o sistema *rhII* / R. Enquanto que, o autoindutor C4-AHL se liga com *rhIR* e controla a expressão de genes que codificam produção de elastase, piocianina, ramnolipídeos e motilidade. O terceiro autoindutor PQS, quando se liga ao receptor *mvfR* é capaz de regular a expressão de piocianina e ativa o sistema *rhII* (Lee e Zhang, 2015). Por

isso, o aumento acima de 2,0 vezes na expressão dos genes *pqsA* e *mvfR* em cepas PAO1 e PA14 permitiram a maior produção pirocianina após o tratamento com a bio-AgNP e a redução de 0,6 vezes na expressão de *rhII* em PA14 não refletiu na diminuição nos ensaios fenotípicos de virulência.

Liao et al. (2019) demonstraram que o principal mecanismo de ação das AgNPs em isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes envolve o desequilíbrio dos processos de oxidação e da dificuldade em eliminar as espécies reativas ao oxigênio. Cugini et al. (2010) propuseram que os compostos como o farnesol que promovem a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), aumentaram a expressão do sistema PQS ativando o *rhIR* em *P. aeruginosa*.

A diminuição na produção da motilidade, ramnolipídeos e elastase em PAO1 poderia ser explicada resposta do gene *lasR* que apresentou o aumento na sua expressão de 1,1 vezes após o tratamento com bio-AgNPs. Devido a interconexão de todos os sistemas QS, e principalmente por LasR controlar a ativação da cascata que liga os demais sistemas (Chuang et al., 2019), sugere que a resposta do gene *lasR* ao tratamento com bio-AgNP não foi o suficiente para causar uma resposta de aumento fenotípico destes fatores de virulência. Diferentemente, da cepa PA14, no qual o aumento na expressão do gene *lasR* de 1,4 vezes promoveu resposta de aumento fenotípicos na motilidade e elastase.

Os resultados encontrados foram semelhantes a pesquisas anteriores que investigaram o impacto das nanopartículas de prata no Sistema QS de *P. aeruginosa*. Yang e Alvarez (2015), observaram que as concentrações subinibitórias de AgNPs (21,6 e 108 µg/L) poderiam induzir o sistema QS (genes *lasI*, *lasR*, *rhII* e *rhIR*) de PAO1 e aumentar a formação de biofilmes. Li et al. (2018) estudaram diversos nanometais (prata, ferro, óxido de zinco, grafeno, etc.) e comprovaram que as AgNPs (100 µg/L) foram capazes de aumentar a síntese de autoindutores 3-oxo-C12-AHL, produção de protease, formação de biofilmes e expressão do gene *lasR* em PAO1. Ouyang et al. (2020) ao avaliar o efeito de baixas concentrações de nanopartículas de zinco, verificaram o aumento na expressão dos genes reguladores do sistema QS em *P. putida*.

Entretanto, Soto-Aceves et al. (2019) apresentaram um estudo linhagens mutantes de *P. aeruginosa* $\Delta lasR$, $\Delta rhIR$ e $\Delta lasR-\Delta rhIR$ no qual a inibição de *lasR* ou *rhIR* não é uma abordagem direta para bloquear a virulência de *P. aeruginosa* PAO1, devido à grande complexidade do Sistema QS. Por isso, a inibição da

produção dos fatores de virulência não está restrita ao controle da regulação de apenas um dos Sistemas do QS. Segundo os autores, além dos três sistemas que são interconectados, outros fatores (sinais químicos e outros reguladores) precisam ser estudados e melhor compreendidos.

Outras pesquisas mostram estudos com nanopartículas de prata no qual houve uma redução na produção de fatores de virulência e QS. Singh et al. (2015) avaliaram AgNPs sintetizados a partir de *Rhizopus arrhizus* no qual inibiu a expressão dos genes reguladores do QS (*lasI*, *lasR*, *rhlI*, *rhlR*, *fabH2*) em *P. aeruginosa* PAO1. Enquanto que Liu et al. (2019) testaram as AgNP e combinadas com N-óxido de 4-Nitropiridina para a inibição da formação de biofilmes e sistema QS (*lasI*, *lasR*, *rhlI*, *rhlR*, *pqsA* e *pqsR*). A diferença entre os trabalhos é que Sigh et al. (2015) sintetizaram as bio-AgNPs a partir do fungo *Rhizopus arrhizus* BRS-07 e o tamanho das bio-AgNPs foi de aproximadamente 28 nm. Na presente pesquisa, a Bio-AgNP foi sintetizada a partir do *F. oxysporum* e o tamanho das bio-AgNPs foi de 73 nm. Na pesquisa de Liu et al. (2019), os autores utilizaram uma combinação das nanopartículas com outro composto (N-óxido de 4-Nitropiridina). Na presente pesquisa, utilizamos somente as bio-AgNPs.

Como a inibição do QS tem sido apresentada como uma nova estratégia de terapia antivirulência (Defoirdt et al., 2018; Piewngam et al., 2020), a compreensão dos mecanismos que envolvem a patogenicidade em *P. aeruginosa* é de extrema importância, para que os compostos com atividade antivirulência sejam aplicados de maneira eficiente.

De acordo com Mohanty et al. (2016), os efeitos das nanopartículas metálicas no sistema QS são altamente dependentes de espécies bacterianas. Por isso, considerando a variabilidade das respostas bacterianas aos diferentes compostos metálicos, essa abordagem precisa ser bem estudada e comprovada cientificamente com estudos moleculares complementares incluindo as cepas de referência e isolados obtidos de diferentes fontes (ambiental e clínica).

5 CONCLUSÃO

Este trabalho sugere que a exposição bacteriana as baixas concentrações de bio-AgNP pode promover a regulação positiva dos genes reguladores do sistema QS de *P. aeruginosa*. Isso implica que a presença ou liberações acidentais de baixas

concentrações de AgNPs pode causar desequilíbrios ecológicos, no qual podem promover o aumento da virulência em *P. aeruginosa*.

Desta forma, o novo conceito de terapia antivirulência que são apresentados com frequência precisa ser cuidadosamente estudado. Visto que a compreensão da virulência bacteriana e seus mecanismos de patogenicidade dependem de uma série de fatores extracelulares e associados às células, sendo estes fatores essenciais para o desenvolvimento de potenciais alvos para este tipo de terapia.

6 CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram que a pesquisa foi realizada na ausência de quaisquer relações comerciais ou financeiras que possam ser interpretadas como um potencial conflito de interesses.

7 CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

EKS fez o delineamento o estudo, realizou os ensaios, interpretou os dados e escreveu o artigo. HMM realizou os ensaios de Biologia Molecular. LA, ERT, SFYO, LMYL contribuíram para a revisão do artigo. RK e GN auxiliaram na interpretação dos resultados e revisão da versão final do artigo.

8 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina. Nós também agradecemos a Dra. Regina Lúcia Baldini da Universidade de São Paulo (USP) e Dra. Laurence G. Rahme (Universidade de Harvard) por fornecer as cepas de *P. aeruginosa* PAO1 e PA14 que foram utilizadas neste estudo.

REFERÊNCIAS

Ahmed, T., Pattnaik, S., Khan, M. B, Ampasala, D. R., Busi, S., and Sarma, V. V. (2020). Inhibition of quorum sensing-associated virulence factors and biofilm

- formation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by *Mycocleptodiscus indicus* PUTY1. *Braz. J. Microbiol.* 51:2, 467-487. [doi: 10.1007/s42770-020-00235-y](https://doi.org/10.1007/s42770-020-00235-y)
- Azam, M.W., and Khan, A.U. (2019). Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. *Drug Discov. Today.* 24:1, 350-359. [doi: 10.1016/j.drudis.2018.07.003](https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.07.003)
- Aybey, A., and Demirkan, E. (2016). Inhibition of quorum sensing-controlled virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* by human serum paraoxonase. *J. Med. Microbiol.* 65:2, 106-113. [doi: 10.1099/jmm.0.000206](https://doi.org/10.1099/jmm.0.000206)
- Banerjee, M., Moulick, S., Bhattacharya, K.K., Parai, D., Chattopadhyay, S., and Mukherjee, S.K. (2017). Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing, virulence and biofilm formation by extracts of *Andrographis paniculata*. *Microb. Pathog.* 113:85-93. [doi: 10.1016/j.micpath.2017.10.023](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.10.023)
- Brindhadevi, K., Lewisoscar, F., Mylonakis, E., Shanmugam, S., Verma, T.N., and Pugazhendhi, A. (2020). Biofilm and Quorum sensing mediated pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Process Biochem.* 96, 49–57. [Doi:10.1016/j.procbio.2020.06.001](https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.06.001)
- Castillo-Juárez, I., Maeda, T., Mandujano-Tinoco, E.A., Tomás, M., Pérez-Eretza, B., García-Contreras, S.J., Wood, T.K., and García-Contreras, R. (2015). Role of quorum sensing in bacterial infections. *World J. Clin. Cases.* 16;3(7):575-98. [doi: 10.12998/wjcc.v3.i7.575](https://doi.org/10.12998/wjcc.v3.i7.575)
- Chuang, S.K., Vrla, G.D., Fröhlich, K.S., and Gitai, Z. (2019). Surface association sensitizes *Pseudomonas aeruginosa* to quorum sensing. *Nat Commun.* 10, 4118. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12153-1>
- Cillóniz, C., Dominedò, C., and Torres, A. (2019). Multidrug Resistant Gram-Negative Bacteria in Community-Acquired Pneumonia. *Crit Care.* 9;23(1):79. [doi: 10.1186/s13054-019-2371-3](https://doi.org/10.1186/s13054-019-2371-3)
- CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute (2015). M07-A9: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard. Tenth Edition. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA.
- Cornelis P. (2020). Putting an end to the *Pseudomonas aeruginosa* IQS controversy. *Microbiologyopen.* 9(2):e962. [doi: 10.1002/mbo3.962](https://doi.org/10.1002/mbo3.962)
- Colvin, K.M., Gordon, V.D., Murakami, K., Borlee, B.R., Wozniak, D.J., Wong, G.C., and Parsek, M.R. (2011). The pel polysaccharide can serve a structural and protective role in the biofilm matrix of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog.* 7(1):e1001264. [doi: 10.1371/journal.ppat.1001264](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001264)
- Cugini, C., Morales, D. K., and Hogan, D. A. (2010). Candida albicans-produced farnesol stimulates *Pseudomonas* quinolone signal production in LasR-

- defective *Pseudomonas aeruginosa* strains. Microbiology (Reading, England), 156(Pt10), 3096–3107. doi: [10.1099/mic.0.037911-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.037911-0)
- Das, T., Kutty, S.K., Tavallaie, R., Ibugo, A.I., Panchompoo, J., Sehar, S., Aldous, L., and Yeung, A.W.S., Thomas, S.R., Kumar, N., Gooding, J.J., and Manefield, M. (2015). Phenazine virulence factor binding to extracellular DNA is important for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. Sci Rep 5(1):8398. doi: [10.1038/srep08398](https://doi.org/10.1038/srep08398)
- Defoirdt, T. Quorum-Sensing Systems as Targets for Antivirulence Therapy. (2018). Trends Microbiol. 26(4):313-328. doi: [10.1016/j.tim.2017.10.005](https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.10.005)
- Durán, N., Marcato, P. D., Alves, O. L., Souza, G. I. H., and Esposito, E. (2005). Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. J. Nanobiotechnology. 3:8. doi: 10.1186/1477-3155-3-8
- Durán, N., Alves, O. L., Esposito, E., de Souza, G. I., and Marcato, P. D. (2006). Processo de produção de nanopartículas de prata estabilizadas por proteínas na produção de produtos têxteis antibacterianos e o tratamento dos efluentes produzidos. Braz. patent PI 0605681-4 A. Campinas: BR. Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI).
- El-Mowafy, S. A., El Galil, K. H. A., Habib, E.E, and Shaaban, M. I. (2017). Quorum sensing inhibitory activity of sub-inhibitory concentrations of β -lactams. Afr Health Sci. 17(1):199-207. doi:10.4314/ahs.v17i1.25
- Fleitas Martínez, O., Cardoso M.H., Ribeiro, S.M., and Franco, O.L. (2019). Recent Advances in Anti-virulence Therapeutic Strategies With a Focus on Dismantling Bacterial Membrane Microdomains, Toxin Neutralization, Quorum-Sensing Interference and Biofilm Inhibition. Front Cell Infect Microbiol, 2;9:74. doi: 10.3389/fcimb.2019.00074.
- Galdino, A.C.M., Branquinha, M.H., Santos, A.L.S., and Viganor L. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* and Its Arsenal of Proteases: Weapons to Battle the Host. In: Chakraborti S., Dhalla N. (eds) Pathophysiological Aspects of Proteases. Springer, Singapore. doi: [10.1007/978-981-10-6141-7_16](https://doi.org/10.1007/978-981-10-6141-7_16)
- García-Contreras, R. Is Quorum Sensing interference a viable alternative to treat *Pseudomonas aeruginosa* infections? (2016). Front Microbiol. 14;7:1454. doi: 10.3389/fmicb.2016.01454
- Garuglieri, E., Cattò, C., Villa, F., Zanchi, R., and Cappitelli, F. (2016). Effects of sublethal concentrations of silver nanoparticles on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* under aerobic and anaerobic conditions. Biointerphases 11, 04B308. doi:10.1116/1.4972100
- Goswami, J. Quorum Sensing by Super Bugs and their Resistance to Antibiotics, a Short Review. (2017) Glob J Pharmaceu Sci 3(3): 555614.

