

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Marcelo Airton Silva de Oliveira

**ANÁLISE FENOTÍPICA DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE E PH
EM AGLUTINAÇÕES DE ENTEROBACTÉRIAS PRODUTORAS DE FÍMBRIA
TIPO 1**

Porto Alegre

2023

Marcelo Airton Silva de Oliveira

**ANÁLISE FENOTÍPICA DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE E PH
EM AGLUTINAÇÕES DE ENTEROBACTÉRIAS PRODUTORAS DE FÍMBRIA
TIPO 1**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Gertrudes Corção

Porto Alegre

2023

CIP - Catalogação na Publicação

Silva de Oliveira, Marcelo Airton
ANÁLISE FENOTÍPICA DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE
GLICOSE E PH EM AGLUTINAÇÕES DE ENTEROBACTÉRIAS
PRODUTORAS DE FÍMBRIA TIPO 1 / Marcelo Airton Silva de
Oliveira. -- 2023.
42 f.
Orientadora: Gertrudes Corção.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina,
Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Escherichia coli. 2. Fímbria. 3. Microrganismo.
4. Interação. 5. Fator de virulência. I. Corção,
Gertrudes, orient. II. Título.

Marcelo Airton Silva de Oliveira

**ANÁLISE FENOTÍPICA DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE E PH
EM AGLUTINAÇÕES DE ENTEROBACTÉRIAS PRODUTORAS DE FÍMBRIA
TIPO 1**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Aprovado em: 23 de março de 2023.

BANCA EXAMINADORA

M^a Mariana Preussler Mott - UFCSPA

Prof^ª. Dr^a Sueli Teresinha Van Der Sand - UFRGS

Prof^ª. Dr^a Gertrudes Corção - UFRGS

Dedico este trabalho à minha família, aos meus amigos e demais pessoas que me mantiveram determinado durante toda a graduação.

RESUMO

As bactérias possuem estruturas celulares que conferem vantagens para a sua sobrevivência tanto no hospedeiro como ambiente. Um grupo destas estruturas, denominado fímbrias adesinas, são capazes de se aderirem ao substrato ou ao organismo hospedeiro contribuindo para a colonização e a infecção do hospedeiro, assim como desempenham um papel importante na população bacteriana por meio de interações entre os microrganismos. Neste trabalho é apresentada a importância dessas estruturas, que fazem parte de um grupo de fatores de virulência bacteriana, sua estrutura molecular e síntese. Além disso, foi realizada a investigação se fatores externos associados ao meio de cultivo, como pH e concentração de glicose, influenciam na aglutinação de fímbrias adesinas tipo 1. Para isto, *pools* bacterianos de *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. e *Proteus mirabilis* crescidos em diferentes concentrações de glicose e pHs foram analisados quanto a capacidade de aglutinação com suspensão de mananoligossacarídeos. Os resultados obtidos demonstram que tais fatores como concentração de glicose e mudanças de pH não apresentaram correlação com o processo de aglutinação associado deste fator de virulência e que mais estudos são necessários para avaliar este fenômeno.

Palavras-chave: *Escherichia coli*; fímbria; microrganismo; interação; fator de virulência.

ABSTRACT

Bacteria possess cellular structures that confer advantages for their survival in both the host and the environment. A group of these structures, called adhesin fimbriae, are capable of adhering to the substrate or the host organism, contributing to the colonization and infection of the host, as well as playing an important role in the bacterial population through interactions between microorganisms. This work presents the importance of these structures, which are part of a group of bacterial virulence factors, their molecular structure and synthesis. In addition, an investigation was carried out to determine whether external factors associated with the culture medium, such as pH and glucose concentration, influence the agglutination of type 1 adhesin fimbriae. For this, bacterial pools of *Escherichia coli*, *Salmonella sp.* and *Proteus mirabilis* grown at different glucose concentrations and pHs were analyzed for agglutination capacity with mannanoligosaccharide suspension. The results obtained demonstrate that such factors as glucose concentration and pH changes did not correlate with the agglutination process associated with this virulence factor and that further studies are needed to evaluate this phenomenon.

Keywords: *Escherichia coli*; fimbriae; microorganism; interaction; virulence factor.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO COMPREENSIVA	8
1.1 Bactérias e fatores de virulência	8
1.2 Tipos de fímbrias	8
1.3 Mecanismo de expressão gênica das fímbrias	9
1.4 Interações de fímbrias em comunidades bacterianas	10
1.5 Infecções relacionadas com bactérias que apresentam fímbrias	10
1.6 Terapias associadas ao fator de virulência	11
1.7 JUSTIFICATIVA	11
1.8 OBJETIVOS	12
1.8.1 Objetivo geral	12
1.8.2 Objetivos específicos	12
2 ARTIGO CIENTÍFICO	13
3 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	25
REFERÊNCIAS	26
ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA	29

1 INTRODUÇÃO COMPREENSIVA

1.1 BACTÉRIAS E FATORES DE VIRULÊNCIA

As bactérias são as formas de vida mais abundantes conhecidas no planeta. Diante de tanta competição, é necessário aumentar suas chances de se manter no ambiente. As bactérias tanto patogênicas quanto não prejudiciais à saúde humana, possuem características específicas para enfrentar esta dificuldade, denominadas de fatores de virulência. Alguns exemplos destes fatores de virulência são a capacidade de desenvolver biofilmes, que são agregados celulares envoltos de uma matriz extracelular capazes de produzir estruturas que confirmam uma maior resistência do microrganismo frente a utilização de compostos tóxicos e inibição de uma resposta imunológica do hospedeiro pela dificuldade à fagocitose ao biofilme (TORTORA et al., 2017). Outro fator de virulência pode ser a produção de flagelos, que são estruturas capazes de promover a locomoção da célula e assim escapar da defesa imunológica ou promover a quimiotaxia e busca de nutrientes (TORTORA et al., 2017). A cápsula é uma estrutura formada por polissacarídeos e por polipeptídeos firmemente aderida à parede celular bacteriana e é capaz de conferir adesão ao substrato ou ao hospedeiro e também dificultar a fagocitose (TORTORA et al., 2017). Também é possível encontrar em bactérias as pili sexuais e as fímbrias, que possuem estrutura semelhante, mas com funções diferentes. Enquanto a primeira possui a função de promover a troca de plasmídeos entre células adjacentes, as fímbrias, dependendo da sua estrutura, possuem um papel mais amplo na célula, pois está envolvida no mecanismo de invasão celular, na evasão de mecanismos de defesa do hospedeiro, promovem a formação de biofilme, além de motilidade celular (SAUER; REMAUT; HULTGREN; WAKSMAN, 2004). Diante de sua capacidade em realizar múltiplas contribuições para o metabolismo bacterianos, é importante que se compreenda melhor a ação desta estrutura. Neste trabalho será abordada a importância das fímbrias adesinas e seu efeito associado com mananoligossacarídeos em diferentes condições laboratoriais de cultivo.

