
Florfenicol favorece crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* em água residuária

Florfenicol favors growth of *Pseudomonas aeruginosa* in wastewater

Jéssica Vieira Dantas

Pós-Graduação em Biotecnologia (Universidade Federal da Paraíba), Brasil

E-mail: jessicavdantas@gmail.com

Andrwey Augusto Galvão Viana

Universidade Federal da Paraíba, Brasil

E-mail: andrwey-viana@hotmail.com

Ian Porto Gurgel do Amaral

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1923-6219>

Universidade Federal da Paraíba, Brasil

E-mail: ianamaral@cbiotec.ufpb.br

Ulrich Vasconcelos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8289-2230>

Universidade Federal da Paraíba, Brasil

E-mail: u.vasconcelos@cbiotec.ufpb.br

RESUMO

Medicamentos de uso veterinário no controle do crescimento microbiano contribuem para o aumento da resistência a antibióticos. Bactérias fisiologicamente versáteis como *Pseudomonas aeruginosa*, principal bacilo Gram-negativo não fermentador prioritário segundo a Organização Mundial da Saúde, adquirem e disseminam genes de resistência a partir do contato com estes compostos. Este trabalho avaliou as respostas de três isolados de *Pseudomonas aeruginosa* ao florfenicol sob condições de Demanda Química de Oxigênio (DQO) semelhantes às encontradas em estação de tratamento de esgoto. Foram realizados testes *in vitro* em meio contendo água residuária sintética 20.000 mg/L e concentrações de florfenicol variando entre 0,3 e 0,08 mg/mL. Não houve inibição do crescimento dos isolados, tampouco houve diferenças relacionadas entre o padrão de resistência e a origem do isolado. As células aderiram-se fortemente no biofilme em todas as condições, assim como o número de células planctônicas aumentou mais de 1000%. Florfenicol nas concentrações 0,15 e 0,30 mg/mL favoreceu os crescimentos mais significativos das células. Os resultados apontam os riscos do descarte de florfenicol em corpos hídricos.

Palavras-chave: Biofilme; Resistência microbiana a antibióticos; Antibióticos veterinários.

ABSTRACT

Veterinary medicines used to control microbial growth contribute to the increase in resistance to antibiotics. Physiologically versatile bacteria such as *Pseudomonas aeruginosa*, the main priority non-fermenting Gram-negative bacillus according to the World Health Organization, acquire and disseminate resistance genes through contact with these compounds. This work assessed the responses of three *Pseudomonas aeruginosa* isolates to florfenicol under conditions of Chemical Oxygen Demand (COD) similar to those found in a sewage treatment plant. *In vitro* tests were carried out in plates containing synthetic wastewater at 20,000 mg/L and florfenicol ranging between 0.3 and 0.08 mg/mL. There was no inhibition of the growth of the isolates, nor there were found any differences related to the resistance pattern and the origin of the isolate. The cells adhered strongly to the biofilm under all conditions, as well as the number of planktonic cells increased by more than 1000%. Florfenicol at 0.15 and 0.30 mg/mL significantly favored cell growth. The results addressed the risks of disposing of florfenicol in water bodies.

Keywords: Biofilm; Microbial resistance to antibiotics; Veterinary antibiotics.

INTRODUÇÃO

Os antibióticos utilizados na medicina veterinária são os mesmos ou similares aos prescritos para humanos (Caneschi *et al.*, 2023), por conseguinte, estes compostos representam risco à saúde pública e ambiental, uma vez que contribuem para a seleção e disseminação de isolados bacterianos resistentes (Kim; Ahn, 2022; Rousham *et al.*, 2018; Von Wintersdorff *et al.*, 2016). O florfenicol [IUPAC: 2,2-dichloro-N-((1R,2S)-3-fluoro-1-hydroxy-1-(4-(methylsulfonyl)phenyl)propan-2-yl)ethanamide) é um antibiótico bacteriostático da classe dos fenicois, muito utilizado na medicina veterinária para o tratamento de infecções respiratórias em animais de produção (bovinos, suínos, aves, equinos, peixes, coelhos e camelos) e de companhia (cães) (Trif *et al.*, 2023). Seu mecanismo de ação é por ligação à subunidade 50S do ribossomo, inibindo a peptil transferase (Hayes *et al.*, 2003).