- Harrison, E. M., Carter, M. E., and Luck, S. (2010). Pathogenicity islands PAPI-1 and PAPI-2 contribute individually and synergistically to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14. *Infection and Immunity* 78 (4): 1437-1446. doi:[10.1128/IAI.00621-09](https://doi.org/10.1128/IAI.00621-09)
- Hoge, R., Pelzer, A., Rosenau, F., Wilhelm, S., and Duesseldorf., H. (2010). "Weapons of a pathogen: Proteases and their role in virulence of *Pseudomonas aeruginosa*".
- Inoue, T., Shingaki, R., and Fukui, K. (2008). Inhibition of swarming motility of *Pseudomonas aeruginosa* by branched-chain fatty acids. *FEMS Microbiol Lett.* 281(1):81-6. doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01089.x.
- Jorgensen, J. H. (1993). Antimicrobial susceptibility testing of bacteria that grow aerobically. *Infect Dis Clin N Am* 7(2):393–409.
- Kalia, V. C. Quorum sensing inhibitors: an overview. (2013). *Biotechnol Adv.* 31(2):224-45. doi: 10.1016/j.biotechadv.2012.10.004.
- Khan, F., Manivasagan, P., Lee, J.W., Pham, D.T.N., Oh, J., and Kim, Y.M. (2019). Fucoidan-Stabilized Gold Nanoparticle-Mediated Biofilm Inhibition, Attenuation of Virulence and Motility Properties in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Mar Drugs.* 17(4):208. doi:10.3390/md17040208
- Lee, D. G., Urbach, J. M., Wu, G., Liberati, N. T., Feinbaum, R. L., Miyata, S., Diggins, L. T., He, J., Saucier, M., Déziel, E., Friedman, L., Li, L., Grills, G., Montgomery, K., Kucherlapati, R., Rahme, L. G., and Ausubel, F. M. (2006). Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome Biol* 7, R90 doi: 10.1186/gb-2006-7-10-r90
- Lee, J., Wu, J., Deng, Y.Y., Wang, J., Wang, C., Wang, J., Chang C, Dong Y, Williams P, and Zhang LH. (2013). A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response. *Nat. Chem. Biol.* 9(5):339-43. doi: 10.1038/nchembio.1225
- Lee, J., Zhang, L. (2015). The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell.* 6(1):26-41. doi:10.1007/s13238-014-0100-x
- Lee, C. K., Vachier, J., De Anda, J., Zhao, K., Baker, A. E., Bennett, R. R., Armbruster, C. R., Lewis, K. A., Tarnpol, R. L., Lomba, C. J., Hogan, D. A., Parsek, M. R., O'toole, G. A., Golestanian, R., and Wong, G. C. L. (2020). Social cooperativity during surface attachment in early biofilms: a quantitative comparison between reversible attachment in *P. aeruginosa* PA14 and PAO1. *mBio*, 11. Doi: 10.1101/798843
- Liao, S., Zhang, Y., Pan, X., Zhu, F., Jiang, C., Liu, Q., Cheng, Z., Dai, G., Wu, G., Wang, L., and Chen, L. (2019). Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Nanomedicine.* 14:1469-1487. doi:10.2147/IJN.S191340

- Li, N., Wang, L., Yan, H., Wang, M., Shen, D., Yin, J., and Shentu, J. (2018) Effects of low-level engineered nanoparticles on the quorum sensing of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Environ Sci Pollut Res Int.* 25(7):7049-7058. doi: 10.1007/s11356-017-0947-5.
- Liu, L., Li, J., Zi, S., Liu, F., Deng, C., Ao, X., and Zhang, P. (2019). AgNP combined with quorum sensing inhibitor increased the antibiofilm effect on *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol* 103, 6195–6204. doi: [10.1007/s00253-019-09905-w](https://doi.org/10.1007/s00253-019-09905-w)
- Mikkelsen, H., McMullan, R., and Filloux, A. (2011). The *Pseudomonas aeruginosa* reference strain PA14 displays increased virulence due to a mutation in *ladS*. *PLoS One.* 6(12):e29113. doi: 10.1371/journal.pone.0029113
- Mohanty, A., Tan, C. H., and Cao, B. (2016). Impacts of nanomaterials on bacterial quorum sensing: differential effects on different signals. *Environmental Science: Nano.* 3:2,351–356. doi:10.1039/c5en00273g
- NCCLS, National Committee for Clinical Laboratory Standards (1999). *Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents – M26-A.*
- Newman, J.W., Floyd, R.V., and Fothergill, J.L. (2017). The contribution of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors and host factors in the establishment of urinary tract infections. *FEMS Microbiol Lett.* 364:15. doi:10.1093/femsle/fnx124.
- Norizan, S.N., Yin, W.F., and Chan, K.G. (2013). Caffeine as a potential quorum sensing inhibitor. *Sensors.* 18;13(4):5117-29. doi: 10.3390/s130405117.
- Otton, L. M., Campos, M. S., Meneghetti, K. L., and Corção, G. (2017). Influence of twitching and swarming motilities on biofilm formation in *Pseudomonas* strains. *Arch Microbiol.* 199:5, 677-682. doi: 10.1007/s00203-017-1344-7.
- Ouyang, K., Mortimer, M., Holden, P.A., Cai, P., Wu, Y., Gao, C., and Huang, Q. (2020). Towards a better understanding of *Pseudomonas putida* biofilm formation in the presence of ZnO nanoparticles (NPs): Role of NP concentration. *Environment International* 137,105485. doi: [10.1016/j.envint.2020.105485](https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105485)
- Papenfort, K., and Bassler, B.L. (2016). Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol.* 11;14(9):576-88. doi: 10.1038/nrmicro.2016.89.
- Persat, A., Inclan, Y. F., Engel, J.N., Stone, H.A., and Gitai Z. (2015). Type IV pili mechanochemically regulate virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *PNAS* 112 (24): 7563–7568.
- Piewngam, P., Chiou, J., Chatterjee, P., and Otto, M. (2020). Alternative approaches to treat bacterial infections: targeting quorum-sensing. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 18:6, 499-510. doi:10.1080/14787210.2020.1750951

- Ramos-Vivas, J., Chapartegui-González, I., Fernández-Martínez, M., González-Rico, C., Fortún, J., Escudero, R. et al. (2019). Biofilm formation by multidrug resistant Enterobacteriaceae strains isolated from solid organ transplant recipients. *Sci. Rep.* 9, 8928 [doi: 10.1038/s41598-019-45060-y](https://doi.org/10.1038/s41598-019-45060-y).
- Rathinam, P., Vijay Kumar, H.S., and Viswanathan, P. (2017). Eugenol exhibits anti-virulence properties by competitively binding to quorum sensing receptors. *Biofouling*. 33:624–639. [doi:10.1080/08927014.2017.1350655](https://doi.org/10.1080/08927014.2017.1350655)
- Rasamiravaka, T., Labtani, Q., Duez, P., and El Jaziri, M. (2015). The Formation of Biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms. *BioMed Res Int.* 759348. [doi:10.1155/2015/759348](https://doi.org/10.1155/2015/759348)
- Rossi, E., Paroni, M., and Landini, P. (2018). Biofilm and motility in response to environmental and host-related signals in Gram negative opportunistic pathogens. *J Appl Microbiol.* [doi: 10.1111/jam.14089](https://doi.org/10.1111/jam.14089).
- Saeki, E.K., Yamada, A.Y., de Araujo, L.A., Anversa, L., Garcia, D.O., de Souza, R.L.B. et al. (2021). Subinhibitory Concentrations of Biogenic Silver Nanoparticles Affect Motility and Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Cell Infect Microbiol.* 11:656984. [doi:10.3389/fcimb.2021.656984](https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.656984)
- Saleh, M.M., Sadeq, R.A., Abdel Latif, H.K, Abbas, H.A., and Askoura, M. (2019). Zinc oxide nanoparticles inhibits quorum sensing and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Afri Health Sci.* 19:2, 2043-2055. [doi: 10.4314/ahs.v19i2.28](https://doi.org/10.4314/ahs.v19i2.28)
- Sawa, T., Momiyama, K., Mihara T., Kainuma, A., Kinoshita M., and Moriyama, K. (2020). Molecular epidemiology of clinically high-risk *Pseudomonas aeruginosa* strains: Practical overview. *Microbiol. Immunol.* 64:331–344. [doi: 10.1111/1348-0421.12776](https://doi.org/10.1111/1348-0421.12776)
- Shah, S., Gaikwad, S., Nagar, S., Kulshrestha, S., Vaidya, S., Nawani, N. et al. (2019). Biofilm inhibition and anti-quorum sensing activity of phytosynthesized silver nanoparticles against the nosocomial pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Biofouling.* 35(1):34-49. [doi: 10.1080/08927014.2018.1563686](https://doi.org/10.1080/08927014.2018.1563686)
- Skariyachan, S., Sridhar, V.S., Packirisamy, S., Kumargowda, S.T., and Challapilli, S.B. (2018). Recent perspectives on the molecular basis of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and approaches for treatment and biofilm dispersal. *Folia Microbiol (Praha).* 63: 4, 413-432. [doi: 10.1007/s12223-018-0585-4](https://doi.org/10.1007/s12223-018-0585-4).
- Siegmund, I., and Wagner, F. (1991). New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar. *Biotechnology Techniques.* 5:4, 265-268.

- Singh, B.R., Singh, B.N., Singh, A., Khan, W., Naqvi, A.H., and Singh, H.B. (2015). Mycofabricated biosilver nanoparticles interrupt *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing systems. *Sci Rep.* 5:13719. doi:10.1038/srep13719
- Soto-Aceves, M. P., Cocotl-Yañez, M., Merino, E., Castillo-Juárez, I., Cortés-López, H., González-Pedrajo, B. et al. (2019). Inactivation of the quorum-sensing transcriptional regulators LasR or RhIR does not suppress the expression of virulence factors and the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology (Reading)*. 165:4,425-432. doi:10.1099/mic.0.000778
- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth S., Mendelson, M., Monnet, D.L. et al. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect. Dis.* 18:3, 318-327. doi:10.1016/S1473-3099(17)30753-3
- Thi, M.T.T., Wibowo, D., and Rehm, B.H.A. (2020). *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Int. J. Mol. Sci.* 21(8671):1-25.
- Villa, F., Remelli, W., Forlani, F., Gambino, M., Landini, P., and Cappitelli, F. (2012). Effects of chronic sub-lethal oxidative stress on biofilm formation by *Azotobacter vinelandii*. *Biofouling*, 28:8,823-833. doi:[10.1080/08927014.2012.715285](https://doi.org/10.1080/08927014.2012.715285)
- Yang, Y., and Alvarez, P.J.J. (2015). Sublethal Concentrations of Silver Nanoparticles Stimulate Biofilm Development. *Environ. Sci. Technol. Lett.* 2:8, 221–226. doi: 10.1021/acs.estlett.5b00159
- Yu, H., He, X., Xie, W., Xiong, J., Sheng, H., Guo, S. et al. (2014). Elastase LasB of *Pseudomonas aeruginosa* promotes biofilm formation partly through rhamnolipid-mediated regulation. *Can J Microbiol.* 60(4):227-35. doi: 10.1139/cjm-2013-0667.

Tabela 1 - Lista de genes e seus respectivos iniciadores utilizados no ensaio de RT-qPCR.

Gene alvo	Tipo de iniciador	Sequência	Tamanho do Amplicon (bp)
<i>proC</i>	F	5'- GAG CAA CTG ATC GTC TCC ATC -3'	100
	R	5'- GGG TGT TGG GCA TGC AG -3'	
<i>lasI</i>	F	5'- GTA GGC GTG GAG AAG ATG ATG -3'	122
	R	5'- ATC TGG GTC TTG GCA TTG AG -3'	
<i>lasR</i>	F	5'- CTG TGG ATG CTC AAG GAC TAC -3'	111
	R	5'- CCA CTG CAA CAC TTC CTT CT -3'	
<i>rhlI</i>	F	5'- GTC GGT CTG GGA GCT TTC -3'	100
	R	5'- CAG GTA CCA GGC GCA TT -3'	
<i>rhlR</i>	F	5'- CTG TGG TGG GAC GGT TTG -3'	139
	R	5'- GGG TGA AGG GAA TCG TGT G -3'	
<i>pqsA</i>	F	5'- GCT GTA TTC GAT TCC CAA GAT G -3'	100
	R	5'- CCA GGT ATC GTC GAG CAG -3'	
<i>mvfR</i>	F	5'- GCT TCG CCT GAT CCC TTA C -3'	104
	R	5'- GCA GCA CCC GGA GAT TG -3'	

F: Forward, R: Reverse, pb: pares de bases.

Tabela 2 - Formação do biofilme em *P. aeruginosa* após o tratamento com diferentes concentrações subinibitórias de nanopartículas de prata.

Cepa	Composto	Concentração	Formação de biofilme ¹	Taxa de redução (%) ²	Taxa de aumento (%) ²
PAO1	Controle	0 µM	0,260 ± 0,040	-	-
PAO1	bio-AgNP	7,81 µM	0,257 ± 0,021	1,31 %	-
PAO1	bio-AgNP	15,62 µM	0,256 ± 0,051	1,73 %	-
PAO1	bio-AgNP	31,25 µM	0,238 ± 0,068	8,74 %	-
PA14	Controle	0 µM	0,052 ± 0,007 ^c	-	-
PA14	bio-AgNP	7,81 µM	0,118 ± 0,015 ^a	-	127,86 %
PA14	bio-AgNP	15,62 µM	0,085 ± 0,020 ^b	-	64,09 %
PA14	bio-AgNP	31,25 µM	0,073 ± 0,013 ^b	-	41,22 %

¹Valores expressos em densidade óptica (DO) 620 nm (média ± desvio padrão).

²Taxa de inibição ou aumento = (DO grupo controle – DO grupo experimental)/DO grupo controle.

^{a-c}Teste de Tukey com diferença significativa $p < 0,05$.

Bio-AgNP: nanopartículas de prata biogênicas.