1.2 TIPOS DE FÍMBRIAS

As fímbrias são estruturas formadas por proteínas e podem estar distribuídas em regiões específicas ou em toda a superfície celular e são capazes de realizar ações que indiretamente favoreçam a obtenção de nutrientes e colonização de seus hospedeiros através da adesão do qual este fator de virulência está envolvido (TORTORA et al., 2017). Estas estruturas podem ser classificadas conforme suas vias de síntese: fímbrias *chaperone-usher* tipo 1 e tipo P, tipo

IV, tipo V, fibra curli e fap, tipo IV de secreção e conjugativa, assim como fímbria mediada por sortease. Aqui, abordaremos os dois primeiros tipos de fímbrias, pois estas são as mais presentes em populações de bactérias Gram-negativas (SAUER; REMAUT; HULTGREN; WAKSMAN, 2004).

As fímbrias *chaperone-usher* são as mais frequentemente encontradas nos gêneros *Escherichia*, *Salmonella* e *Proteus*. Este tipo de fímbria é formado por diversas subunidades e requer pelo menos duas proteínas principais para a sua formação: a chaperona, que estabiliza as subunidades das fímbrias e a proteína ligadora, que forma uma plataforma na membrana externa celular para ser possível a síntese das subunidades da fímbria (THANASSI; SAULINO; HULTGREN, 1998). Elas podem ser divididas em dois grupos, tipo 1 e tipo P. As fímbrias tipo 1 da *E. coli* uropatogênica ligam-se aos receptores do urotélio da bexiga, enquanto que as fímbrias tipo P ligam-se aos receptores do epitélio dos rins (SAUER; REMAUT; HULTGREN; WAKSMAN, 2004).

Outras fibras também estão descritas como pertencentes a *Escherichia coli*, tais como as fímbrias tipo M e a tipo S em infecções não relacionadas ao trato intestinal (BRITO; VIDOTTO; BERBEL; TAGLIARI, 2004; ZAMANI; SALEHZADEH, 2018). Entretanto, as fímbrias tipo 1 e tipo P são as de maior importância clínica devido a sua atuação no processo de colonização do trato gastrointestinal de humanos e outros animais.

1.3 MECANISMO DE EXPRESSÃO GÊNICA DAS FÍMBRIAS

As fímbrias bacterianas são formadas por um grupo de genes que produzem subunidades diferentes, denominado de operon fim. A expressão resulta na síntese de diversos polímeros das subunidades do pilus, que se organizam em filamentos rígidos, flexíveis ou em forma de haste. Em *Escherichia coli*, encontram-se nas fímbrias tipo 1 e tipo P a forma de haste. A fímbria tipo 1 é formada por uma região de ancoramento na membrana celular pela subunidade FimD, uma haste helicoidal longa e rígida composta por milhares de subunidades FimA associadas com a chaperona FimC, na sua parte superior encontra-se uma região flexível adaptadora formada por FimG e FimF e uma adesina FimH. Esta estrutura interage por ligações não-covalentes e proporciona proteção contra perda de função da fímbria por ser resistente e evitar quebras, além de proporcionar um movimento de elasticidade. (LUKASZCZYK; PRADHAN; REMAUT, 2019)

O operon fim tem a capacidade de estar na forma ativada e desativada. A subunidade responsável por esta troca de mudança de fase de expressão da fímbria é a porção *fimS*, uma

região promotora do operon que controla os genes *fimA-fimH* e por recombinases codificadas pelos genes *fimB* e *fimE*, localizadas na região upstream da região *fimS*. Esta capacidade de variação de fase do operon provoca o aparecimento de uma população bacteriana mista de bactérias que apresentam e que não apresentam fímbrias (PUSZ et al., 2014). Este efeito pode estar relacionado com o local de infecção e estratégia de escape de mecanismos de defesa do hospedeiro.

1.4 INTERAÇÕES DE FÍMBRIAS EM COMUNIDADES BACTERIANAS

Em uma comunidade bacteriana pode haver bactérias de um mesmo gênero que não apresentam fímbrias e bactérias que apresentam. Isso acontece devido ao efeito de troca de fase da expressão do operon *fim*, o responsável pela síntese das fímbrias. Portanto, pode haver uma parte da população com o operon na fase ativado onde há a expressão e outra população com o operon na fase não ativado, onde não há a síntese das subunidades formadores da fímbria. Além disso, pode-se encontrar bactérias que apresentam todos os genes do operon mas que não expressam a fímbria tipo 1, assim como bactérias que não apresentam todos os genes necessários para a síntese das fímbrias adesinas. Este efeito pode estar relacionado com a adaptação da bactéria ao hospedeiro por colonização em diferentes porções do trato gastrointestinal (PUSZ et al., 2014).

1.5 INFECÇÕES RELACIONADAS COM BACTÉRIAS QUE APRESENTAM FÍMBRIAS

As fímbrias bacterianas da *E.coli* estão envolvidas no processo de infecção e colonização do hospedeiro através da adesão da subunidade FimH da fímbria tipo 1 aos receptores D-manosilados das células presentes na bexiga humana. As fímbrias adesinas tipo P estão envolvidas na adesão ao epitélio dos rins na região dos esfingolipídios que contêm galabiose para a ligação da subunidade PapG (SAUER; REMAUT; HULTGREN; WAKSMAN, 2004).

As bactérias capazes de produzir fímbrias necessitam de condições favoráveis para estabelecer a sua adesão e as características do hospedeiro possuem grande importância durante este processo. As infecções do trato urinário estão frequentemente associadas às mulheres devido a presença de diversas bactérias gram-negativas na microbiota urogenital que concomitantemente com hábitos incorretos de higiene, favorecem a infecção por microrganismos patogênicos (HOOTON, 2001). Outra característica é quando há a presença de pielonefrite, a adesão das bactérias ao epitélio se demonstra mais frequente do que pacientes

com bacteriúria assintomática. Também se observou que pessoas que não possuem o antígeno P nos eritrócitos e bactérias que apresentam a fímbria P não aderem ao epitélio nem às células sanguíneas destas pessoas.