A resistência bacteriana é um processo natural que ao longo das décadas tornou-se um importante problema de saúde pública porque esta resistência é fruto da exposição da microbiota a antibióticos usados na clínica, na agricultura e na veterinária (Duarte *et al.*, 2022). A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica a resistência antimicrobiana como uma das dez maiores ameaças à saúde global, com projeções de 10 milhões de mortes anuais até 2050 causadas por este problema (Brogan; Mossialos, 2016).

Pseudomonas aeruginosa é o bacilo não fermentador Gram-negativo caracterizado por uma versatilidade metabólica, ubiquidade e capacidade de adaptar-se a uma variedade de ambientes, tornando-o um patógeno oportunista de importância clínica significativa (Qin *et al.*, 2022). A bactéria ainda exhibe diferentes fatores de virulência, sendo a colonização de biofilmes responsável por sua persistência em ambientes hostis e contribui para a cronicidade das infecções, dada a dificuldade na erradicação (Ciofu; Tolker-Nielsen, 2019; Tuon *et al.*, 2022). A formação de biofilme facilita a (Gellatly; Hancock, 2013).

O biofilme de *P. aeruginosa* é composto por água, DNA, lipídeos e majoritariamente por uma matriz polimérica que além de fornecer suporte estrutural, abriga uma organização complexa de células. Os principais polímeros que compõem o biofilme são Pel, Psl e alginate (Vettrivel *et al.*, 2021). Resumidamente, existem 5 etapas do ciclo de um biofilme. Tudo inicia com o reconhecimento da superfície por meio de flagelos e *pili* tipo IV, em seguida se houver condições favoráveis de crescimento, a

adesão torna-se irreversível, favorecendo o desenvolvimento e maturação das microcolônias em estruturas tridimensionais extensas, semelhantes a cogumelos. Por fim, estimulado por diversos mecanismos celulares e moleculares, bem como fatores estressores externos, a matriz sofre ruptura, desprendendo novas células migratórias que irão repetir o ciclo (Rasamiravaka *et al.*, 2015). Este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito do florfenicol sobre este ciclo, em um sistema aquoso com elevado teor de matéria orgânica.

MATERIAL E MÉTODOS

Florefenicol

O medicamento foi adquirido em farmácia veterinária e de produtos agrícolas (VETFLOR[®], JA Saúde Animal, Patrocínio Paulista-SP), frasco de solução injetável de 30 mL contendo florfenicol 30% e veículo *quantum sufficit*.

Isolados de *Pseudomonas aeruginosa*

O estudo foi realizado com três isolados, obtidos pelo método 9213F da APHA; AWWA; WEF (2012), de amostras de água captadas da torneira do ambulatório de um hospital veterinário (JVD05: #acesso SisGen A8A9D5A) e diretamente do açude São Gonçalo, no distrito de Sousa, região do Alto Sertão, do estado da Paraíba (JVD07: #acesso SisGen AD6CFAA; e JVD 8: #acesso SisGen AC65073).

Água residuária sintética

O ensaio *in vitro* da formação do biofilme foi conduzido em meio aquoso, simulando uma Demanda Química de Oxigênio de 20.000 mg/L encontrada em estações de tratamento de esgoto. A composição da água residuária sintética era (em mg/L): sacarose (17); extrato de levedura (3,92); ureia (1,24); CaCl₂ (0,055); MgSO₄ (0,045); K₂HPO₄ (0,065); KH₂PO₄ (0,055); e FeCl₃ (0,005), pH 7 (Reyes-Lara; Reyes-Mazzoco (2009).

Teste *in vitro* da formação do biofilme e contagem de células planctônicas

Foi empregada a técnica da microdiluição em placas de poliestireno com 96 poços e fundo em U. Os poços foram preenchidos com 100 µL de água residuária; 100 µL da solução de florfenicol, preparada em dimetilsulfóxido 1% e 10 µL do inóculo, preparado

como suspensões dos isolados de cultivo recente, em solução salina (NaCl 0,85%), com turbidez ajustada com o tubo 0,5 da escala de MacFarland. Foram testadas as concentrações 0,30; 0,15 e 0,08 mg/mL de florfenicol. Os sistemas foram incubados por 4h, à 30 °C.