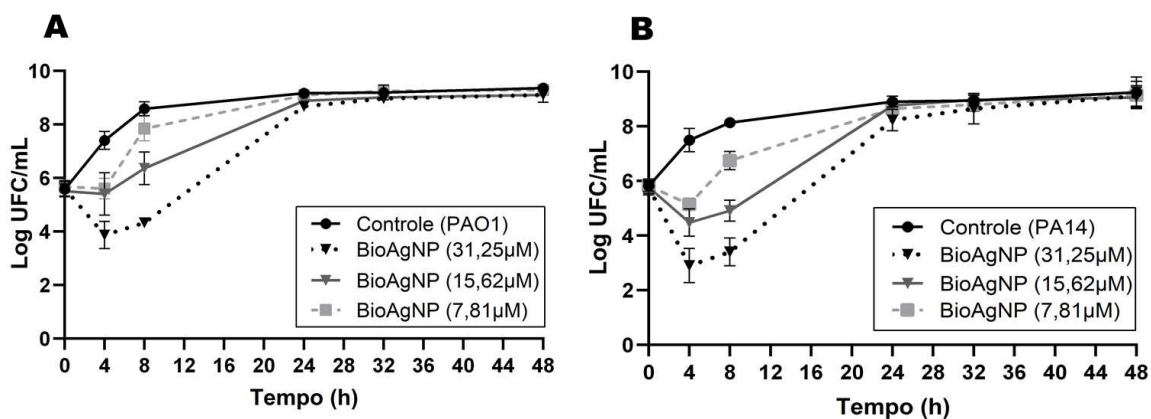


Figura 1 - Curva de crescimento de *P. aeruginosa* PAO1 (A) e PA14 (B) em concentrações subinibitórias de bio-AgNP. As bactérias em concentrações a 5×10^5 UFC/mL foram expostas a três tratamentos diferentes com bio-AgNP (31,25 μ M; 15,62 μ M e 7,81 μ M). O controle indica crescimento bacteriano sem tratamento com as nanopartículas. Os valores de UFC/mL são a média \pm desvio padrão.

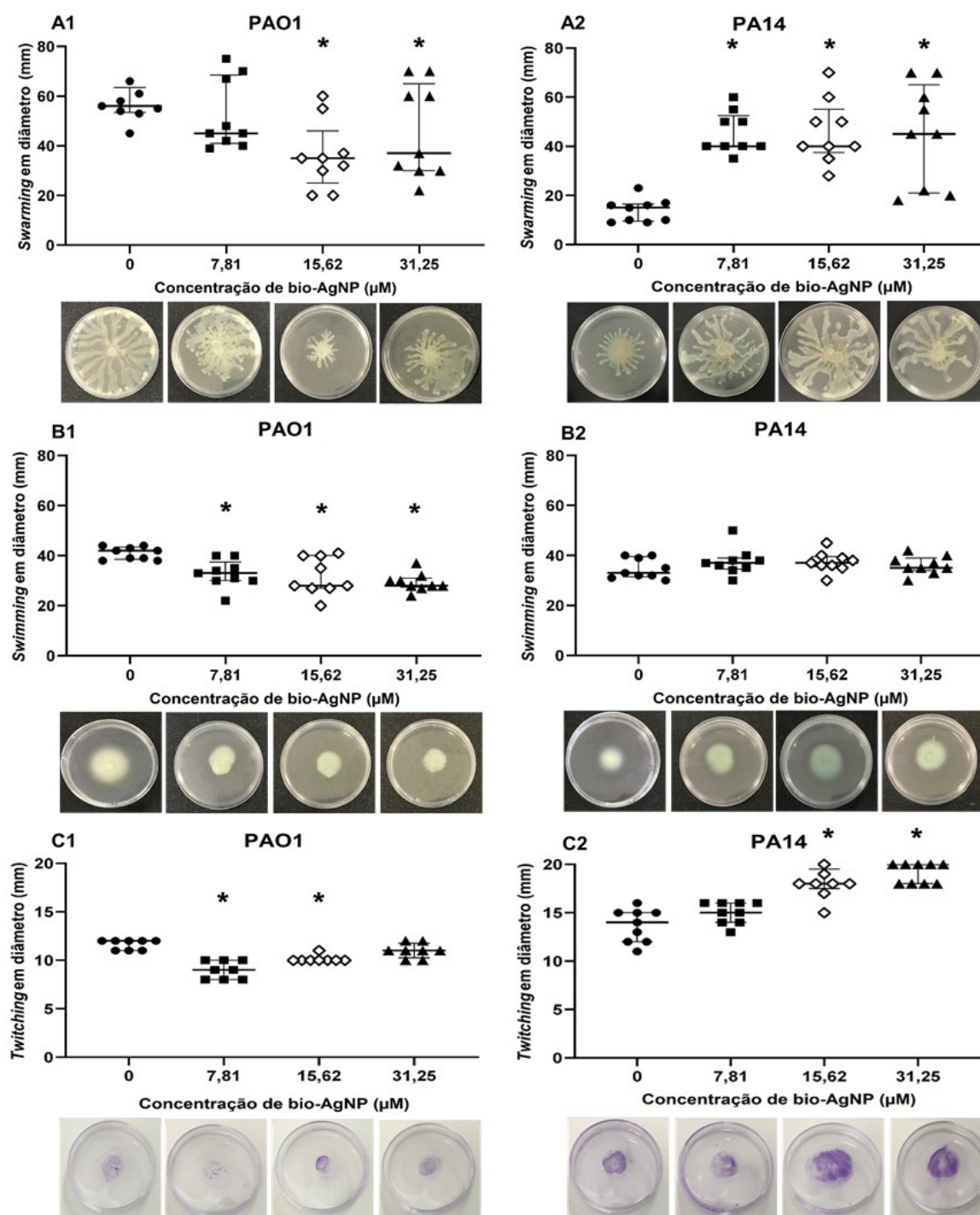


Figura 2 - Efeito das nanopartículas de prata biogênicas na motilidade *swarming*, *swimming* e *twitching* em *P. aeruginosa* PAO1 e PA14. (A1) Motilidade *swarming* em PAO1. (A2) Motilidade *swarming* em PA14. (B1) Motilidade *swimming* em PAO1. (B2) Motilidade *swimming* em PA14. (C1) Motilidade *twitching* em PAO1. (C2) Motilidade *twitching* em PA14. Cada símbolo representa o valor de um tratamento, e a média para cada 3 repetições está indicado pela barra preta. As imagens abaixo do gráfico são fotos representativas das cepas PAO1 e PA14 e tratamentos correspondentes. Os valores (médios) que foram significativamente diferentes comparados com o controle ($p < 0,05$ pelo ANOVA-Tukey) foram apresentados por um asterisco (*).

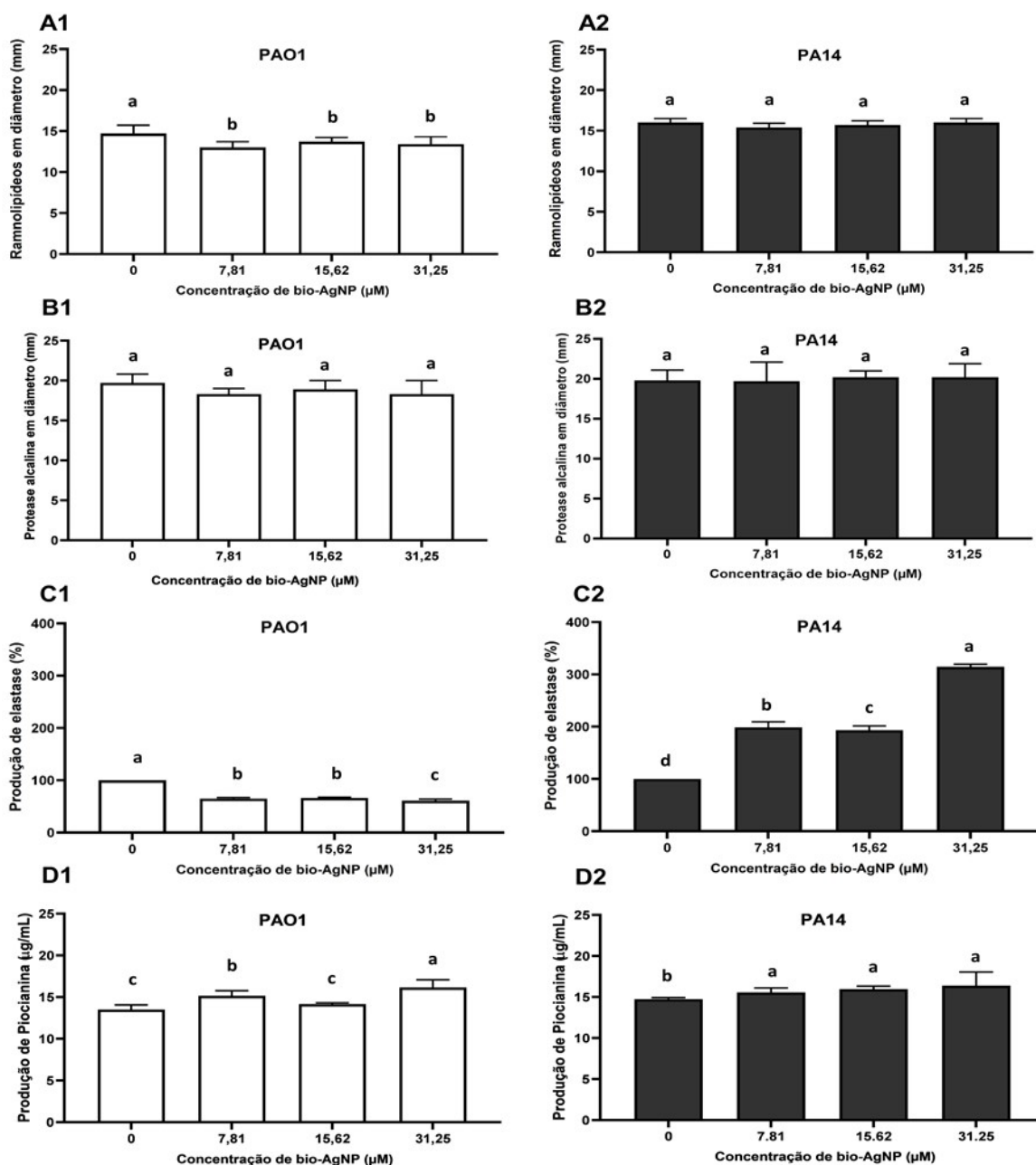


Figura 3 - Efeito das nanopartículas de prata biogênicas nos fatores de virulência de *P. aeruginosa* PAO1 e PA14. (A1) Produção de ramnolipídeos na cepa PAO1, (A2) Produção de ramnolipídeos na cepa PA14, (B1) Produção de protease alcalina em PAO1, (B2) Produção de protease alcalina em PA14, (C1) Produção de elastase em PAO1, (C2) Produção de elastase em PA14, (D1) Produção de píocianina em PAO1 e (D2) Produção de píocianina em PA14. Os resultados foram expressos como \pm desvio padrão ($n = 3$). ^{a-c}Teste de Tukey com diferença significativa $p < 0,05$.

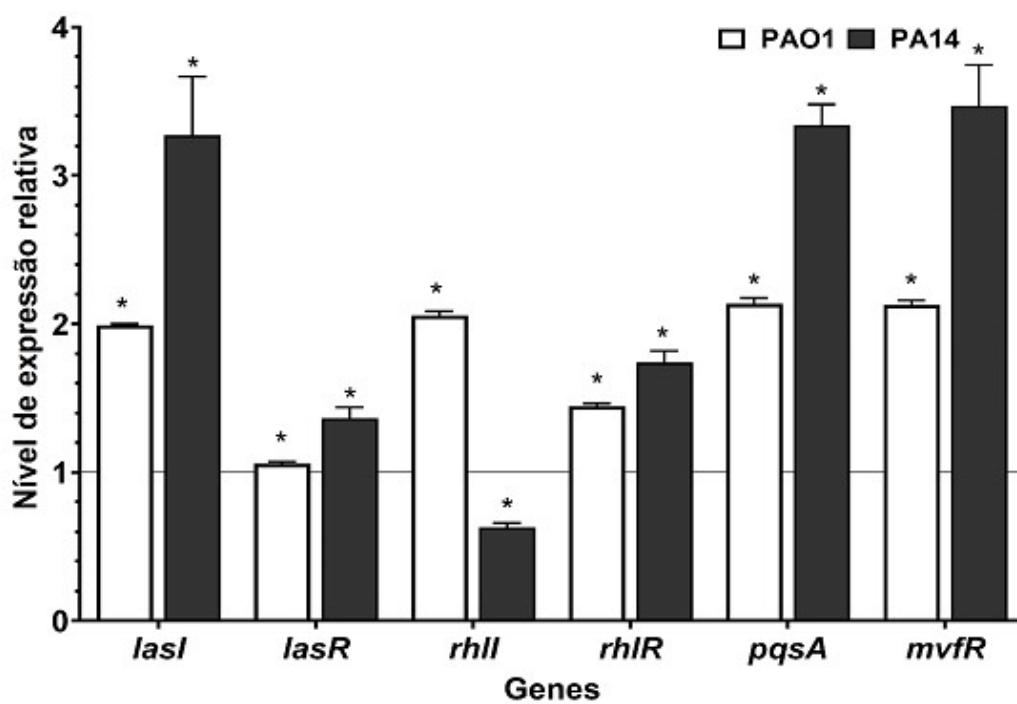


Figura 4 – Expressão relativa dos genes reguladores do Sistema Quorum Sensing após tratamento com nanopartículas de prata biogênica. As quantidades relativas médias dos genes testados foram normalizados para a quantidade relativa média do gene de referência *proC*. * representa $p < 0,05$.

6.CONCLUSÃO

O efeito das concentrações subinibitórias de nanopartículas de prata biogênicas (bio-AgNP) foram analisados em isolados de *P. aeruginosa* obtidos de pacientes clínicos portadores ou não de fibrose cística, isolados obtidos de águas de abastecimento e duas cepas de referência PAO1 e PA14. O estudo com esta diversidade de isolados permitiu concluir que o tratamento com essas concentrações subinibitórias favorece o aumento fenotípico na maioria dos fatores de virulência analisados, especialmente nas motilidades, produção de piocianina e formação de biofilmes.

As cepas de referência PAO1 e PA14 apresentam diferentes respostas (fenotípicas e genotípicas) aos tratamentos com as bio-AgNP, porém em ambas as cepas houve o aumento na expressão dos genes reguladores do sistema *Quorum Sensing* (QS). Este aumento na expressão dos genes reguladores do QS em *P. aeruginosa* causa preocupação, visto que as baixas concentrações de nanopartículas de prata podem ser encontradas no meio ambiente e pode possivelmente favorecer a produção de fatores de virulência que são regulados por este sistema.