1.6 TERAPIAS ASSOCIADAS AO FATOR DE VIRULÊNCIA

As fímbrias são estruturas que ajudam a promover o processo infeccioso no trato urinário e gástrico no hospedeiro, além de promover meningite e sepse (PROFT; BAKER, 2008). Portanto, é necessário que se desenvolvam estudos e terapias associadas a este fator de virulência para que seja realizada uma terapia mais adequada ao paciente.

Tem-se utilizado de técnicas para evitar a aderência das fímbrias bacterianas como competidores de FimH como o manosídeo alfa-D-manose (Cusumano et al. 2011; SPAULDING et al., 2017) assim como a atenuação da biogênese da fímbria por moléculas pilicidas como a 2-piridona bicíclica (PINKNER et al., 2006) e pela quebra de ligações entre as subunidades da fímbria por utilização de ácidos orgânicos (LO et al., 2013). Essas terapias podem ajudar a evitar o surgimento de uma resistência aos antibióticos por serem mais específicas ao fator de virulência relacionada à adesão de uma bactéria uropatogênica. Entretanto, a utilização de alternativas específicas somente para a fímbria bacteriana também não é eficaz pois na comunidade bacteriana pode haver populações em que não são expressas as fímbrias e suas subunidades, devido ao efeito de mudança de troca de fase do operon fim (PUSZ et al., 2014).

1.7 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista que as bactérias possuem diversas estruturas consideradas fatores de virulência que podem contribuir para invasão dos tecidos do hospedeiro, permanência no hospedeiro e desencadear processos infecciosos, é importante conhecer seu efeito durante este processo, bem como o mecanismo de ação e síntese destas estruturas, além de vantagens que estes elementos oferecem ao microrganismo que possui este fator de virulência. Este trabalho aborda temas relevantes para a compreensão destas estruturas que são fundamentais para o desencadeamento não só de doenças, mas também da própria sobrevivência do microrganismo em seu ambiente competitivo. No presente estudo, abordamos sob um ponto de vista funcional do papel das fímbrias adesinas, realizando experimentos que envolveram a ação destas estruturas em seu aspecto funcional, a partir de investigações do efeito de aglutinação de

mananligossacarídeos com enterobactérias Gram negativas em diferentes condições de crescimento.

1.8 OBJETIVOS

1.8.1 Objetivo geral

Verificar a capacidade de aglutinação com mananligossacarídeos de cepas bacterianas crescidas em diferentes condições de pH e concentrações de glicose.

1.8.2 Objetivos específicos

a) Reisolar cepas bacterianas previamente obtidas de amostras de excretas animais e realizar sua identificação por MALDI mTOF.

b) Analisar a capacidade de aglutinação destas cepas com mananligossacarídeo (MOS) quando cultivadas nas condições de pH neutro e ausência de glicose.

c) Analisar a capacidade de aglutinação destas cepas com mananligossacarídeo (MOS) quando cultivadas nas condições de diferentes pH e concentrações de glicose.

2 ARTIGO CIENTÍFICO

ANÁLISE FENOTÍPICA DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE E PH EM AGLUTINAÇÕES DE ENTEROBACTÉRIAS PRODUTORAS DE FÍMBRIA TIPO 1

Marcelo Airton Silva de Oliveira¹, Gertrudes Corção¹

¹ Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Sarmiento Leite 500, 90050-170, Porto Alegre, Brasil.

RESUMO

Certos grupos de microrganismos desenvolvem mecanismos capazes de aumentar sua chance de nutrição e de colonização em seus hospedeiros. As fímbrias adesivas são estruturas da parte externa de células procarióticas que auxiliam a bactéria na adesão ao hospedeiro sendo um fator de virulência muito importante para sua patogenicidade. Através de experimentos envolvendo bactérias *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. e *Proteus mirabilis* com expressão de fímbrias tipo 1, foi realizado um estudo para investigar se mudanças em condições do crescimento como concentração de glicose e concentração de pH, afetam o nível de aglutinações de *pools* bacterianos destes grupos de bactérias. Os resultados, envolvendo análise de aglutinações após crescimento em diferentes concentrações de glicose (0%, 0,1%, 0,5% e 1%), além de diferentes pH (7,0; 6,0; 5,0 e 4,0) apontam que mudanças nas condições de cultivo *in vitro* não influenciam na formação de aglutinações dos grupos de bactérias analisadas. Outros estudos com diferentes metodologias devem ser feitos para melhor avaliar a dinâmica de interação destes grupos de bactérias e os efeitos na expressão deste fator de virulência.

Palavras-chave: fímbria, aglutinação, pH, glicose, interação microbiana

INTRODUÇÃO

As fímbrias são estruturas de grande importância que contribuem para a sobrevivência de bactérias no hospedeiro. Elas têm a função de promover adesão ao substrato, ao hospedeiro e a locais mais favoráveis para que a bactéria possa se desenvolver-. Alguns tipos de fímbrias também estão associados à troca de material genético, conhecidas como pili sexuais, que estão relacionadas à troca de informação genética horizontal entre uma população bacteriana em equilíbrio e com relações harmônicas de mutualismo. Também é conhecido o papel destas estruturas no desenvolvimento de biofilmes (TORTORA et al., 2017).

A presença de fímbrias em células bacterianas pode ser confirmada através de um microscópio eletrônico de varredura que realiza o imageamento das estruturas externas da célula procariótica investigada. Também pode-se realizar a detecção de genes responsáveis pela produção destas proteínas adesinas através da técnica de amplificação gênica por PCR. Entre os de maior relevância, estão os genes fimH e o fimA que codificam subunidades de extrema importância para a estrutura quaternária da fímbria. Alternativamente, pode-se utilizar uma maneira mais prática de relacionar a produção de fímbrias adesivas através de aglutinação com mananopolissacarídeos os quais interagem com os epítomos de lectina das fímbrias bacterianas tipo 1 (BOROWSKY; CORÇÃO; CARDOSO, 2009).

As condições experimentais são de extrema importância para a correta execução da metodologia. Modificações neste processo podem influenciar no metabolismo bacteriano e no desenvolvimento das fímbrias. Por exemplo, ao realizar mudanças no pH do cultivo, pode-se alterar o desenvolvimento da população bacteriana. A partir destas mudanças, interações microbianas intra e interespecíficas podem provocar estabilização ou um colapso da população causada por diversos fatores como competição de recursos ou produção de toxinas, a partir de captação de recursos e excreção metabólitos. Portanto, o efeito do pH pode ser uma condição laboratorial útil para a observação da dinâmica complexa que possuem as populações bacterianas (FRIEDMAN; GORE, 2017).