Para quantificar o biofilme formado foi utilizada a técnica do cristal violeta (Batista et al., 2017). O sobrenadante foi cuidadosamente removido dos poços, em seguida lavados com água destilada esterilizada para remover as células em suspensão e em seguida preenchidos com 210 µL da solução de cristal violeta 1% (PROC9, Canoas, Rio Grande do Sul, Brasil). Após 20 min, o corante foi removido e o excesso lavado com água destilada. Uma vez secos, transferiu-se 210 µL de etanol 99,6% (Química Moderna, Baueri-SP) e após 15 min de repouso, determinou-se a densidade óptica da solução cristal violeta-etanol a 570 nm (BIOTEK EL800).

Os resultados foram apresentados como o valor da densidade óptica em gráfico de combinação e como proporcionalidade, comparados ao controle. A adesão celular foi classificada de acordo com Charlton *et al.* (2008), como fraca (< 40%), moderada (40-80%) ou alta (> 80%). Do sobrenadante reservado, quantificou-se as células planctônicas a 630 nm (BIOTEK EL800).

Análise estatística

Todos os testes foram conduzidos em triplicata. Os valores foram expressos na forma de média do percentual \pm desvio padrão. Os dados foram tratados utilizando o *software* R, versão 4.2.1 (*open access*), aplicando o teste de Shapiro-Wilk para avaliar a normalidade dos dados. O resultado do teste indicou uma distribuição não normal. Devido à não conformidade dos dados com uma distribuição normal, optou-se pela aplicação do Teste de Kruskal- Wallis

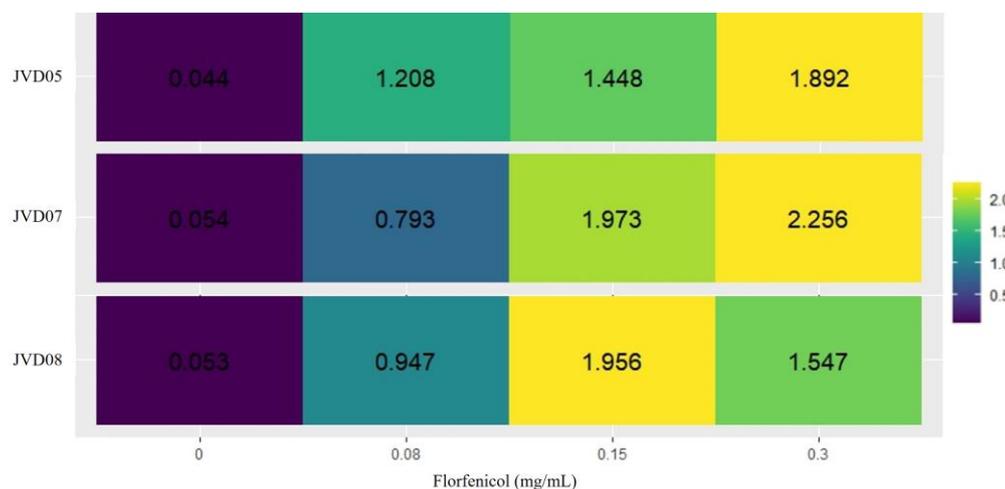
RESULTADOS

Efeito do florfenicol na formação do biofilme

Os resultados obtidos foram similares entre os isolados, especialmente entre JVD05 e JVD07. Quanto mais concentrado o florfenicol, maior a densidade óptica, indicativo de que o biofilme havia se formado, isto é, o florfenicol favoreceu a formação do biofilme. A Figura 1 apresenta um gráfico de combinação em que quanto mais

amarelo, mais biofilme foi formado. Cores iguais representam valores estatisticamente iguais em todas as condições.