Por isso, o uso das bio-AgNP como um possível composto para terapia antibiofilme e antivirulência em *P. aeruginosa* precisa ser avaliado com cautela e baseado em estudos complementares, para que os compostos sejam utilizados de maneira que o sistema QS seja definitivamente interrompido e os fatores de virulência sejam controlados.

APÊNDICE A – ARTIGO ORIGINAL: análise comparativa dos fatores de virulência dos isolados clínicos e ambientais de *Pseudomonas aeruginosa*



<http://journal.unoeste.br/index.php/cv>
DOI: 10.5747/cv.2019.v11.n3.v269
ISSN on-line 1984-6436

Colloquium Vitae

Submetido: 06/08/2019 Revisado: 07/08/2019 Aceito: 20/08/2019

ANÁLISE COMPARATIVA DOS FATORES DE VIRULÊNCIA DOS ISOLADOS CLÍNICOS E AMBIENTAIS DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Isabela Alves de Souza¹, Doroti de Oliveira Garcia², Laís Anversa³, Renata Katsuko Takayama Kobayashi³, Gerson Nakazato³, Erika Kushikawa Saeki¹

¹Instituto Adolfo Lutz, Presidente Prudente, SP. ²Instituto Adolfo Lutz, Marília, SP. ³Instituto Adolfo Lutz, Bauru, SP.

³Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina, PR. e-mail: erika.saeki@ial.sp.gov.br

RESUMO

Pseudomonas aeruginosa possui grande importância para a saúde pública por estar presente no ambiente e nas infecções clínicas. O objetivo deste trabalho foi avaliar fenotipicamente os fatores de virulência motilidade, protease e ramnolipídeos em isolados clínicos e ambientais de *P. aeruginosa*. Vinte e cinco isolados clínicos e dez isolados ambientais foram analisados através de ensaios fenotípicos e categorizados em cepas não móveis, fracamente, moderadamente e altamente móveis; e produtores ou não de protease e ramnolipídeos. Em todos os ensaios, os isolados foram testados em triplicata em três dias diferentes. Os isolados ambientais produziram fatores de virulência como a motilidade (*Swimming* e *Twisting*) e Ramnolipídeos significativamente maior que os isolados clínicos. Este estudo nos alerta para o elevado nível de patogenicidade das cepas de *P. aeruginosa*, principalmente ambientais. A melhor compreensão da motilidade e produção de ramnolipídeos, fatores que estão diretamente associados à formação de biofilmes, pode favorecer estudos complementares às pesquisas visando o controle de bactérias patogênicas.

Palavras-chave: fatores de virulência, fibrose cística, infecções por *Pseudomonas*, patogenicidade.

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE VIRULENCE FACTORS IN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* STRAINS ISOLATED FROM CLINICAL AND ENVIRONMENTAL

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is a very important bacteria for public health because it is present in the environment and clinical infections. The aim of this study was to evaluate the virulence factors such as motility, protease and rhamnolipids in clinical and environmental *P. aeruginosa* isolates. Twenty-five clinical isolates and ten environmental isolates were analyzed by phenotypic assays and categorized into non-mobile, weakly, moderately and highly mobile strains; and producers of protease and rhamnolipids. The isolates were tested in triplicate on three different days. Environmental isolates produced virulence factors such as motility (*Swimming* and *Twisting*), and Rhamnolipids significantly higher than clinical isolates. This study alerts us to the high level of pathogenicity of *P. aeruginosa* strains, mainly environmental strains. For a better understanding of motility and rhamnolipids, virulence factors that are directly associated with the biofilms formation, may favor studies that complement the research aimed at the control of pathogenic bacteria.

Keywords: virulence factors, cystic fibrosis, *Pseudomonas* infections, pathogenicity.

INTRODUÇÃO

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* é um bastonete Gram-negativo, aeróbio, porém capaz de sobreviver e se multiplicar lentamente em ambientes anaeróbios em determinadas situações¹. Apresenta motilidade pela presença

de um ou mais flagelos e, pode ser encontrado isolado ou em grupo^{2,3}. Encontra-se amplamente distribuído, sendo um patógeno oportunista de fungos, helmintos, plantas, animais e humanos, com preferência por ambientes úmidos. Possui elevada resistência a antimicrobianos, grande

Colloq Vitae 2019 set-dez; 11(3): 41-50.

Artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

diversidade genética e capacidade de formar biofilmes^{4,7}.

Esta bactéria está frequentemente associada a infecções em pacientes imunocomprometidos, queimados, com fibrose cística, infecções gastrointestinais, do trato urinário e otites; mas também pode ser isolado em indivíduos saudáveis^{1,8}.

P. aeruginosa tem representatividade em média de 75% de isolados de amostras clínicas⁹. Apesar de ser um agente de contaminação comumente encontrado em ambientes hospitalares, sua presença em ambientes aquáticos também é preocupante¹⁰, devido à sua capacidade de formação de biofilmes.

No Brasil, esta bactéria pode ser considerada uma boa indicadora de contaminação de águas de abastecimento^{2,10}. Frequentemente isolada em águas superficiais como lagos e rios, possui preferência por águas residuárias devido à alta carga de nutrientes, porém pode sobreviver e se proliferar em ambientes com quantidades mínimas de nutrientes, como em água mineral^{1,2}. Muitos estudos atribuem um papel importante da água a colonização em humanos por *P. aeruginosa*, principalmente quando associada à presença de bactérias contendo múltiplos fatores de virulência¹⁰.

Há uma intensa variabilidade de fatores de virulência em *P. aeruginosa*, oscilando de moderadamente a altamente virulentos, sendo seu potencial patogênico multifatorial, dependente da cepa, sítio de infecção, tanto em infecções adquiridas na comunidade como nas adquiridas em ambiente hospitalar^{3,9}. Foi constatado que *P. aeruginosa* é capaz de acumular diferentes fatores de resistência e virulência, além de formar rotas de disseminação de genes relativos aos mesmos, dificultando o tratamento de infecções^{6,10}.

Entre os fatores de virulência fundamentais para promover a patogenicidade da bactéria, destacam-se a motilidade, protease e ramnolipídeos^{3-6,9-12}. A motilidade é dependente dos flagelos ou pili tipo IV, sendo importante para a proliferação bacteriana. As formas de movimentação mais comuns são *Swarming*, *Swimming* e *Twitching*^{5,12}. A protease alcalina é secretada para auxiliar o patógeno durante a infecção^{3-6,9} e os ramnolipídeos estão envolvidos com o desenvolvimento de biofilmes, atividade antibacteriana e antifúngica e inibição da resposta fagocitária¹¹.

Pseudomonas aeruginosa possui grande importância para a saúde pública, sendo classificada como prioridade 1 (crítico) dentre as três prioridades listadas pela Organização Mundial de Saúde na pesquisa de novos antimicrobianos¹³. Contudo, trabalhos que correlacionem os fatores de virulência em isolados clínicos e ambientais ainda são raros. Assim, é observada a necessidade de conhecer o potencial patogênico dos isolados de *P. aeruginosa* tanto em áreas de assistência à saúde como no meio ambiente a fim de realizar uma comparação e formular mecanismos efetivos de vigilância e combate a sua disseminação.

O objetivo deste trabalho foi avaliar fenotipicamente os fatores de virulência como a motilidade, protease e ramnolipídeos em isolados clínicos e ambientais de *Pseudomonas aeruginosa* e comparar estatisticamente a prevalência dos fatores de virulência estudados por fonte de isolamento: clínica ou ambiental.

METODOLOGIA

Foram analisados vinte e cinco isolados clínicos oriundos de pacientes com fibrose cística e dez isolados ambientais de *Pseudomonas aeruginosa* obtidos de água de abastecimento público, provenientes do Núcleo de Coleção de Culturas do Instituto Adolfo Lutz e Centro de Laboratório Regional Instituto Adolfo Lutz de Bauru, respectivamente.

O estudo foi realizado nos Laboratórios de Microbiologia Alimentar e Bacteriologia do Centro de Laboratório Regional Instituto Adolfo Lutz de Presidente Prudente (SP) entre julho e novembro de 2018.

Este trabalho possui aprovação pelo Comitê Técnico Científico do Instituto Adolfo Lutz (CTC 31-J/2017).

Método em placa - motilidade *Swarming*

Os isolados testados foram inoculados em Caldo Luria Bertani (LB) e incubados a 37°C por 24 h. Em seguida, inoculou-se 10 µL de suspensão de *P. aeruginosa* no centro do Agar *Swarming* (glicose 1%, peptona 0,5%, extrato de levedura 0,2% e ágar 0,5%), previamente mantidos em temperatura ambiente. A zona de motilidade foi medida após incubação a 30°C por 24 h. O ensaio de motilidade foi realizado em triplicata em dias diferentes. As médias foram calculadas conforme Abdouchakour et al.¹⁴ e classificadas em: não móvel ou fracamente

móveis: $d < 20\text{mm}$; moderadamente móveis: $20\text{mm} \leq d < 40\text{mm}$; e altamente móveis: $d \geq 40\text{mm}$.

Método em placa - motilidade *Swimming*

Os isolados foram semeados em Agar LB e incubados a 37°C por 24 h. Foram inoculados em superfície do Agar Swimming (triptona 1%, cloreto de sódio 0,5%, ágar 0,3%), previamente mantidos em temperatura ambiente. A área de motilidade foi medida após incubação a 30°C durante 24 h. O ensaio de motilidade foi realizado em triplicata em dias diferentes. As médias foram calculadas para a categorização conforme Abdouchakour et al.¹⁴ em: não móvel ou fracamente móveis $d < 20\text{mm}$, moderadamente móveis: $20\text{mm} \leq d < 40\text{mm}$; e altamente móveis: $d \geq 40\text{mm}$.

Método em placa – motilidade *Twitching*

Os isolados foram semeados em Agar LB e incubados a 37°C por 24 h. Uma colônia de cada cepa foi perfurada em Agar Twitching (triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, cloreto de sódio 1% e ágar 1%) até o fundo da placa e incubada a 37°C por 24 h. Posteriormente, o Agar foi cuidadosamente removido e a zona de motilidade foi medida em milímetros após coloração com violeta de cristal 2% por 2 h. O ensaio de motilidade foi realizado em triplicata em dias diferentes. As médias foram calculadas para a categorização conforme Wolska e Kot¹⁵ em: não móveis: $d < 7\text{mm}$; fracamente móveis: d 7-15mm; moderadamente móveis: d 15-25mm; e altamente móveis: $d > 25\text{mm}$.

Método em placa - protease alcalina

Os isolados foram inoculados em Caldo LB e incubados a 37°C por 24 h. A atividade proteolítica foi confirmada pela formação de uma zona clara em torno do inoculo ($10\ \mu\text{L}$ em poço) em Agar Leite (leite em pó 1%, peptona 0,1%, cloreto de sódio 0,5%, ágar 2%) e quantificada através do diâmetro do halo após incubação a 37°C por 24 h.

Método em placa – ramnolipídeos

Inoculou-se a bactéria a ser testada em Caldo LB e incubou-se a 37°C por 24 h. A partir do

crescimento de *P. aeruginosa* foi inoculado $10\ \mu\text{L}$ em poço na placa com Agar CTAB modificado, de acordo com Siegmund e Wagner¹⁶, e incubado a 37°C por 48 h. A produção de ramnolipídios foi confirmada pela formação de um halo de coloração azul ao redor da colônia e o diâmetro do halo foi mensurado.

Análise dos dados

As variáveis foram comparadas utilizando o teste T Student (dados com distribuição normal) ou teste de Mann-Whitney (dados com distribuição não normal). O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. O Software R (3.4.2) foi utilizado para representações gráficas e análise estatística.

RESULTADOS

Neste estudo foram analisados cinco fatores de virulência em *P. aeruginosa*: três de superfície (motilidades *Swarming*, *Swimming* e *Twitching*) e dois exoprodutos (Protease alcalina e Ramnolipídeos) em isolados clínicos e ambientais.

Os resultados da motilidade foram interpretados usando medidas de diâmetro em milímetros (Figura 1), seguida de categorização (Tabela 1), mostrando diversidade no comportamento de motilidade entre os grupos clínico e ambiental.

Conforme a Tabela 1, a motilidade *Swarming* dos isolados clínicos variou de 8 mm a 75 mm, com média de 17 ± 18 mm. Quatro cepas foram classificadas como moderadamente móveis (4/25; 16%) e duas como altamente móveis (2/25; 8%). Entretanto, como a maior parte dos isolados apresentaram deslocamento menor que 20 mm na placa de Petri e foram consideradas não móveis (19/25; 76%) (Tabela 2). As cepas ambientais variaram de 9 a 62 mm e média de 17 ± 16 mm (Tabela 1). Uma cepa foi classificada como altamente móvel (1/10; 10%), e o restante não móvel (9/10; 90%) (Tabela 3). Não houve diferença estatística significativa na motilidade *Swarming* entre os isolados clínicos e ambientais ($p = 0,14$) (Figura 2).

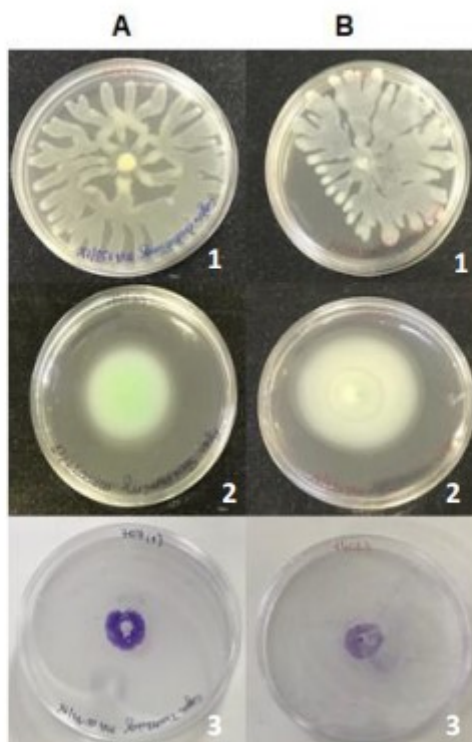


Figura 1. Ensaio fenotípico da motilidade. A1 – *Swarming* em isolado clínico, B1 – *Swarming* em isolado ambiental, A2 – *Swimming* em isolado clínico, B2 – *Swimming* em isolado ambiental, A3 – *Twitching* em isolado clínico, B3 – *Twitching* em isolado ambiental.