A expressão de fímbrias bacterianas ocorre em ambientes propícios para o seu desenvolvimento. Há estudos que demonstram que a produção destas estruturas pode ser estimulada ou inibida conforme fatores ambientais e de cultivo laboratorial (KLASA; KęDZIERSKA; GRZYMAJŁO, 2020). Alguns destes fatores que afetam a produção de fímbrias são quantidade de passagens seriadas em meio de cultivo, incubação em meio líquido com agitação, crescimento em ágar sólido e fase de crescimento em que o cultivo se encontra – na fase estacionária ocorre maior expressão. Enquanto a maioria destas condições desfavorecem a

produção destas estruturas, um maior número de passagens em meio líquido estático com pH adequado favorecem a síntese de fímbrias.

As fímbrias bacterianas possuem grande importância no ambiente gastrointestinal. Elas proporcionam que a adesão da bactéria ao epitélio e que esta não seja excretada junto com o conteúdo intestinal e proporcionam vantagens sobre outras bactérias por estabelecer adesão em porções do trato gastrointestinal mais apropriadas ao desenvolvimento bacteriano. As bactérias *Escherichia coli* e *Salmonella enterica* são conhecidas por terem a capacidade de infectar muitos animais, porém, algumas cepas dessas bactérias conseguem infectar somente uma espécie de animal ou alguma porção específica do intestino. Esta especificidade pode estar relacionada com os diferentes tipos de fímbrias e os diferentes receptores encontrados no epitélio intestinal (A EDWARDS; PUENTE, 1998).

As bactérias encontradas na natureza também expressam fímbrias para poderem aderir-se às superfícies (A EDWARDS; PUENTE, 1998). Os fatores ambientais podem contribuir para a fisiologia bacteriana e para a expressão de genes reguladores da expressão de fímbrias adesinas (MATHELIÉ-GUINLET et al., 2021). Algumas condições ambientais relacionadas com a expressão diferencial dos genes codificadores das fímbrias são as forças mecânicas exercidas sobre as fímbrias, estresse oxidativo, osmótico, de pH, temperatura e ausência de nutrientes que a bactéria possa utilizar. (BESSAIAH et al., 2021).

No presente estudo, para entendermos melhor o efeito das mudanças na capacidade de aglutinação de *pools* bacterianos e sua possível influência na síntese de fímbrias, foram realizadas diferentes abordagens práticas no quesito de condições de cultivo envolvendo grupos de bactérias Gram negativas que apresentavam fenótipo de aglutinação positiva com mananoglicosacarídeo (MOS) e de grupos que não apresentavam esta característica. Estas bactérias, identificadas como *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. e *Proteus mirabilis* através de seleção em meios diferenciais cromogênicos e por MALDI-TOF, foram previamente isoladas de diferentes amostras de excreta de animais e utilizadas para o estudo. Foram utilizados meios de cultivo com diferentes concentrações de glicose e diferentes faixas de pH que alteraram a capacidade de aglutinação das cepas.

MATERIAIS E MÉTODOS

ISOLADOS BACTERIANOS

Foram utilizados isolados bacterianos previamente isolados de amostras de animais provenientes de granjas. As bactérias utilizadas estavam preservadas em meio Skim Milk ou

estavam como colônias isoladas em meios de CFA e EMB. Após purificação dos isolados sua identificação foi confirmada através de análise por MALDI-TOF. Neste trabalho, foram utilizadas cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. e *Proteus mirabilis*.

Os *pools* bacterianos foram selecionados conforme sua capacidade de aglutinação individual com o mananoligossacarídeo e ao gênero bacteriano. Foram selecionados 4 *pools* de *Escherichia coli* que apresentavam aglutinação (EC+1, EC +2, Ec+3 e EC+4) , 2 *pools* de *E. coli* que não apresentavam aglutinação (EC-1, EC-2), 1 *pool* de *Salmonella* sp. (*Salmonella* +) e um de *P. mirabilis* (*Proteus* +) que apresentavam aglutinação e que não apresentavam aglutinação, (*Salmonella* -) e (*Proteus* -). Cada *pool* bacteriano de *E. coli*, *Salmonella* sp. e de *P. mirabilis* possuem 5, 3 e 2 isolados bacterianos, respectivamente.

CAPACIDADE DE AGLUTINAÇÃO COM MANANOLIGOSSACARIDEO DOS ISOLADOS BACTERIANOS EM CONDIÇÕES NORMAIS DO MEIO DE CULTIVO CFA

As cepas identificadas foram semeadas ágar Trypticaseína de soja (TSA), incubadas a 37 °C durante o período *overnight*. Posteriormente foram semeadas em caldo Trypticaseína de soja (TSB), incubadas à 37 °C durante 4 horas e 10 µL deste crescimento foram semeados em meio de cultivo CFA e incubados em estufa de 37 °C *overnight*.

A aglutinação foi realizada em microplaca de 96 poços contendo 50 µL de salina 0,9%, 50 µL de suspensão de (MOS) SafMannan 0,24% e 50 µL de bactéria do meio de cultivo de interesse ajustada em 0,5 em escala McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) que foi armazenada *overnight* a 12 °C. As aglutinações foram observadas em microscópio óptico com lente 100x a partir de uma alíquota de 25 µL de cada poço transferidas para lâminas de vidro. As contagens das aglutinações foram realizadas em duas alíquotas da suspensão, onde vários campos de cada alíquota foram analisados.

CAPACIDADE DE AGLUTINAÇÃO COM MOS DOS *POOLS* BACTERIANOS APÓS CRESCIMENTO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GLICOSE

As bactérias isoladas foram agrupadas em *pools* bacterianos separados pelo gênero bacteriano e sua capacidade ou não de formar aglutinações após crescimento em ágar CFA. Esses *pools* bacterianos foram semeados em meio TSB, incubadas à 37 °C durante 4 horas e 10 µL deste crescimento foram semeados em meio de cultivo CFA sem extrato de levedura com

concentrações de 0%, 0,1%, 0,5% e 1% de glicose e incubados em estufa de 37 °C *overnight*. Após foi realizado o preparo da aglutinação, como descrito anteriormente, em microplaca e visualizado em microscopia óptica aumento 100x.

CAPACIDADE DE AGLUTINAÇÃO COM MOS DOS *POOLS* BACTERIANOS APÓS CRESCIMENTO EM DIFERENTES pHs

As bactérias isoladas foram agrupadas em *pools* bacterianos, como descrito anteriormente, semeadas em meio TSB, incubadas à 37 °C durante 4 horas. Deste crescimento, 10 µL foram semeados em meio de cultivo CFA de pH 7,0; 6,0; 5,0 e 4,0 e incubados em estufa de 37 °C *overnight*. Após foi realizado o preparo em microplaca da aglutinação e visualizado em microscopia óptica aumento 100x.