Figura 1 – Densidade óptica (580 nm) do ensaio do cristal violeta com isolados de *Pseudomonas aeruginosa* em meio com DQO de 20.000 mg/L. Cada linha representa um isolado e cada coluna, a concentração de florfenicol ($p < 0,01$)



Fonte: Dantas *et al.* (2024)

A adesão das células foi classificada como alta em todas as condições testadas, registrando aumentos maiores que 2.000%, comparadas ao observado no controle. A Tabela 1, sumariza o número de vezes que o biofilme aumentou na presença de florfenicol em concentrações crescentes.

Tabela 1 – Avaliação da adesão do biofilme de isolados de *Pseudomonas aeruginosa* em meio com DQO de 20.000 mg/L ($p < 0,01$)

FFC (mg/mL)	JVD 05	JVD 07	JVD 08
0,30	27,5	14,7	17,9
0,15	32,9	36,5	36,9
0,08	43,0	41,8	29,2

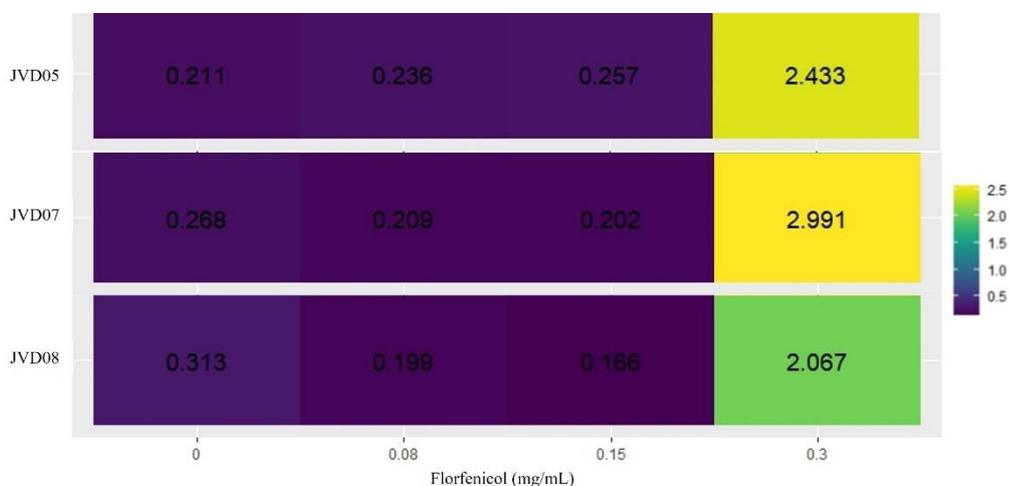
FFC- florfenicol. Os números indicam quantas vezes a mais, o biofilme estava aderido se comparado ao controle (sem florfenicol).

Fonte: Dantas *et al.* (2024)

Efeito do florfenicol nas células planctônicas

Com relação às células planctônicas foi observado um perfil mais homogêneo do que no teste *in vitro* da formação do biofilme, em termos estatísticos. Contudo, o padrão de crescimento, ou seja, similaridades entre os isolados JVD05 e JVD07 e ambos, diferentes de JVD08, permaneceu idêntico ao teste anterior. A Figura 2 representa o gráfico de combinação, em que as cores roxa e amarela representam valores estatisticamente iguais. Isso indicou que uma maior densidade de células planctônicas foi alcançada na maior concentração de florfenicol. Embora os isolados JVD07 e JVD08 tenham reduzido ligeiramente o número de células planctônicas nas concentrações de 0,08 e 0,15 mg/mL de florfenicol, este resultado não foi diferente significativamente ao obtido no controle. Em complemento, o isolado JVD08 foi significativamente diferente dos demais, entretanto, o número de células planctônicas foi maior que 500 vezes o observado no controle (sem florfenicol).

Figura 2 – Densidade óptica (630 nm) do sobrenadante contendo células viáveis dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* em meio com DQO de 20.000 mg/L. Cada linha representa um isolado e cada coluna, a concentração de florfenicol ($p < 0,01$)



Fonte: Dantas *et al.* (2024)

Da mesma forma que o florfenicol não promoveu atividade antibiofilme, também não houve ação biocida sobre as células planctônicas, registrando aumentos maiores que 1.000%. Comparando os dois resultados, há indícios de que o biofilme não se formou em função do estresse causado pelo florfenicol, assim como as células não migravam por mesma razão.