Tabela 1. Características dos isolados clínicos e ambientais de *P. aeruginosa* estudados: média e desvio padrão ($\bar{x} \pm DP$) e classificação das atividades (mm) *Swarming*, *Swimming*, *Twitching*, Protease e Ramnolipídeos.

Identificação	Origem	<i>Swarming</i> $\bar{x} \pm DP$	C ¹	<i>Swimming</i> $\bar{x} \pm DP$	C ²	<i>Twitching</i> $\bar{x} \pm DP$	C ³	Protease $\bar{x} \pm DP$	Ramnolipídeos $\bar{x} \pm DP$
IAL 6594	Clínica	9 ± 2	NM	10 ± 2	NM	8 ± 2	FM	19 ± 2	9 ± 1
IAL 6665	Clínica	9 ± 1	NM	17 ± 2	NM	9 ± 1	FM	12 ± 5	8 ± 1
IAL 6590	Clínica	12 ± 2	NM	23 ± 3	MM	11 ± 2	FM	18 ± 2	11 ± 1
IAL 6589	Clínica	11 ± 1	NM	14 ± 2	NM	10 ± 1	FM	22 ± 1	11 ± 1
IAL 6592	Clínica	9 ± 1	NM	10 ± 1	NM	3 ± 2	NM	15 ± 1	0
IAL 6591	Clínica	11 ± 2	NM	0	NM	6 ± 1	NM	0	0
IAL 6574	Clínica	8 ± 1	NM	17 ± 3	NM	7 ± 2	FM	0	0
IAL 6584	Clínica	9 ± 1	NM	11 ± 3	NM	9 ± 2	FM	21 ± 4	0
IAL 6598	Clínica	10 ± 2	NM	10 ± 1	NM	10 ± 1	FM	10 ± 1	0
IAL 6600	Clínica	9 ± 1	NM	0	NM	7 ± 1	FM	11 ± 1	0
IAL 6601	Clínica	10 ± 2	NM	0	NM	13 ± 2	FM	19 ± 2	0
IAL 6577	Clínica	12 ± 3	NM	20 ± 3	MM	8 ± 1	FM	18 ± 2	14 ± 2
IAL 6688	Clínica	13 ± 2	NM	27 ± 1	MM	18 ± 1	MM	21 ± 2	12 ± 1
IAL 6582	Clínica	21 ± 3	MM	36 ± 2	MM	13 ± 1	FM	21 ± 2	14 ± 1
IAL 6596	Clínica	21 ± 3	MM	44 ± 3	AM	18 ± 1	MM	31 ± 3	16 ± 1
IAL 6603	Clínica	9 ± 1	NM	13 ± 2	NM	8 ± 1	FM	9 ± 2	0
IAL 6575	Clínica	8	NM	0	NM	10 ± 1	FM	18 ± 2	12 ± 1
IAL 6576	Clínica	9 ± 1	NM	39 ± 4	MM	5 ± 2	NM	15 ± 1	8 ± 2

IAL 6587	Clínica	74 ± 7	AM	26 ± 6	MM	7 ± 2	FM	23 ± 3	15 ± 1
IAL 6580	Clínica	75 ± 5	AM	29 ± 4	MM	6 ± 2	NM	21 ± 2	15 ± 1
IAL 6573	Clínica	11 ± 3	NM	43 ± 2	AM	6 ± 1	NM	21 ± 1	15 ± 1
IAL 6581	Clínica	29 ± 2	MM	25 ± 3	MM	6 ± 1	NM	21 ± 1	16 ± 1
762 (1)	Clínica	8 ± 1	NM	32 ± 3	MM	5 ± 1	NM	0	0
IAL 6578	Clínica	22 ± 4	MM	48 ± 2	AM	6 ± 1	NM	21 ± 1	15 ± 1
IAL 6579	Clínica	11 ± 2	NM	30 ± 3	MM	13 ± 1	FM	20 ± 1	13 ± 1
04023	Ambiental	14 ± 3	NM	45 ± 2	AM	15 ± 1	FM	18 ± 2	15 ± 1
14048	Ambiental	11 ± 2	NM	40 ± 2	AM	14 ± 2	FM	22 ± 2	16
14083	Ambiental	12 ± 2	NM	45 ± 3	AM	17 ± 2	MM	22 ± 1	14 ± 2
04015	Ambiental	62 ± 4	AM	52 ± 3	AM	10 ± 1	FM	16 ± 3	14 ± 1
04021	Ambiental	9	NM	44 ± 4	AM	14 ± 1	FM	12 ± 1	15 ± 1
35010	Ambiental	14 ± 1	NM	22 ± 3	MM	13 ± 1	FM	18 ± 1	0
04064	Ambiental	12 ± 4	NM	44 ± 3	AM	16 ± 1	MM	19 ± 3	17 ± 1
04024	Ambiental	11 ± 1	NM	36 ± 2	MM	15 ± 1	FM	14 ± 2	15 ± 1
14063	Ambiental	13 ± 2	NM	25 ± 2	MM	10 ± 1	FM	13 ± 1	12 ± 2
04010	Ambiental	12 ± 2	NM	46 ± 2	AM	17 ± 1	MM	18 ± 1	15 ± 2

C¹: Classificação; NM: não móvel/fracamente móvel; MM: moderadamente móvel; AM: altamente móvel.

C²: Classificação; NM: não móvel/fracamente móvel; MM: moderadamente móvel; AM: altamente móvel.

C³: Classificação; NM: não móvel; FM: fracamente móvel; MM: moderadamente móvel; AM: altamente móvel.

Tabela 2. Porcentagem (%) das atividades (mm) das motilidades *Swarming*, *Swimming* e *Twitching* em isolados clínicos.

Tipo de motilidade	Classificação			
	não móvel	fracamente	moderado	muito móvel
<i>Swarming</i>	19 (76%)	-	4 (16%)	2 (8%)
<i>Swimming</i>	12 (48%)	-	10 (40%)	3 (12%)
<i>Twitching</i>	8 (32%)	15 (60%)	2 (8%)	0

Tabela 3. Porcentagem (%) das atividades (mm) das motilidades *Swarming*, *Swimming* e *Twitching* em isolados ambientais.

Tipo de motilidade	Classificação			
	não móvel	fracamente	moderado	muito móvel
<i>Swarming</i>	9 (90%)	-	0	1 (10%)
<i>Swimming</i>	0	-	3 (30%)	7 (70%)
<i>Twitching</i>	0	8 (80%)	2 (20%)	0

A maior parte dos isolados clínicos apresentou-se não móvel/fracamente móvel para motilidade *Swimming* (12/25; 48%) (Tabela 2). Nos isolados ambientais, todos apresentaram motilidade *Swimming* de 22 a 52 mm com média de 40±10 mm, a maioria classificada como altamente móvel (7/10; 70%), o restante (3/10; 30%) moderadamente móvel (Tabela 3). Houve diferença estatística significativa quanto à motilidade *Swimming* nos dois grupos estudados ($p < 0,05$) (Figura 2).

A atividade da motilidade *Twitching* dos 25 isolados clínicos de *P. aeruginosa* variou de 3 a 18 mm com média de 9±4 mm (Tabela 1). A maior parte das cepas clínicas apresentou-se fracamente móvel (15/25; 60%) (Tabela 2). Os 10 isolados ambientais variaram de 10 a 17 mm e média de 14±2 mm, onde a maior parte das cepas ambientais também se apresentou fracamente móvel (8/10; 80%) (Tabela 3). De acordo com a Figura 2, os isolados ambientais produziram significativamente maior motilidade *Twitching* do que os isolados clínicos ($p < 0,05$).

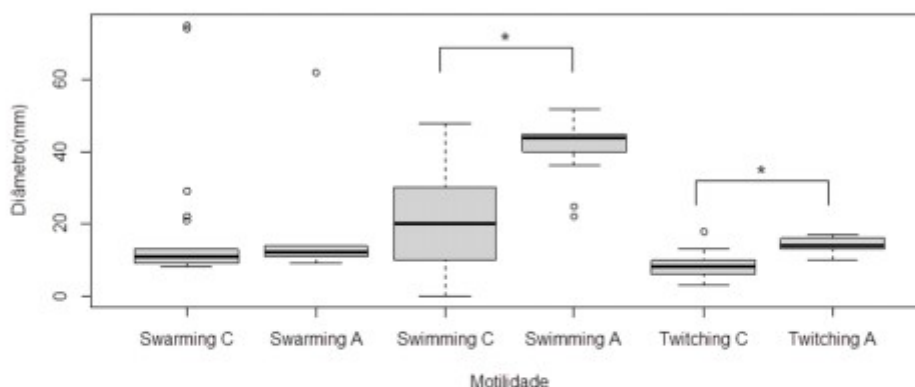


Figura 2. Gráfico Boxplot dos resultados de motilidade *Swarming*, *Swimming* e *Twitching* dos isolados clínicos e ambientais. As diferenças significativas estão indicadas com * ($p < 0,05$). C: isolados clínicos; A: isolados ambientais.

Neste estudo, 12% (3/25) das cepas clínicas e 10% (1/10) das cepas ambientais apresentaram as duas motilidades *Twitching* e *Swarming*.

Quanto à produção de protease alcalina, houve produção em 22 dos 25 isolados clínicos avaliados (88%), obtendo média de 16 ± 8 mm (Tabela 1). Entre os isolados ambientais houve síntese de protease alcalina em todos os isolados analisados, apresentando média de 17 ± 3 mm. Não houve diferença estatística significativa na

atividade proteolítica comparando-se os isolados clínicos e ambientais ($p = 0,84$) (Figura 3).

A respeito dos ramnolipídeos, houve síntese em 16 dos 25 isolados clínicos avaliados (64%), apresentando média de 8 ± 7 mm (Tabela 1). Entre as cepas ambientais, 9 das 10 pesquisadas produziram ramnolipídeos (90%) e média de 13 ± 5 mm. Houve diferença estatística significativa na síntese de ramnolipídeos nos dois grupos estudados ($p < 0,05$) (Figura 3).

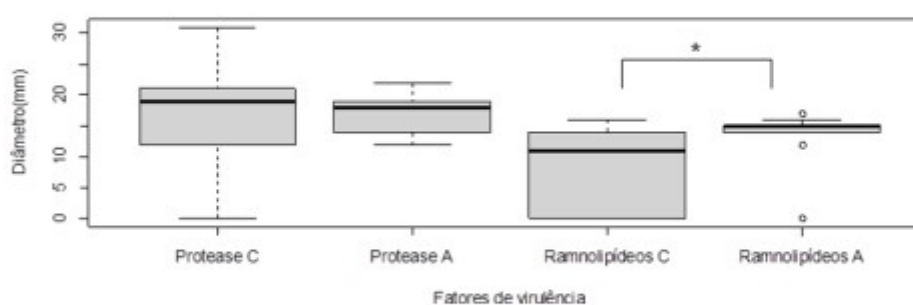


Figura 3. Gráfico Boxplot dos resultados de Protease e Ramnolipídeos dos isolados clínicos e ambientais. As diferenças significativas estão indicadas com * ($p < 0,05$). C: isolados clínicos; A: isolados ambientais.

DISCUSSÃO

Encontra-se bem documentado a importância da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* para a saúde pública, por sua capacidade infecciosa, colonização de diversas superfícies bióticas e abióticas e crescente resistência antimicrobiana, tornando-se essencial entender sua patogênese. Alguns estudos têm associado os isolados obtidos do ambiente, principalmente de água encanada, com cepas infecciosas^{10,14,17-18}.

Grande parte das cepas de *P. aeruginosa* produzem fatores de virulência que atuam na superfície (que permite fixação bacteriana, colonização e invasão) associada a outros fatores de virulência como hemolisina, elastase, protease. A combinação destes fatores é determinante para o estabelecimento de uma infecção¹⁹.

Entre os tipos de motilidade bacteriana, Macin et al.²⁰ observaram que a motilidade *Swarming* de isolados de *P. aeruginosa* obtidos de pacientes com fibrose cística foi de 84%, um resultado menor do que a detectada em pacientes sem a doença (97%), com indicação que a pressão contínua e seletiva no ambiente pode levar a algumas mudanças fenotípicas nas bactérias para ajudar a sua adaptação ao hospedeiro, não necessariamente permanentemente ligado as suas estruturas móveis (flagelo e pili tipo IV).

Entre as cepas ambientais, a ausência de motilidade *Swarming* também foi predominante, entretanto outros estudos encontraram a maioria dos isolados ambientais com motilidade *Swarming* moderada ou alta, variando de 25 a 80 mm^{14,18}.

Os dois grupos, clínico e ambiental, demonstraram habilidades semelhantes para exibir a motilidade *Swarming*, que é mediada pelos flagelos em colaboração com os pili do tipo IV. Apesar de a motilidade ser necessária no desenvolvimento do biofilme, isolados que exibem pouca ou nenhuma motilidade *Swarming* são mais propensos a terem sucesso em sua formação, pois se fixam mais eficientemente em sua estrutura que compõe o biofilme¹¹.

Quanto à motilidade *Swimming*, os isolados ambientais deste estudo se destacaram, pois apresentaram diâmetros maiores que isolados ambientais encontrados em outros autores^{10,14}.

Para motilidade *Twitching*, houve divergência de nosso estudo com outros

publicados, tanto entre as cepas clínicas como nas ambientais, os dois grupos demonstrando moderada e alta atividade na literatura¹⁰.

A fraca motilidade dos isolados clínicos pode ser explicada pela correlação entre a atividade da motilidade *Twitching*, a formação de biofilmes e a fonte de isolamento das cepas¹⁵, já que cepas não móveis, como as de pacientes com fibrose cística, são dificilmente fagocitadas, despistando o sistema imune. Apesar de esta estratégia afetar a capacidade em causar infecções, favorece a persistência no hospedeiro²⁰.