Devido a dificuldades na padronização das metodologias, este foi um estudo meramente observacional, onde apenas o processo fenotípico de produção de fimbrias do tipo 1 foi levado em consideração. Devido a dificuldades em se obter as repetições, análises estatísticas não puderam ser realizadas e as observações foram todas consideradas na totalidade dos *pools*.

RESULTADOS

ALTERAÇÕES NO PADRÃO DE AGLUTINAÇÕES DE *POOLS* BACTERIANOS APÓS CULTIVO EM ÁGAR CFA NAS CONDIÇÕES NORMAIS

Durante os experimentos de aglutinação, alguns *pools* de bactérias não apresentaram a mesma característica em comparação com sua análise individual. Um exemplo deste efeito foi a aglutinação positiva de um isolado de *Escherichia coli* em uma análise individual e uma aglutinação negativa do *pool* de bactérias do qual este isolado fazia parte (EC+3) (Tabela 1 e figura 1). Isto também foi observado para os *pools* de *Salmonella* + e *Proteus* + (Tabela 1).

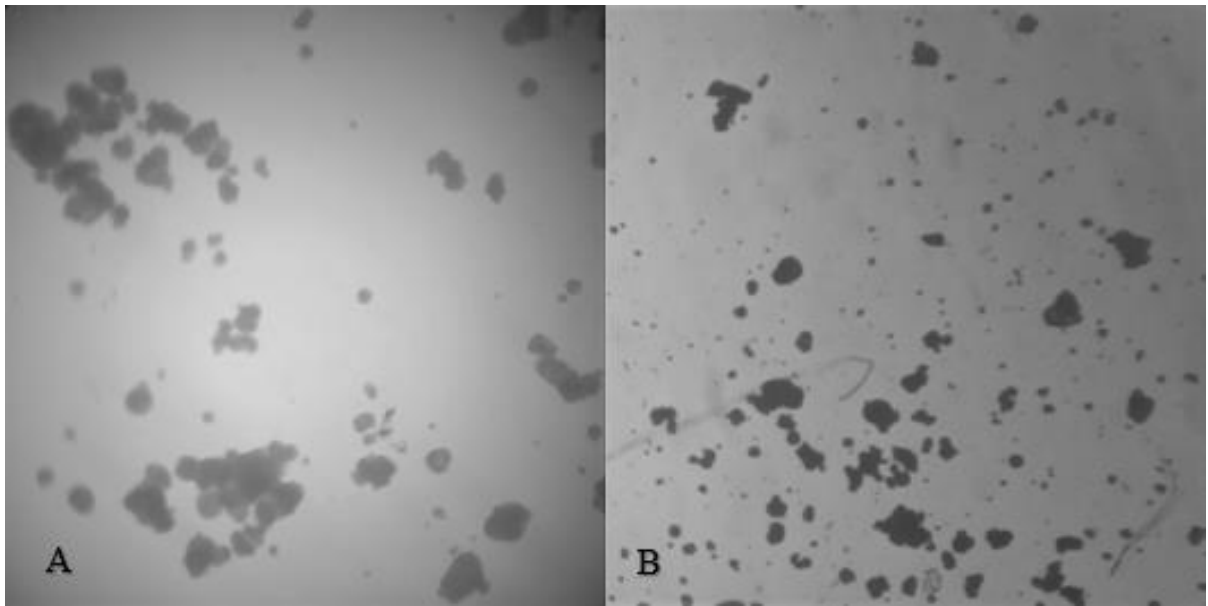


Figura 1 - Efeito de aglutinação positiva de um isolado bacteriano (A) e efeito de aglutinação negativa ao ser adicionado a um pool com outros microrganismos que também aglutinam (B).

Tabela 1 – Número de aglutinações observadas a partir de crescimento em CFA com diferentes concentrações de glicose.

<i>Pool</i>	CFA	0%	0,1%	0,5%	1%
EC+1	5	0	2	5	4
EC+2	2	0	0	0	0
EC+3	0	0	0	0	0
EC+4	3	0	2	0	0
Total	10	0	4	5	4
EC-1	0	0	0	0	1
EC-2	0	0	0	0	1
Total	0	0	0	0	2
<i>Proteus</i> +	0	0	0	0	0
<i>Proteus</i> -	0	0	0	0	0
<i>Salmonella</i> +	0	0	0	0	0
<i>Salmonella</i> -	0	0	0	0	0

AGLUTINAÇÕES EM MEIO DE CULTIVO CFA COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GLICOSE

No experimento de aglutinação de *pools* bacterianos foi investigado se a glicose poderia influenciar na formação destas estruturas nos meios de CFA e CFA sem extrato de levedura com concentrações de 0%, 0,1%, 0,5% e 1% de glicose. Foi observado aglutinações mais numerosas no meio CFA padrão do que em outras condições, em alguns *pools* com *Escherichia coli*, EC+1, EC+2 e EC+3 (tabela 1).

Na tabela 1, o *pool* de *E. coli* positivo para aglutinação 1 (EC+1) apresentou diminuição da aglutinação em todas as concentrações e também na ausência de glicose e extrato de levedura, exceto na concentração de 0,5% de glicose, que se manteve o mesmo. Já o *pool* de *E. coli* positivo para aglutinação 2 (EC+2) teve diminuição total da aglutinação em todas as condições em comparação com o controle de CFA. O terceiro grupo de bactérias que produziam aglutinação individuais, não produziram aglutinações em nenhuma condição quando em grupo. Entretanto, o *pool* de *E. coli* positivo para aglutinação 4 (EC+4) apresentou uma leve diminuição na condição de 0,1% de glicose em relação ao controle. Os *pools* bacterianos negativos para aglutinação de *E. coli* 1 e 2 apresentaram uma aglutinação cada somente na condição de CFA sem levedura 1% de glicose. Portanto, com a concentração de 1% de glicose, houve a formação de aglutinação em um grupo que individualmente não apresentava este efeito. Os grupos de *Salmonella* sp. e *Proteus* sp. não apresentaram nenhum efeito de aglutinação em nenhuma condição analisada.

AGLUTINAÇÕES EM MEIO DE CULTIVO CFA COM DIFERENTES pHs

No experimento de aglutinação de *pools* bacterianos foi investigado se o pH poderia influenciar a formação destas estruturas nos meios de CFA pH 4, 5, 6 e 7. Durante este experimento, dos 10 *pools* avaliados, em somente 3 pode-se observar alteração na aglutinação (tabela 2). Além disso, alguns grupos de bactérias não apresentaram crescimento em CFA na condição de pH 4.