Tabela 2 – Incremento do número de células planctônicas dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* expostas ao florfenicol em meio com DQO de 20.000 mg/L ($p < 0,01$)

FFC (mg/mL)	Aumento (%)		
	JVD 05	JVD 07	JVD 08
0,30	11,8	- 22,5 ¹	- 36,4
0,15	21,8	- 17,2	- 47,0
0,08	1.053,1	1.016,0	560,4

FFC – florfenicol. ¹Valores negativos representam redução das células planctônicas, mas não foram estatisticamente significativas.

Fonte: Dantas *et al.* (2024)

DISCUSSÃO

Este trabalho teve por objetivo verificar as respostas de células sésies e planctônicas de *P. aeruginosa*, de origem clínica e selvagem, expostas a diferentes concentrações de florfenicol. Em todas as condições testadas observou-se que o aumento na concentração de florfenicol resultou os maiores valores da população de vida livre e no biofilme. Embora de ação bacterioestática, o florfenicol possui um átomo de flúor no carbono de posição C3, o que, em tese, reduz resistência bacteriana e confere efeito inibitório, entretanto, é observada resistência primária ao composto em alguns isolados de *P. aeruginosa* (Cruz *et al.*, 2012). Além disso, *P. aeruginosa* e alguns microrganismos podem utilizar florfenicol e outros antibióticos, como fonte de carbono (Dantas *et al.*, 2008), porém nas condições oferecidas neste estudo, não foi possível verificar se os isolados exibiam tal característica.

A hipótese possivelmente mais acertada diz respeito ao fato dos isolados já fossem dotados de genes de resistência a outros antibióticos, por compartilharem habitat estressores. Estes genes conferem expressão de diferentes mecanismos de resistência, como a ativação de sistemas de efluxo, que por fim atuam em diferentes compostos (Mutuku *et al.*, 2022). Além disso, é possível que os isolados tenham contato prévio com florfenicol, porém detectar florfenicol no ambiente não foi escopo deste estudo.

O gene determinante de resistência ao florfenicol, *floR*, foi detectado inicialmente em *Photobacterium damsela*, patógeno de peixes, porém é muito difundido em outras bactérias aquáticas (Bolton *et al.*, 1999). O gene *floR* é responsável pela codificação de bomba de efluxo (Du *et al.*, 2004). Estes sistemas de efluxo desempenham um papel crucial na proteção celular contra antimicrobianos, transportando ativamente os

compostos para fora do citoplasma e/ou periplasma, reduzindo seu acúmulo em locais onde exercem sua ação (Lynch, 2006).

É importante considerar para o papel do florfenicol no favorecimento da formação do biofilme em razão da concentração de nutrientes. Um sistema com alta carga de DQO propicia a colonização por biofilme devido à abundância de matéria orgânica (Lecca; Rizama, 2014), porém uma alta concentração de nutrientes, especialmente nitrogênio, pode ter efeito inibitório (Leys *et al.*, 2005). Isto ficou bem apresentado ao observar as respostas das células planctônicas e o controle em ambos os ensaios (planctônicas e biofilme). Assim, é possível supor que rapidamente o florfenicol foi detectado pelas células e sistemas densidade celular dependentes se encarregaram de responder na expressão do biofilme.

Balaban *et al.* (2004) e Lewis (2007) discutiram sobre vários mecanismos moleculares desempenhando papéis cruciais na resistência das bactérias aos antimicrobianos, podendo atuar de forma isolada ou em conjunto para conferir essa capacidade adaptativa, dentre elas um tempo de duplicação maior. Isto pode justificar os achados sobre as células planctônicas e o padrão observado nas células em biofilme, porém segundo Belenky *et al.* (2015), a multiplicação bacteriana induzida por antibióticos pode resultar em perturbações metabólicas que causam danos celulares, contudo, a produção de metabólitos tóxicos contribui para a resistência universal aos antibióticos observada em isolados de *P. aeruginosa* Zhu *et al.* (2019).