É estabelecido que cada um dos três sistemas de motilidade funciona de forma independente e parece não estar relacionado com outros caracteres bacterianos, apesar de ser importante ressaltar que a motilidade *Swarming* não depende exclusivamente do pili IV, mas também do flagelo^{14,18}.

A alta motilidade *Twitching*, por exemplo, leva à redução da formação de biofilme por *P. aeruginosa*, enquanto a motilidade *Swarming* é necessária para o desenvolvimento de suas estruturas, mas dispensável em sua permanência no hospedeiro. Isto é, a bactéria adapta sua atividade móvel conforme a sua necessidade no hospedeiro, seja para estabelecer a infecção, formar biofilme ou garantir sua permanência no organismo, independentemente de sua origem, clínica ou ambiental, o que pode explicar a falta de diferenças significativas em algumas características adaptativas, como formação de biofilme, motilidade e resistência^{14,21}.

Quanto à protease alcalina, assim como neste estudo, outros estudos apresenta atividade proteolítica nos isolados clínicos e ambientais^{9,20,22}. A protease alcalina exerce um papel importante na virulência durante a colonização, contribuindo para o desmoronamento das barreiras físicas do hospedeiro e aumentando a proliferação bacteriana, fornecendo aminoácidos e peptídeos das proteínas teciduais às bactérias. Em estágios mais avançados, pode interferir com o mecanismo de defesa imune por degradar imunoglobulinas²³.

A atuação de surfactantes, como os ramnolipídeos, é relatada como agente indutor de expansão da motilidade *Swarming*²⁴. No presente estudo esta relação foi concordante nos isolados clínicos, já que as cepas que não produzem ramnolipídeos apresentaram

motilidade *Swarming* sem atividade. Os isolados ambientais apresentaram fenótipos de *Swarming* e ramnolipídeos diversos, sem associação considerável entre si.

Os ramnolipídeos estão envolvidos na formação de biofilmes. Eles são responsáveis por induzirem a liberação de lipopolissacarídeos, aumentando a hidrofobicidade da superfície celular, sendo um regulador ambiental quando ocorrem mudanças nas condições nutricionais e favorecem a adesão primária de células planctônicas. Funciona também como um “escudo” contra células polimorfonucleadas, contribuindo para a fixação da bactéria no hospedeiro¹¹.

P. aeruginosa possui preferência por ambientes úmidos, portanto deve-se dar atenção especial à pias, banheiras e chuveiros⁷. Sua ocorrência em águas de abastecimento indica deficiência no controle da rede de distribuição de água e pode ser indicativo de disseminação de microrganismos de origem nosocomial no ambiente aquático²⁵, ocasionando em fonte possível de infecção por *P. aeruginosa*, principalmente em ambientes onde circulam pessoas imunocomprometidas, como hospitais¹⁵.

Conclui-se que as análises fenotípicas realizadas revelaram grande variabilidade dos fatores de virulência entre os isolados estudados, o que nos alerta para o elevado nível de patogenicidade das cepas, principalmente as ambientais.

Os isolados presentes no ambiente, como em águas de abastecimento público, pode oferecer risco patogênico, principalmente para os imunocomprometidos, já que apresentaram fatores de virulência importantes como motilidade (*Swimming* e *Twitching*) e ramnolipídeos com resultados muitas vezes maiores que os isolados clínicos. A produção exacerbada destes fenótipos representa um potencial de colonização e infecção no hospedeiro, garantindo a rápida disseminação e capacidade inflamatória.

Por isso, o estudo da produção de protease, ramnolipídeos e motilidade em *Pseudomonas aeruginosa* é de extrema importância para a compreensão dos fatores de virulência e seus mecanismos envolvidos em sua patogenicidade. Os tipos de motilidades identificados, fatores que estão diretamente associados à formação de biofilmes podem ser responsáveis por estudos complementares às

pesquisas visando o controle de bactérias patogênicas.

AGRADECIMENTOS

As pesquisadoras Dra. Doroti de Oliveira Garcia do Centro de Laboratório Regional (CLR) Instituto Adolfo Lutz de Marília e a Me. Laís Anversa do CLR Instituto Adolfo Lutz de Bauru por terem gentilmente cedido os isolados utilizados neste trabalho e a todos os profissionais do Laboratório do Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas do CLR Instituto Adolfo Lutz de Presidente Prudente pelo apoio e auxílio na execução do mesmo.

CONFLITO DE INTERESSES

As autoras declaram não haver qualquer potencial conflito de interesse que possa interferir na imparcialidade deste trabalho científico.

REFERÊNCIAS

1. Arruda KLS. Resistência das *Pseudomonas* à Ciprofloxacina e sua relação com a saúde ambiental. [Monografia] Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2013.
2. Dos Santos G, Colombo TE. Prevalência de *Pseudomonas aeruginosa* em águas e superfície. J Health Sci Instit. 2015;33(4):314-8.
3. Tana FL. Avaliação da expressão e do papel dos microRNAs mmu-miR-155-5p e mmu-miR-146b-5p durante a infecção pulmonar causada pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa*. [Dissertação] Alfenas: Universidade Federal de Alfenas, 2017.
4. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick & Adelberg. 26.ed. Porto Alegre: AMGH; 2014.
5. Burrows LL. *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility: type IV pili in action. Ann Rev Microbiol. 2012;66:493-520. DOI: <https://dx.doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150055>
6. Jácome PRLA, Alves LR, Cabral AB, Lopes ACS, Maciel MAV. Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance and virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Recife, state of Pernambuco, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2012;45(6):707-

12. DOI: <https://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822012000600010>
7. Bernardi PM. Avaliação por microdiálise da penetração pulmonar da Tobramicina em modelo de pneumonia por microrganismo formador de biofilme. [Dissertação] Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2016.
8. Pariguana REC, Montoya RC. Bacteriocinas producidas por *Pseudomonas aeruginosa* y su acción inhibitoria frente a *Helicobacter pylori*. [Monografía] Cusco: Universidad Nacional de San Antonio Abad Del Cusco, 2012.
9. Silva ST. Análise fenotípica e genética de fatores de virulência de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* multidroga-sensível e multidroga-resistente de Recife – PE. [Dissertação] Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2016.
10. Magalhães MJTL. Caracterização fenotípica e similaridade genética de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de efluentes hospitalares e água superficial do igarapé do Mindu/Manaus – AM. [Dissertação] Manaus: Universidade Federal do Amazonas, 2013.
11. Abdel-Mawgoud AM, Lépine F, Déziel E. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010;86(5):1323-36. DOI: <https://dx.doi.org/10.1007/s00253-010-2498-2>
12. Al-Haidari RA, Shaaban MI, Ibrahim SRM, Mohamed GA. Anti-quorum sensing activity of some medicinal plants. *African J Traditional, Complem Altern Med*. 2016;13(5):67-71. DOI: <https://dx.doi.org/10.21010/ajtcam.v13i5.10>
13. World Health Organization. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. Geneva: World Health Organization, 2017.
14. Abdouchakour F, Aujoulat F, Licznar-Fajardo P, Marchandin H, Toubiana M, Parer S et al. Intracloonal variations of resistance and phenotype in *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clone ST308: A key to success within a hospital? *Int J Med Microbiol*. 2018;308(2):279-89. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.11.008>
15. Wolska K, Kot B. Twitching motility activity, biofilm formation, and genetic typing for clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* by random amplified DNA PCR. *Acta Microbiol Immunol Hungarica*. 2013;60(3):313-28. DOI: <https://dx.doi.org/10.1556/AMicr.60.2013.3.7>
16. Siegmund I, Wagner F. New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar. *Biotechnol Lett*. 1991;5(4):265-8.
17. Chaves MA. Perfil de suscetibilidade em bastonetes gram negativos não fermentadores isolados de amostra de água superficial submetida a tratamento com antimicrobiano. [Dissertação] Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2017.
18. Otton LM, Silva Campos M, Meneghetti KL, Corção G. Influence of twitching and swarming motilities on biofilm formation in *Pseudomonas* strains. *Arch Microbiol*. 2017;199(5):677-82. DOI: <https://dx.doi.org/10.1007/s00203-017-1344-7>
19. Santos SO. Estudo de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. multiresistentes do Hospital Universitário de Santa Maria. [Dissertação] Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2014.
20. Macin S, Akarca M, Sener B, Akyon Y. Comparison of virulence factors and antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with and without cystic fibrosis. *Rev Romana Med Laborator*. 2017;25(4):327-34. DOI: <https://dx.doi.org/10.1515/rrlm-2017-0027>
21. Wu H, Lee B, Yang L, Wang H, Givskov M, Molin S et al. Effects of ginseng on *Pseudomonas aeruginosa* motility and biofilm formation. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2011;62(1):49-56. DOI: <https://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695X.2011.00787>
22. Ciragil P, Soyletir G. Alginate, elastase and alkaline protease production of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from various body sites. *Mikrobiyoloji Bulteni*. 2004;38(4):341-7.
23. Stehling EG. Estudo comparativo dos fatores de virulência de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de fibrose cística e outras infecções.

[Dissertação] Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 1999.

24. Kearns DB. A field guide to bacterial swarming motility. *Nature Rev Microbiol.* 2010;8(9):634. DOI: <https://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2405>

25. Peresi JTM, Almeida IAZC, Teixeira ISC, Silva SIL, Alves EC, Marques DF et al. *Pseudomonas aeruginosa*: ocorrência e suscetibilidade aos agentes antimicrobianos de isolados de amostras de água tratada utilizada em solução de diálise. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 2011;70(4):542-7.

APÊNDICE B – ARTIGO ORIGINAL: Pesquisa fenotípica dos fatores de virulência em *Pseudomonas aeruginosa* isolados de água de abastecimento público



SCIENTIA PLENA
www.scientiaplenu.org.br

VOL. 16, NUM. 6

2020

doi: 10.14808/sci.plena.2020.067202

Pesquisa fenotípica dos fatores de virulência em *Pseudomonas aeruginosa* isolados de água de abastecimento público

Phenotypic research of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from public water supply

E. K. Saeki^{1*}; A. Y. Yamada¹; I. A. de Souza¹; L. A. de Araujo¹; L. Anversa²; R. K. T. Kobayashi³; G. Nakazato³

¹Centro de Laboratório Regional, Instituto Adolfo Lutz, 19013-050, Presidente Prudente-SP, Brasil

²Centro de Laboratório Regional, Instituto Adolfo Lutz, 17015-110, Bauru-SP, Brasil

³Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada/Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, 86057-970, Londrina-PR, Brasil

*erika.saeki@ial.sp.gov.br

(Recebido em 07 de maio de 2020; aceito em 05 de junho de 2020)

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* está amplamente distribuída no ambiente. A pouca exigência nutricional deste microrganismo possibilita sua sobrevivência em água de abastecimento público, cuja importância para a saúde pública deve-se principalmente ao fato de causar infecções em indivíduos imunocomprometidos. O objetivo deste trabalho foi avaliar fenotipicamente os fatores de virulência de *P. aeruginosa* obtidos de água de abastecimento público. Um total de 19 isolados de *P. aeruginosa* foram analisados para determinação das motilidades (*swarming*, *swimming* e *twitching*), e avaliação da produção de protease alcalina, ramnolipídeos e DNase. Os experimentos foram realizados em triplicata em três ocasiões distintas. Para realizar a representação gráfica e a análise estatística foi utilizado o Software R Studio (1.2.5001). Todos os isolados foram produtores de protease alcalina com halo de proteólise acima de 8 mm. A atividade da DNase e a produção de ramnolipídeos foram observadas em 21,1% (n=4) e 84,2% (n=16), respectivamente. Os resultados mostraram uma alta diversidade no comportamento de motilidade entre os isolados de *P. aeruginosa*. Ao comparar os três tipos de motilidade, a maioria dos isolados (68,4%) apresentou produção significativa (p<0,05) de motilidade *swimming*. Conclui-se que os isolados de *P. aeruginosa* testados foram capazes de produzir fatores de virulência como motilidade *swimming* e *twitching*, protease e ramnolipídeos.

Palavras-chave: DNases, qualidade da água, motilidade.

The bacterium *Pseudomonas aeruginosa* is widely distributed in the environment. The low nutritional requirement of this microorganism makes it possible to survive in public water supply, whose importance for public health is mainly due to the fact that it causes infections in immunocompromised individuals. The objective of this work was evaluate phenotypically the virulence factors of *P. aeruginosa* obtained from public water supply. A total of 19 *P. aeruginosa* isolates were analyzed to determine motilities (*swarming*, *swimming*, and *twitching*), and to evaluate the production of alkaline protease, rhamnolipids, and DNase. The experiments were carried out in triplicate on three different occasions. The Software R Studio (1.2.5001) was used to perform the graphical representation and the statistical analysis. All isolates were producers of alkaline protease with a proteolysis halo above 8 mm. DNase activity and rhamnolipids production were observed in 21.1% (n = 4) and 84.2% (n = 16), respectively. The results showed a high diversity in motility behavior among *P. aeruginosa* isolates. When comparing the three types of motility, most isolates (68.4%) showed significant production (p<0.05) of swimming motility. The results showed the *P. aeruginosa* isolates tested were able to produce virulence factors such as swimming and twitching motility, protease and rhamnolipids.

Keywords: DNases, water quality, motility.

1. INTRODUÇÃO

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria Gram-negativa amplamente distribuída no ambiente, presente no solo, na água e na matéria orgânica em decomposição. É frequentemente responsável por infecções no trato urinário e respiratório, podendo evoluir para sepsis,

principalmente em portadores de fibrose cística e pacientes imunocomprometidos ou com extensas queimaduras na pele [1, 2]. É o agente mais comum em infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), associada com significativa taxa de morbi-mortalidade devido à capacidade do microrganismo de desenvolver rapidamente resistência a antibióticos, adaptar-se facilmente às mudanças no ambiente, e expressar uma variedade de fatores de virulência, como motilidade, formação de biofilme, síntese de protease alcalina, de ramnolipídeos e de DNases [3].