Na tabela 2, o *pool* de *Escherichia coli* positivo para aglutinação 1 (EC+1), comparado com o controle CFA pH 7, sofreu diminuição pela metade nas aglutinações no pH 4 e pH 6. Já o segundo grupo de bactérias positivas para aglutinação, não apresentou nenhuma aglutinação e não cresceu no pH 4. O terceiro grupo positivo apresentou um efeito somente no pH 4 e o quarto *pool* de bactérias apresentou um maior efeito no pH 6. Os demais grupos se mantiveram com aglutinações nulas em todas as condições.

Tabela 2 – Número de aglutinações a partir de crescimento em CFA com diferentes valores de pH.

<i>Pool</i>	pH 7	pH 6	pH 5	pH 4
EC+1	4	2	4	2
EC+2	0	0	0	Não cresceu
EC+3	0	0	0	1
EC+4	2	3	0	2
Total	6	5	4	5
EC-1	0	0	0	0
EC-2	0	0	0	Não cresceu
<i>Proteus</i> +	0	0	0	0
<i>Proteus</i> -	0	0	0	0
<i>Salmonella</i> +	0	0	0	0
<i>Salmonella</i> -	0	0	0	0

DISCUSSÃO

As bactérias possuem diversas maneiras de se adaptarem ao ambiente. Uma característica de microrganismos patogênicos é a possibilidade de apresentarem fatores de virulência como por exemplo, fímbrias adesivas. Estas estruturas são capazes de se ligarem a células eucarióticas e são componente importante no processo de infecção do trato digestório e urinário em animais. As fímbrias também estão envolvidas com a adesão a superfícies e a substratos que garantem maior acesso a nutrientes e proteção das adversidades do ambiente (TORTORA et al., 2017). A investigação da ação destas estruturas pode ser importante para determinar o quanto um microrganismo pode ser danoso ao seu hospedeiro.

Gêneros de bactérias como *Escherichia* sp., *Salmonella* sp. e *Proteus* sp. são frequentemente relacionadas com estas estruturas e foram selecionadas para o estudo quanto a sua capacidade de formação de fímbrias. A partir de amostras de excretas de animais provenientes de granjas da região do Rio Grande do Sul, foram isolados estes grupos de bactérias e avaliado quanto a sua capacidade de aderir e de não aderir a um substrato composto por extrato de leveduras. Este substrato é utilizado como um suplemento alimentar para aves, bovinos, suínos e outros animais de interesse pecuário para a diminuição de administração de

antibióticos pois bactérias do trato digestivo destes animais se aderem a este substrato e são excretadas, evitando um possível desequilíbrio da microbiota.

Um produto comercial a base de mananoligossacarídeo e beta-glucanos foi utilizado para a realização de experimentos envolvendo aglutinações bacterianas, obtidos de frações da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Pela capacidade de fímbrias tipo 1 ligarem-se a estas moléculas, foi proposto que bactérias que apresentassem o efeito de aglutinação positiva indicaria uma expressão deste fator de virulência, enquanto que bactérias que não apresentavam este efeito, não estariam expressando. Consequentemente, esta proposta também foi sugerida para *pools* bacterianos e ser possível investigar se as aglutinações coletivas teriam um efeito diferente das aglutinações de bactérias individuais.

Sabe-se que a glicose é uma das principais fontes de energia para as bactérias. Uma maior concentração de glicose e de outros nutrientes pode garantir um ambiente que favoreça a produção de estruturas e metabólitos secundários, além de divisão celular. Foi realizado experimentos que visam avaliar o efeito da glicose na formação de aglutinações de grupos de células previamente classificadas como produtoras e não produtoras deste efeito.

O pH é um fator determinante na sobrevivência de microrganismos e variações podem conferir um efeito prejudicial devido a possibilidade de rompimento da estrutura celular e, por conseguinte, inviabilidade da bactéria. Assim, a investigação das variações do pH pode contribuir para avaliar a produção de aglutinações e determinar em que ponto ocorre um maior número de aglutinações bacterianas.

Pelas observações feitas neste estudo, a presença de glicose no cultivo das *E. coli* levou a uma diminuição no número de aglutinações. Por outro lado, para esta mesma bactéria, a alteração no pH não influenciou no processo de aglutinação. No caso das bactérias *Salmonella* e *Proteus*, a ausência de aglutinação quando as bactérias foram juntadas em "pools", é uma indicação que este processo "in vitro" pode ser influenciado pela presença de cepas bacterianas distintas competindo pelo mesmo substrato.

Portanto outros estudos devem ser realizados para investigar melhor o papel da ação da alteração da glicose e do pH na formação de aglutinações de *pools* bacterianos. Além disso, futuras pesquisas podem abordar o que cada microrganismo ou quais condições realizam cada tipo de aglutinação, como por exemplo, seu tamanho. Também pode-se investigar se cada tipo de aglutinação é formado por só uma expressão de fímbria ou se é um conjunto destas estruturas,

além de utilizar microscopia eletrônica de varredura para observação e PCR para avaliar a expressão gênica destas estruturas.

REFERÊNCIAS

BESSAIAH, Hicham; ANAMALÉ, Carole; SUNG, Jacqueline; DOZOIS, Charles M.. What Flips the Switch? Signals and Stress Regulating Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli Type 1 Fimbriae (Pili). **Microorganisms**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 5, 21 dez. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms10010005>.

BOROWSKY, Luciane; CORÇÃO, Gertrudes; CARDOSO, Marisa Ribeiro de Itapema. Mannanoglycosaccharide agglutination by Salmonella enterica strains isolated from carrier pigs. **Brazilian Journal of Microbiology**. São Paulo, SP. Vol. 40, p.458-464, set. 2009. <http://hdl.handle.net/10183/20852>.

A EDWARDS, Robert; PUENTE, José Luis. Fimbrial expression in enteric bacteria: a critical step in intestinal pathogenesis. **Trends In Microbiology**, [S.L.], v. 6, n. 7, p. 282-287, jul. 1998. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0966-842x\(98\)01288-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0966-842x(98)01288-8)

FRIEDMAN, Jonathan; GORE, Jeff. Ecological systems biology: the dynamics of interacting populations. **Current Opinion In Systems Biology**, [S.L.], v. 1, p. 114-121, fev. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coisb.2016.12.001>.