CONCLUSÃO

Nas condições experimentais aplicadas neste estudo, os isolados de *P. aeruginosa* expostos a diferentes concentrações de florfenicol, rapidamente se estabeleceram em biofilme enquanto a população planctônica se manteve estável e razoavelmente elevada. Na maior concentração de antibiótico planctônicas e séssies atingiram seus máximos, independentemente da origem clínica ou selvagem. Os resultados ascendem uma importante discussão sobre o papel dos antibióticos de uso veterinário no processo de ocorrência de resistência em bactérias patogênicas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, nível Mestrado, da Universidade Federal da Paraíba.

REFERÊNCIAS

APHA, AWWA, WEF – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION, WATER ENVIRONMENT FEDERATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 22nd ed. Baltimore: APHA, AWWA, WEF, 2012.

BALABAN, N.Q.; MERRIN, J.; CHAIT, R.; et al. Bacterial persistence as a phenotypic switch. **Science**. v. 305, n. 5690, p. 1622-1625, 2004.

BELENKY, P.; YE, J.D.; PORTER, C.B.; et al. Bactericidal antibiotics induce toxic metabolic perturbations that lead to cellular damage. **Cell Rep**. v. 13, n. 5, p. 968–980, 2015. doi:10.1016/j.celrep.2015.09.059

BOLTON, L.F.; KELLEY, L.C.; LEE, M.D.; et al. Detection of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 based on a gene which confers cross-resistance to florfenicol and chloramphenicol. **J Clin Microbiol**. v. 37, p. 1348-1351, 1999.

BROGAN, D.M.; MOSSIALOS, E. A critical analysis of the review on antimicrobial resistance report and the infectious disease financing facility. **Global Health**, v. 12, n. 1, p. 1-7, 2016, doi: 10.1186/s12992-016-0147-y.

CANESCHI, A.; BARDHI, A.; BARBAROSSA, A.; et al. The use of antibiotics and antimicrobial resistance in veterinary medicine, a complex phenomenon: A narrative review. **Antibiotics**. v. 12, n. 3, p. 487, 2023. doi: 10.3390/antibiotics1203487

CHARLTON, T.S. A repeatable biofilm removal assay and its application in the assessment of commercial cleaning formulations for medical devices. **Healthcare Infect**. v. 13, n. 4, p. 131-135, 2008. doi: 10.1071/HI08030

CIOFU, O.; TOLKER-NIELSEN, T. Tolerance and resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to antimicrobial agents - how *Pseudomonas aeruginosa* can escape antibiotics. **Front Microbiol**. v. 10, p. 913, 2019, doi: 10.3389/fmicb.2019.00913

CRUZ, R.A.; PAES, A.C.; SIQUEIRA, A.K. Perfil de sensibilidade de bactérias patogênicas isoladas de cães frente a antimicrobianos. **Vet Zoot**. v. 19, n. 4, p. 601-610, 2012.

DANTAS, G.; SOMMER, M.O.A.; OLUWASEGUN, R.D.; et al. Bacteria subsisting on antibiotics. **Science**. v. 320, n. 5872, p. 100-103, 2008. doi: 10.1126/Science.1155157

DU, X.; XIA, C.; SHEN, J.; et al. Characterization of florfenicol resistance among calf pathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol Lett**. v. 236, n. 2, p. 183-189, 2004. doi: 10.1016/j.femsle.2004.05.013