P. aeruginosa utiliza estruturas de superfície para realização da motilidade, sendo caracterizada por três tipos de movimentos, denominados, *swarming*, *swimming* e *twitching*, expressos de acordo com a viscosidade do meio [4]. As propriedades da superfície a ser colonizada, o arranjo de *pili* na superfície bacteriana, e as condições ambientais como concentração de oxigênio e o fluxo de fluido, são fatores que influenciam essas motilidades [5].

Swarming é a movimentação bacteriana que ocorre através da ação conjunta e organizada de inúmeras bactérias, através de um substrato semi-sólido, dependente de flagelo em colaboração com a *pili* tipo IV [6]. Na motilidade *swimming* são necessárias as mesmas estruturas para locomoção, no entanto, as bactérias movimentam-se individualmente ao longo da superfície de uma camada aquosa [7]. Na motilidade *twitching* é utilizada somente a *pili* tipo IV para o deslocamento, que ocorre através de movimentos repetitivos de retração e extensão em uma superfície sólida [6].

Com a expressão dos diferentes tipos de motilidade, a bactéria é capaz de formar biofilmes que possibilitam a persistência do microrganismo em sistemas de abastecimento de água por longos períodos [8]. As saídas de água, como as torneiras, são possíveis reservatórios desses biofilmes, e sua presença no ambiente hospitalar merece atenção [9].

A protease alcalina tem papel importante na fuga fagocitária e é capaz de degradar um amplo número de proteínas do hospedeiro, incluindo a fibronectina e a laminina, facilitando no processo de invasão da bactéria [10]. Os ramnolipídeos são biosurfactantes que auxiliam nos estágios iniciais da formação de biofilmes e tem papel na regulação da motilidade [11]. A DNase é outro fator de virulência que auxilia a bactéria na fuga de neutrófilos ligados a captura e eliminação de invasores [12]. Desta forma, bactérias como *P. aeruginosa* produtoras de diversos fatores de virulência podem estar presentes no ambiente, inclusive em sistemas de abastecimento de água [2].

Sabe-se que a qualidade da água afeta direta e indiretamente a saúde das pessoas. A água de abastecimento contaminada por microrganismos pode gerar surtos de doenças como cólera e outras infecções gastrointestinais, às vezes afetando milhares de pessoas e causando muitas mortes, por isso, seu tratamento e distribuição adequados são de fundamental relevância [13]. No Brasil, além de receber o tratamento, a água deve atender ao padrão de potabilidade estabelecido pela Portaria de Consolidação nº 5 de 28 de setembro de 2017, na qual determina a pesquisa de coliformes totais e *Escherichia coli* como indicadores de qualidade microbiológica [14]. No entanto, esta Portaria não expressa valores para *P. aeruginosa* [15]. A presença dessa bactéria em água tratada gera preocupação pelo fato de ser responsável por infecções crônicas em portadores de fibrose cística, o que resultam em prognósticos ruins aos pacientes e mudança de estilo de vida para que evitem exposição a *P. aeruginosa*, além de poder comprometer a saúde de pessoas de outros grupos de risco [16].

Por isso, a avaliação da virulência de *P. aeruginosa* presente em água se faz necessária para obtermos conhecimento sobre a patogenicidade desses microrganismos. O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão fenotípica dos fatores de virulência de *P. aeruginosa* isolados de água de abastecimento público.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Isolados bacterianos e área de estudo

Um total de 19 isolados de *Pseudomonas aeruginosa* foram obtidos de amostras de água dos sistemas de abastecimento público no centro-oeste do estado de São Paulo no ano de 2016 [2]. *P. aeruginosa* foram isolados pela técnica de membrana filtrante em ágar m-PA-C e

identificados pela coloração de Gram, morfologia da colônia, crescimento em ágar cetrimide, catalase positiva, oxidase positiva e não fermentador de glicose.

As culturas de estoque de cada isolado foram mantidas por curto prazo à temperatura ambiente em ágar estoque. Para armazenamento em período mais longo, os isolados foram congelados a -20°C em caldo Luria-Bertani (LB, Neogen) com 20% de glicerol (v/v, Merck).

Os fatores de virulência foram pesquisados no Centro de Laboratório Regional do Instituto Adolfo Lutz de Presidente Prudente-V (CLR-IAL-PP-V) entre os anos de 2018 e 2019. A cepa *P. aeruginosa* PAO1 foi utilizada como padrão de referência, por esta cepa ser caracterizada como produtora de motilidade, protease alcalina e ramnolipídeos.

2.2 Fatores de virulência

Motilidade *swarming*. Um volume de 10 μL de culturas previamente crescidas a 37°C por 24h em caldo LB (Neogen) foram inoculadas no centro do ágar *Swarming* (Glicose 1,0%; Peptona 0,5%; Extrato de levedura 0,2%; Ágar 0,5%). As placas foram incubadas sem inverter a posição a 30°C por 24 h [17]. As médias dos diâmetros (d) das motilidades foram calculadas e categorizadas de acordo com Abdouchakour et al. (2018) [18]: não móvel ou fracamente móvel $d < 20$ mm; moderadamente móvel $20 \text{ mm} \leq d < 40$ mm; e altamente móvel $d \geq 40$ mm.

Motilidade *swimming*. Uma colônia de cada isolado foi inoculada em superfície do ágar *Swimming* (Tryptona 1,0%; NaCl 0,5%; Ágar 0,3%). As placas foram incubadas sem inverter a posição a 30°C por 24 h [19]. As médias dos diâmetros das motilidades (d) foram calculadas e categorizadas de acordo com Abdouchakour et al. (2018) [18]: não móvel ou fracamente móvel $d < 20$ mm; moderadamente móvel $20 \text{ mm} \leq d < 40$ mm; e altamente móvel $d \geq 40$ mm.

Motilidade *twitching*. Uma colônia de cada isolado foi inoculada até o fundo da placa de ágar *Twitching* (Tryptona 1,0%; Extrato de levedura 0,5%; NaCl 1,0%; Ágar 1,0%). Após incubação a 37°C por 24 h, o ágar foi cuidadosamente removido e a zona de motilidade foi medida pela coloração da placa de Petri com cristal violeta 2% por 2 h [6]. Como controle negativo, cada isolado foi inoculado em placa com ágar Tryptona de soja (TSA, Difco) sob as mesmas condições dos testes. As médias das zonas de motilidade foram calculadas e categorizadas de acordo com Wolska e Kot (2013) [20]: não móvel $d < 7$; fracamente móvel $7 \text{ mm} < d < 15$ mm; moderadamente móvel $15 \text{ mm} < d < 25$ mm; e altamente móvel $d > 25$ mm.

Protease alcalina. A produção de protease alcalina foi determinada em placas de ágar Leite (Leite em pó 1,0%; Peptona 0,1%; NaCl 0,5%; Ágar 2,0%; pH 10,0). Um volume de 10 μL das células em suspensão de *P. aeruginosa* de cada cepa foi adicionado à placa de ágar Leite e incubado a 37°C por 24 h. A produção de protease alcalina foi confirmada pela formação de uma zona clara ao redor do inóculo bacteriano, o diâmetro do halo foi medido e classificado em: +++ (8 – 25 mm); ++ (5 – 8 mm); + (1 – 5 mm); e – (0 mm).

Ramnolipídeos. A produção de ramnolipídeos foi estimada utilizando ensaios em placas de ágar CTAB (Brometo de cetiltrimetilamônio), conforme Siegmund e Wagner (1991) [21]. Um volume de 10 μL de cada isolado de *P. aeruginosa* crescidos em caldo LB (Neogen) a 37°C por 24 h foram inoculados nos poços confeccionados nas placas e incubados a 37°C por 48 h. A indicação da produção de ramnolipídeos ocorreu pela intensidade e tamanho do halo de precipitação formado ao redor dos inóculos.

Atividade da DNase. As bactérias crescidas em ágar LB (Neogen) foram inoculadas através de uma estria linear sobre o ágar DNase (Neogen). As placas foram incubadas a 37°C por 18 a 24 h. A solução aquosa de HCl 1N foi adicionada sobre o crescimento bacteriano e a formação de uma zona clara ao redor da cultura indicou reação positiva para DNase [22].

2.3 Análise estatística

Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata em ao menos três ocasiões distintas. Para realizar a representação gráfica e a análise estatística foi utilizado o Software R Studio (1.2.5001). Valores de $p < 0,05$ foram considerados como significantes.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo foram analisados fenotipicamente os fatores de virulência de 19 isolados de *Pseudomonas aeruginosa* obtidos de água de abastecimento público. Estes isolados foram previamente estudados quanto ao perfil de sensibilidade aos antibióticos e formação de biofilme por Anversa et al. (2019) [2], os quais constataram que as cepas isoladas se mostraram sensíveis a todos os antimicrobianos, exceto ticarcilina/ácido clavulânico, ao qual a resistência foi indicada como intermediário. Também observaram a forte capacidade de produção de biofilme em 10 (52,63%) isolados testados, 7 (36,84%) como produtores moderados e fracos, e apenas 2 (10,53%) foram classificados como não produtoras de biofilme.

Com a finalidade de avaliar a ocorrência de fatores de virulência nestes isolados, estes foram submetidos à pesquisa da produção de proteases alcalina, ramnolipídeos, DNases, e dos tipos de motilidade (Tabela 1).

Tabela 1: Expressão fenotípica dos fatores de virulência em isolados de *P. aeruginosa* utilizados no presente estudo.

Isolados	Swarming ^a	Swimming ^b	Twitching ^c	Protease alcalina ^d	Ramnolipídeos ^e	DNases ^f
PAO1	+++	+++	+	+++	+	-
P04023	-	+++	+	+++	+	-
P14048	-	+++	+	+++	+	-
P14083	-	+++	++	+++	+	-
P04015	+++	+++	+	+++	+	-
P04021	-	+++	+	+++	+	+
P35010	-	++	+	+++	-	-
P04064	-	+++	++	+++	+	-
P04024	-	++	+	+++	+	-
P14063	-	++	+	+++	+	-
P04011	-	++	+	+++	+	+
P04060	++	+++	+	+++	+	+
P14013	-	+++	+	+++	+	-
P14028	-	++	+	+++	-	+
P04020	-	+++	++	+++	+	-
P04010	-	+++	++	+++	+	-
P04046	-	+++	+	+++	+	-
P35005	-	++	+	+++	-	-
P14021	+++	+++	+	+++	+	-
P04053	+++	+++	+	+++	+	-

^{a,b}categorização *swarming* e *swimming*: - não ou fracamente móvel; ++ moderadamente móvel e +++ altamente móvel

^ccategorização *twitching*: - não móvel; + fracamente móvel; ++ moderadamente móvel e +++ altamente móvel

^dPresença de zona clara ao redor da colônia: diâmetro (mm) da proteólise: +++ (8–25); ++ (5–8); + (1–5); - (0 mm)

^{e,f}categorização ramnolipídeos e DNases: - não produtor e + produtor

PAO1: cepa padrão de referência

P04023-P04053: isolados obtidos de água de abastecimento

As análises dos fatores de virulência revelaram que todos os 19 isolados de *P. aeruginosa* estudados foram produtores de protease alcalina com zona de proteólise acima de 8 mm. A atividade da DNase e a produção de ramnolipídeos foi observada em 21,1% (n=4) e 84,2% (n=16) dos isolados, respectivamente. As enzimas proteolíticas produzidas por *P. aeruginosa* contribuem para a multiplicação bacteriana e quebra das defesas físicas do hospedeiro, fornecendo aminoácidos e peptídeos das proteínas teciduais para as bactérias. Além de degradar

imunoglobulinas e outros componentes interferindo no mecanismo de defesa imunológica do hospedeiro [3]. Os ramnolipídeos auxiliam nos estágios iniciais da formação de biofilmes e tem papel na regulação da motilidade. A atividade da DNase, demonstrou ser responsável pela redução da viscosidade do escarro em pacientes com fibrose cística [11].

Os resultados de motilidade foram interpretados utilizando as medidas dos diâmetros de crescimento, seguidos da categorização. No ensaio de *swarming*, quatro isolados (21,1%) foram positivos, com zona de motilidade variando de 9 a 73 mm, categorizados em: não ou fracamente móvel, 78,9% (n=15); moderadamente móvel, 5,3% (n=1); e altamente móvel, 15,8% (n=3). No ensaio de *swimming*, 100% (n=19) dos isolados exibiram resultados positivos, com zona de motilidade variando de 21 a 64 mm, sendo 31,6% (n=6) moderadamente móvel e 68,4% (n=13) altamente móvel. No ensaio de motilidade *twitching* as zonas de motilidade variaram de 7 a 17 mm, sendo 78,9% (n=15) fracamente móvel e 21,1% (n=4) moderadamente móvel. Os resultados mostraram uma alta diversidade no comportamento de motilidade entre os isolados de *P. aeruginosa*. Ao comparar os três tipos de motilidade, a maioria dos isolados (68,4%) apresentou produção significativa ($p < 0,05$) de motilidade *swimming* (Figura 1).

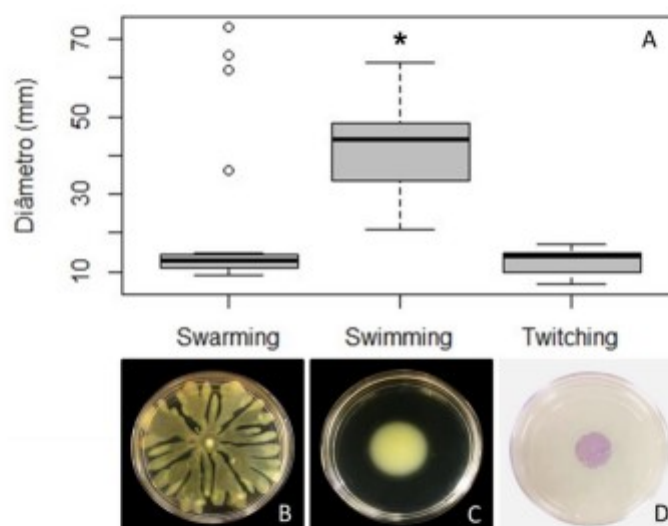


Figura 1: Resultados dos ensaios fenotípicos de motilidade. A) Gráfico box-plot da distribuição de diâmetro das motilidades (mm); B) Motilidade *swarming*; C) Motilidade *swimming*; D) Motilidade *twitching*. * Resultados significativos com $p < 0,05$.