KLASA, Beata; KĘDZIERSKA, Anna Ewa; GRZYMAJÓ, Krzysztof. Pre-Growth Culture Conditions Affect Type 1 Fimbriae-Dependent Adhesion of Salmonella. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 21, n. 12, p. 4206, 12 jun. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21124206>.

LUKASZCZYK, Magdalena; PRADHAN, Brajabandhu; REMAUT, Han. The Biosynthesis and Structures of Bacterial Pili. **Subcellular Biochemistry**, [S.L.], p. 369-413, 2019. Springer International Publishing. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-030-18768-2_12.

MATHELIÉ-GUINLET, Marion; VIELA, Felipe; ALSTEENS, David; DUFRÊNE, Yves F.. Stress-Induced Catch-Bonds to Enhance Bacterial Adhesion. **Trends In Microbiology**, [S.L.], v. 29, n. 4, p. 286-288, abr. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2020.11.009>.

TORTORA, Gerard J. et al. Anatomia funcional de células procarióticas e eucarióticas. In: TORTORA, Gerard J. et al. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. Cap. 4. p. 72-106.

3 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste trabalho foi apresentada as características das fímbrias adesivas conforme sua função, síntese e importância como um fator de virulência fundamental para microrganismos patogênicos para a obtenção de nutrientes e também durante o processo de infecção, colonização em seus hospedeiros. Através dos experimentos apresentados neste trabalho, foi realizada uma análise fenotípica do efeito de aglutinação de bactérias do gênero *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. e *Proteus* sp. para correlacionar com a síntese de fímbrias adesivas. Com os resultados obtidos durante a pesquisa não foi possível afirmar que diferentes concentrações de glicose e diferentes condições de pH são capazes de influenciar no número de aglutinações em *pools* bacterianos. Outras abordagens com metodologias mais adequadas devem ser realizadas para determinar a ação destas estruturas em um contexto de interação microbiana e condições de cultivo.

REFERÊNCIAS

BESSAIAH, Hicham; ANAMALÉ, Carole; SUNG, Jacqueline; DOZOIS, Charles M.. What Flips the Switch? Signals and Stress Regulating Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli Type 1 Fimbriae (Pili). **Microorganisms**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 5, 21 dez. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms10010005>.

BOROWSKY, Luciane; CORÇÃO, Gertrudes; CARDOSO, Marisa Ribeiro de Itapema. Mannanoglicosaccharide agglutination by Salmonella enterica strains isolated from carrier pigs. **Brazilian Journal of Microbiology**. São Paulo, SP. Vol. 40, p.458-464, set. 2009. <http://hdl.handle.net/10183/20852>.

BRITO, Benito Guimarães de; VIDOTTO, Marilda Carlos; BERBEL, Milene Martins; TAGLIARI, Kelly Cristina. Fatores de virulência presentes em amostras de Escherichia coli uropatogênicas - UPEC para suínos. **Ciência Rural**, [S.L.], v. 34, n. 2, p. 645-652, abr. 2004. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-84782004000200050>.

CUSUMANO, C.K.; PINKNER, J.S., HAN, Z.; GREENE, S.E.; FORD, B.A.; CROWLEY, J.R.; HENDERSON, J.P.; JANETKA, J.W.; HULTGREN, S.J. Treatment and prevention of urinary tract infection with orally active FimH inhibitors. **Science Translational Medicine**, [S.L.], v. 3 n. 109, p. 109-115, 16 nov. 2011. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003021>

A EDWARDS, Robert; PUENTE, José Luis. Fimbrial expression in enteric bacteria: a critical step in intestinal pathogenesis. **Trends In Microbiology**, [S.L.], v. 6, n. 7, p. 282-287, jul. 1998. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0966-842x\(98\)01288-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0966-842x(98)01288-8)

FRIEDMAN, Jonathan; GORE, Jeff. Ecological systems biology: the dynamics of interacting populations. **Current Opinion In Systems Biology**, [S.L.], v. 1, p. 114-121, fev. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coisb.2016.12.001>.

HOOTON, Thomas M. Recurrent urinary tract infection in women. **International Journal Of Antimicrobial Agents**, [S.L.], v. 17, n. 4, p. 259-268, abr. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0924-8579\(00\)00350-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0924-8579(00)00350-2).

KLASA, Beata; KęDZIERSKA, Anna Ewa; GRZYMAJŁO, Krzysztof. Pre-Growth Culture Conditions Affect Type 1 Fimbriae-Dependent Adhesion of Salmonella. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 21, n. 12, p. 4206, 12 jun. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21124206>.

LO, Alvin W. H.; WATER, Karen van de; GANE, Paul J.; CHAN, A.W. Edith; STEADMAN, David; STEVENS, Kiri; SELWOOD, David L.; WAKSMAN, Gabriel; REMAUT, Han. Suppression of type 1 pilus assembly in uropathogenic Escherichia coli by chemical inhibition of subunit polymerization. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, [S.L.], v. 69, n. 4, p. 1017-1026, 8 dez. 2013. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkt467>.

LUKASZCZYK, Magdalena; PRADHAN, Brajabandhu; REMAUT, Han. The Biosynthesis and Structures of Bacterial Pili. **Subcellular Biochemistry**, [S.L.], p. 369-413, 2019. Springer International Publishing. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-030-18768-2_12.

MATHELIÉ-GUINLET, Marion; VIELA, Felipe; ALSTEENS, David; DUFRÊNE, Yves F.. Stress-Induced Catch-Bonds to Enhance Bacterial Adhesion. **Trends In Microbiology**, [S.L.], v. 29, n. 4, p. 286-288, abr. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2020.11.009>.

PINKNER, Jerome S.; REMAUT, Han; BUELENS, Floris; MILLER, Eric; ÅBERG, Veronica; PEMBERTON, Nils; HEDENSTRÖM, Mattias; LARSSON, Andreas; SEED, Patrick; WAKSMAN, Gabriel. Rationally designed small compounds inhibit pilus biogenesis in uropathogenic bacteria. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 103, n. 47, p. 17897-17902, 21 nov. 2006. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0606795103>.

PROFT, T.; BAKER, E. N.. Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria — structure, assembly and their role in disease. **Cellular And Molecular Life Sciences**, [S.L.], v. 66, n. 4, p. 613-635, 27 out. 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-008-8477-4>.

SAUER, Frederic G.; REMAUT, Han; HULTGREN, Scott J.; WAKSMAN, Gabriel. Fiber assembly by the chaperone–usher pathway. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) -**

Molecular Cell Research, [S.L.], v. 1694, n. 1-3, p. 259-267, nov. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.02.010>.