- DUARTE, A.C.; RODRIGUES, S.; AFONSO, A. et al. Antibiotic resistance in the drinking water: Old and new strategies to remove antibiotics, resistant bacteria, and resistance genes. **Pharmaceuticals**. v. 15, n. 4, p. 393, 2022. doi: 10.3390/ph15040393
- GELLATLY, S.L.; HANCOCK, R.E.W. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. **Pathog Dis**. v. 67, n. 3, p. 159-173, 2013. doi: 10.1111/2049-632X.12033
- HAYES, J.M; EICHMAN, J.; KATZ, T., et al. Stability of florfenicol in drinking water. **J AOAC Int**. v. 86, p. 22-29, 2003. doi: 10.1093/jaoac/86.1.22
- KIM, J.; AHN, J. Emergence and spread of antibiotic-resistant foodborne pathogens from farm to table. **Food Sci Biotechnol**. v. 31, n. 12, p. 1481-1499, 2022. doi: 10.1007/s10068-022-01157-1
- LECCA, E.R.; LIZAMA, E.C.R. Caracterización de las aguas residuales y la demanda bioquímica de oxígeno. **Diseño Tecnol**. v. 17, n. 1, p. 71-80, 2014. doi: 10.15381/idata.v17i1.12035
- LEWIS, K. Persister cells, dormancy and infectious disease. **Nature Rev Microbiol**. v. 5, n. 1, p. 48-56, 2007. doi: 10.1038/nrmicro1557
- LEYS, N.M.; BASTIENS, L.; VERSTRAETE, W.; et al. Influence of the carbon/nitrogen/phosphorus ration on polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by *Mycobacterium* and *Sphingomonas* in soil. **Appl Environ Biotechnol**. v. 66, n. 6, p. 726-736, 2005.
- LYNCH, A.S. Efflux systems in bacterial pathogens: an opportunity for therapeutic intervention? An industry view. **Biochem Pharmacol**. v. 71, n. 7, p. 949-956, 2006. doi: 10.1016/j.bcp.2005.10.021
- MUTUKU, C.; GAZDAG, Z.; MELEGH, S. Occurrence of antibiotics and bacterial resistance genes in wastewater: resistance mechanisms and antimicrobial resistance control approaches. **World J Microbiol Biotechnol**. v. 38, n. 9, p. 152, 2022. doi: 10.1007/s11274-022-03334-0
- QIN, S.; XIAO, W.; ZHOU, C.; et al. *Pseudomonas aeruginosa*: Pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. **Signal Transduct Target Ther**. v. 7, n. 1, p. 199, 2022, doi: 10.1038/s41392-022-01056-1
- RASAMIRAVAKA, T.; LABTANI, Q.; DUEZ, P.; et al. The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: a review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. **BioMed Res Int**. v. 2015, n. 2015, p. 759348, 2015, doi: 10.1155/2015/759348
- REYES-LARA, S.; REYES-MAZZOCO, R. Effect of hydraulic and organic loads on the mass removal of a structured packing in a trickling filter. **Rev Mex Ing Quim**. v. 8, n. 1, p. 101-109, 2009.
- ROUSHAM, E.K.; UNICOMB, L.; ISLAM, M.A. Human, animal and environmental contributors to antibiotic resistance in low-resource settings: integrating behavioural,

epidemiological and One Health approaches. **Proceed Royal Soc B: Biol Sci.** v. 285, n. 1876, p. 20180332, 2018, doi:10.1098/rspb.2018.0332

TRIF, E.; CERBU, C.; OLAH, D. et al. Old antibiotics can learn new ways: a systematic review of florfenicol use in veterinary medicine and future perspectives using nanotechnology. **Animals.** v. 13, n. 10, p. 1695, 2023. doi: 10.3390/ani13101695

TUON, F.F.; DANTAS, L.R.; SUSS, P.H.; et al. Pathogenesis of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: A review. **Pathogens.** v. 11, n. 3, p. 300, 2022, doi: 10.3390/pathogens11030300

VETRIVEL, A.; RAMASAMY, M.; VETRIVEL, P.; et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and its control. **Biologics.** v. 1, n. 3, p. 312–336, 2021, doi: 10.3390/biologics1030019

VON WINTERSDORFF, C.J.H.; PENDERSJ.; VAN NIEKERK, J.M.; et al. Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. **Front Microbiol.** v. 7, p. 173, 2016, doi: 10.3389/fmicb.2016.00173

ZHU, K.; CHEN, S.; SYSOEVA, T.A.; et al. Universal antibiotic tolerance arising from antibiotic-triggered accumulation of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa*. **PLoS Biol.** v. 17, n. 12, p. e3000573, 2019, doi: 10.1371/journal.pbio.3000573