Autores como Zineba et al. (2015) [23] relataram que 54,7%; 43%; 71% e 59,5% dos isolados de *P. aeruginosa* obtidos de água apresentaram produção de protease, motilidade *swarming*, *swimming* e *twitching*, respectivamente. A motilidade *swarming* formam padrões dendríticos na superfície do meio de cultura, enquanto que em *swimming* as bactérias movimentam-se de forma desorganizada sobre superfícies aquosas, sendo característica de isolados de ambientes fluidos, como a água [24, 25]. Isso pode estar relacionado às altas porcentagens deste fenótipo no presente estudo. A motilidade *twitching* ocorre em superfícies sólidas e a única estrutura envolvida é o *pili* tipo IV. A motilidade bacteriana é essencial para a patogenicidade, uma vez que está envolvida na adesão, colonização, promoção do processo infeccioso, formação de biofilmes e fuga a ambientes desfavoráveis [5, 6, 26].

A virulência e patogenicidade desta bactéria são reguladas pelo Sistema *Quorum Sensing* (QS), um mecanismo de comunicação celular entre as bactérias através da secreção de sinais químicos extracelulares, e sua concentração é dependente da densidade microbiana [27]. Assim, o aumento da densidade microbiana pode promover o aumento de fatores de virulência como protease alcalina, produção de ramnolipídeos e motilidade, como os encontrados na presente

pesquisa, e serem potencialmente patogênicas, especialmente para pacientes imunocomprometidos.

A produção de diversos fatores de virulência causa preocupação, devido às suas ações relacionadas ao sucesso invasivo ao hospedeiro, ao transporte pelo meio aquático e, a adesão às superfícies bióticas e abióticas, o que permite sua fixação e sobrevivência em diversos ambientes, incluindo o hospitalar [10, 23].

Em diversos países foram relatados a identificação de *P. aeruginosa* em ambiente hospitalar relacionando com o sistema de abastecimento de água. Na França, foi identificado que um surto hospitalar por *P. aeruginosa* estava relacionado com a exposição à água potável contaminada [8]. No Reino Unido, pesquisadores identificaram *P. aeruginosa* em uma torneira do lavatório de uma Unidade de Terapia Intensiva [28]. Na Irlanda do Norte, constatou-se a contaminação das torneiras da Unidade de Terapia Intensiva Neonatal por *P. aeruginosa*, após investigação decorrente da morte de recém-nascidos por bacteremia ocasionada por esta bactéria [29]. Na Itália, os pesquisados identificaram 55,93% isolados de *P. aeruginosa* em sistema de abastecimento de água do Hospital exibindo diversos fatores de virulência [30]. No Brasil, os relatos da presença de *P. aeruginosa* em águas utilizadas em clínicas de hemodiálise são frequentes [31, 32]. Desta forma, revela o risco no qual os pacientes renais crônicos estão expostos quando submetidos a este tratamento.

A presença de *P. aeruginosa* nas torneiras foi relacionada à sua capacidade de sobrevivência à baixa exigência nutricional e a capacidade de formação de biofilme, que possibilitam a sobrevivência desta bactéria em superfícies hospitalares podendo ocasionar os surtos de infecção [33]. A combinação de propriedades intrínsecas da bactéria, como as características virulentas e a resistência aos antimicrobianos, as condições ambientais e o estado de saúde dos pacientes são observados como fatores para severidade e alta mortalidade em pacientes com infecções pulmonares e bacteremias [34].

Os resultados deste estudo demonstram a importância de incluir *P. aeruginosa* na avaliação da potabilidade da água, especialmente nas clínicas e ambientes hospitalares. A fim de contribuir para a higienização correta dos sistemas de abastecimento de água dos hospitais, assim como a conscientização dos profissionais da área da saúde sobre as fontes de contaminação por *P. aeruginosa*, além da implantação de medidas para reduzir a disseminação, monitorar o ambiente hospitalar e traçar estratégias para minimizar o risco de contaminação para pacientes suscetíveis [29, 35].

4. CONCLUSÃO

Conclui-se que a maioria dos isolados de *P. aeruginosa* testados foram capazes de produzir fatores de virulência como motilidade *swimming* e *twitching*, protease e ramnolipídeos. O conhecimento sobre os fatores de virulência destes microrganismos obtidos de águas de abastecimento é essencial para esclarecer a epidemiologia e as possíveis causas de infecções por *P. aeruginosa*.

5. AGRADECIMENTOS

Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo (SES/SP).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Parcell BJ, Oravcova K, Pinheiro M, Holden MTG, Phillips G, Turton JF, Gillespie SH. *Pseudomonas aeruginosa* intensive care unit outbreak: winnowing of transmissions with molecular and genomic typing. J Hosp Infect. 2018 Mar;98(3):282-288, doi:10.1016/j.jhin.2017.12.005
2. Anversa L, Stancari RCA, Garbelotti M, Ruiz LS, Pereira VBR, Nascentes GAN, Dantas STA, Rall VLM. *Pseudomonas aeruginosa* in public water supply. Water Pract Technol. 2019 Sep;14(3):732–737, doi:10.2166/wpt.2019.057
3. Strateva T, Mitov I. Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. Ann Microbiol. 2011 May;61(4):717-732, doi:10.1007/s13213-011-0273-y

4. Ghorbal SKB, Chourabi K, Maalej L, et al. *Pseudomonas aeruginosa* swarmer cells adaptation toward UVc radiations. *Front Microbiol.* Apr 2019;10:556, doi:10.3389/fmicb.2019.00556
5. Mattingly AE, Weaver AA, Dimkovikj A, Shrout, JD. Assessing Travel Conditions: Environmental and Host Influences on Bacterial Surface Motility. *J Bacteriol.* 2018 Mar;200(11):e00014-18, doi:10.1128/JB.00014-18
6. Otton LM, Campos MS, Meneghetti KL, Corção G. Influence of twitching and swarming motilities on biofilm formation in *Pseudomonas* strains. *Arch Microbiol.* 2017 Feb;199(5):677-682, doi:10.1007/s00203-017-1344-7
7. Rocha AJ, Barsottini MRO, Rocha RR, Laurindo MV, Moraes FLL, Rocha SL. *Pseudomonas aeruginosa*: Virulence Factors and Antibiotic Resistance Genes. *Braz Arch Biol Technol.* Jun;2019; 62: e19180503, doi.org/10.1590/1678-4324-2019180503
8. Costa D, Bousseau A, Thevenot S, Dufour X, Laland C, Burucoa C, Castel O. Nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* associated with a drinking water fountain. *J Hosp Infect.* 2015 Nov;91(3):271-4, doi:10.1016/j.jhin.2015.07.010
9. Garvey MI, Wilkinson MAC, Holden K, Martin T, Parkes J, Holden E. Tap out: reducing waterborne *Pseudomonas aeruginosa* transmission in an intensive care unit. *J Hosp Infect.* 2018 May;102(1):75-81, doi:10.1016/j.jhin.2018.07.039
10. Galdino ACM, Branquinha MH, Santos ALS, Viganor L. Springer Nature Singapore Pte; 2017. Chapter 16, Chakraborti S, Dhalla N. (eds) Pathophysiological Aspects of Proteases; p. 381-397, doi:10.1007/978-981-10-6141-7_16
11. Das T, Manoharan A, Whiteley G, Glasbey T, Manos J. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and infections: Roles of extracellular molecules. Elsevier; 2020. Chapter 3, New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Biofilms; p. 29-46, doi:10.1016/b978-0-444-64279-0.00003-7
12. Anghel I, Holban AM, Grumezescu AM, Andronesu E, Fica A, Anghel G, Maganu M, Lazar V, Chifriuc MC. Modified wound dressing with phyto-nanostructured coating to prevent staphylococcal and pseudomonal biofilm development. *Nanoscale Res Lett.* 2012 Dec;7(1):690, doi:10.1186/1556-276X-7-690
13. Val AL, Bicudo CEM, Bicudo DC, Pujoni DFF, Spilki FR, Nogueira ISN, Espanhol I, Cirilo JA, Tundisi JG, Val P, Hirata R, Oliveira e Azevedo, SMF, Crestana S, Ciminelli VST. Water quality in Brazil. In: Water quality in the Americas: Risks and opportunities. Inter-American Network of Academies of Sciences IANAS, 2019.
14. Brasil. Portaria Consolidação nº 5 de 28 de setembro de 2017. Consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde. Anexo XX - Do controle e da vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de Potabilidade. Diário Oficial da União, Brasília, DF. 2017. 825p.
15. Stoler J, Ahmed H, Frimpong LA, Bello M. Presence of *Pseudomonas aeruginosa* in coliform-free sachet drinking water in Ghana. *Food Control.* 2015 Sep;55:242-247, doi:10.1016/j.foodcont.2015.02.038
16. Caskey S, Stirling J, Moore JE, Rendall JC. Occurrence of *Pseudomonas aeruginosa* in waters: implications for patients with cystic fibrosis (CF). *Lett Appl Microbiol.* 2018 Jun; 66(6): 537-541, doi:10.1111/lam.12876
17. Norizan SN, Yin WF, Chan KG. Caffeine as a potential quorum sensing inhibitor *Sensors.* 2013 Apr;13(4):5117-5129, doi:10.3390/s130405117
18. Abdouchakour F, Aujoulat F, Licznar-Fajardo P, Marchandin H, Toubiana M, Parer S, Lotthé A, Jumas-Bilak E. Intracolon variations of resistance and phenotype in *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clone ST308: A key to success within a hospital? *Int J Med Microbiol.* 2018 Mar;308 (2):279-289, doi:10.1016/j.ijmm.2017.11.008
19. Inoue T, Shingaki R, Fukui K. Inhibition of swarming motility of *Pseudomonas aeruginosa* by branched-chain fatty acids. *FEMS Microbiol Lett.* 2008 Apr;281(1):81-86, doi:10.1111/j.1574-6968.2008.01089.x
20. Wolska K, Kot B. Twitching motility activity, biofilm formation, and genetic typing for clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* by random amplified DNA PCR. *Acta Microbiol Imm H.* 2013 Sep;60(3):313-328, doi:10.1556/AMicr.60.2013.3.7
21. Siegmund I, Wagner F. New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar. *Biotechnol Tech.* 1991 Jul;5(4):265-268, doi:10.1007/BF02438660
22. Macin S, Akarca M, Sener B, Akyon Y. Comparison of virulence factors and antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with and without cystic fibrosis. *Rev Romana Med Lab.* 2017 Oct;25(4): 327-334, doi:10.1515/rrlm-2017-0027

23. Zineba G, Hassan L, Mostafa M, Abdellah H, Mohammed T, Mostafa ME. Virulence phenotype, physicochemical properties, and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* on polyethylene used in drinking water distribution systems. *Water Resour.* 2015 Jan;42(1):98–107, doi:10.1134/S0097807815010042
24. Yan J, Monaco H, Xavier JB. The Ultimate Guide to Bacterial Swarming: An Experimental Model to Study the Evolution of Cooperative Behavior. *Annu Rev Microbiol.* 2019 Sep;8(73):293–312, doi:10.1146/annurev-micro-020518-120033
25. Akhtar ST, Sabri AN. Twitching, swimming, swarming in biofilm forming strains in response to chemical and physical factors. *Punjab Univ J Zool.* 2017 Dec;32(2):265–276.
26. Khan F, Pham DTN, Oloketuyi SF, Kim Y-M. Regulation and controlling the motility properties of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2020 Jan;104:33–49, doi:10.1007/s00253-019-10201-w
27. Saeki EK, Kobayashi RKT, Nakazato G. Quorum sensing system: Target to control the spread of bacterial infections. *Microb Pathog.* 2020 Feb;142:104068, doi:10.1016/j.micpath.2020.104068
28. Garvey MI, Bradley CW, Tracey J, Oppenheim B. Continued transmission of *Pseudomonas aeruginosa* from a wash hand basin tap in a critical care unit. *J Hosp Infect.* 2016 Sep;94(1):8–12, doi:10.1016/j.jhin.2016.05.004
29. Walker JT, Jhutti A, Parks S, Willis C, Copley V, Turton JF, Hoffman PN, Bennett A M. Investigation of healthcare-acquired infections associated with *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in taps in neonatal units in Northern Ireland. *J Hosp Infect.* 2014 Jan;86(1): 16–23, doi:10.1016/j.jhin.2013.10.003
30. Iseppi R, Sabia C, Bondi M, Mariani M, Messi P. Virulence Factors, Drug Resistance and Biofilm Formation in *Pseudomonas* Species Isolated from Healthcare Water Systems. *Curr Microbiol.* 2020 Apr, doi:10.1007/s00284-020-01990-9
31. Figel IC, Dalzoto PR, Pimentel IC. Microbiological quality of water and dialysate from haemodialysis units in Southern Brazil. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 2015 Feb;74(1):66–70.
32. Peresi JTM, Almeida IAZC, Teixeira ISC, Silva SIL, Alves EC, Marques DF, Ribeiro AK. *Pseudomonas aeruginosa*: ocorrência e suscetibilidade aos agentes antimicrobianos de isolados de amostras de água tratada utilizada em solução de diálise. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 2011 Dec;70(4):542–7.
33. Ahmadi Jalali Moghadam M, Honarmand H, Asfaram Meshginshahr S. Contamination of Hospital Water Supplies in Gilan, Iran, with *Legionella pneumophila*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2015 Sep;2016:1–7, doi:10.1155/2015/809842
34. Cholley P, Thouverez M, Floret N, Bertrand X, Talon D. The role of water fittings in intensive care rooms as reservoirs for the colonization of patients with *Pseudomonas aeruginosa*. *Intensive Care Med.* 2008 Aug;34(8):1428–1433, doi:10.1007/s00134-008-1110-z
35. Loveday HP, Wilson J, Kerr K, Pitchers R, Walker JT, Browne J. Association between healthcare water systems and *Pseudomonas aeruginosa* infections: A rapid systematic review. *J Hosp Infect.* 2014 Jan; 86(1):7–15, doi:10.1016/j.jhin.2013.09.010