SPAULDING, Caitlin N.; KLEIN, Roger D.; RUER, Ségolène; KAU, Andrew L.; SCHREIBER, Henry L.; CUSUMANO, Zachary T.; DODSON, Karen W.; PINKNER, Jerome S.; FREMONT, Daved H.; JANETKA, James W.. Selective depletion of uropathogenic *E. coli* from the gut by a FimH antagonist. **Nature**, [S.L.], v. 546, n. 7659, p. 528-532, 14 jun. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature22972>.

THANASSI, David G; SAULINO, Evan T; HULTGREN, Scott J. The chaperone/usher pathway: a major terminal branch of the general secretory pathway. **Current Opinion In Microbiology**, [S.L.], v. 1, n. 2, p. 223-231, abr. 1998. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1369-5274\(98\)80015-5](http://dx.doi.org/10.1016/s1369-5274(98)80015-5)

TORTORA, Gerard J. et al. Anatomia funcional de células procarióticas e eucarióticas. In: TORTORA, Gerard J. et al. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. Cap. 4. p. 72-106.

PUSZ P, Bok E, Mazurek J, Stosik M, Baldy-Chudzik K. Type 1 fimbriae in commensal *Escherichia coli* derived from healthy humans. **Acta biochimica Polonica**, Łódź, v. 61, n. 2, p. 389-392, abr. 2014.

ZAMANI, Hojjatolah; SALEHZADEH, Ali. Biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli*: association with adhesion factor genes. **Turkish Journal Of Medical Sciences**, [S.L.], v. 48, p. 162-167, 2018. The Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK-ULAKBIM) - DIGITAL COMMONS JOURNALS. <http://dx.doi.org/10.3906/sag-1707-3>.

ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA



BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Impact Factor	p.1
• Abstracting and Indexing	p.1
• Editorial Board	p.2
• Guide for Authors	p.3



ISSN: 1517-8382

DESCRIPTION

The **Brazilian Journal of Microbiology (BJM)** is the official publication of the Sociedade Brasileira de Microbiologia (Brazilian Society for Microbiology). It has been published by Elsevier since 2016. The journal publishes original research papers and reviews, covering all aspects of microbiology.

The journal has a strict policy of manuscript evaluation, and each manuscript is evaluated carefully by at least two selected referees.

The abbreviated title of the journal is *Braz. J. Microbiol.*, which should be used in bibliographies, footnotes, bibliographical references and strips.

IMPACT FACTOR

2016: 1.091 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2017

ABSTRACTING AND INDEXING

Chemical Abstracts
 Commonwealth Agricultural Bureau (CAB) Abstracts
 Current Contents
 LILACS - Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde
 FSTA (Food Science and Technology Abstracts)
 SciELO - Scientific Electronic Library Online
 PubMed
 Web of Science
 Biological Abstracts
 Scopus
 Directory of Open Access Journals (DOAJ)
 Ulrich's
 Genamics JournalSeek

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

Marina Baquerizo Martinez, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

Associate Editors

Biotechnology and Industrial Microbiology

Adalberto Pessoa Junior, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

Eleni Gomes, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, SP, Brazil

Gisele Monteiro de Souza, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

Rosane Schwan, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brazil

Solange Mussato, Danmarks Tekniske Universitet, Kongens Lyngby, Denmark

Food Microbiology

Elaine Cristina Pereira de Martinis, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

Luís Augusto Nero, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brazil

Mariza Landgraf, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

Susana Marta Isay Saad, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

Bacterial and Fungal Pathogenesis

Agnes M. S. Figueiredo, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Beatriz Ernestina Cabilio Guth, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

Carlos P. Taborda, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

Celia Maria de Almeida Soares, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil

Cristiano Gallina Moreira, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, SP, Brazil

Rosana Puccia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

Sandro Rogerio de Almeida, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

Waldir P. Elias Junior, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil

Clinical Microbiology

Afonso Luís Barth, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Ana Lúcia da Costa Darini, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

Carlos P. Taborda, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

Elizabeth Andrade Marques, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

John Anthony McCulloch, National Institute of Health, Washington DC, USA

Jorge Luiz Mello Sampaio, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

Maurício Lacerda Nogueira, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, SP, Brazil

Sandro Rogerio de Almeida, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

Environmental Microbiology

Cynthia Canedo Silva, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brazil

Derlene Attili de Agellis, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brazil

Fernando Dini Andreotti, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

Iêda Carvalho Mendes, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Brasília, DF, Brazil

Jerri Edson Zilli, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Valéria Maia de Oliveira, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brazil

Vânia M. M. Melo, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

Wellington Araujo, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

Veterinary Microbiology

Fernando R. Spilke, Universidade Feevale, Novo Hamburgo, RS, Brazil

Miliane Moreira Soares de Souza, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, Brazil

Fungal and Bacterial Physiology

Luís Henrique Souza Guimaraes, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

Genetics and Molecular Biology

Celia Maria de Almeida Soares, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil

John McCulloch, National Institute of Health, Washington DC, USA

Rodrigo Galhardo, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

Rosana Puccia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

The Brazilian Journal of Microbiology (BJM) is the official publication of the Sociedade Brasileira de Microbiologia (Brazilian Society for Microbiology). It publishes original research papers and reviews, covering all aspects of Microbiology. The journal has a strict policy of manuscript evaluation, and each manuscript is evaluated carefully by at least two selected referees.

Types of article

The following categories of papers are acceptable for publication in Brazilian Journal of Microbiology:

Research paper: the research paper reports results of original research, which has not been published elsewhere.

Short communication: a short communication is new and significant findings. Submit form is the same way as research paper. They receive the same review, they are not published more rapidly than research paper.

Short-review: Review articles should deal with microbiological subjects of broad interest (ONLY BY INVITATION).

Letter to the editor: letters to the editor are intended only for comments on final, typeset articles published in the journal (manuscripts posted online are not accepted) and must cite published references to support the writers argument.

Your manuscript must be written clearly, in comprehensible English. The text submitted for publication has to be English reviewed before submission. To submit the manuscript, you must attach the issued certificate in supplementary files.

SECTIONS

Biotechnology and Industrial Microbiology

Biosynthesis and bioconversion of natural products, including antibiotics, xenobiotics, and macromolecules produced by bacteria. Biosynthesis and bioconversion of natural products, including antibiotics, xenobiotics, and macromolecules produced by fungi. Molecular aspects of fungal biotechnology. Molecular aspects of bacterial biotechnology.

Food Microbiology

Applications of microorganisms (bacteria and fungi) for food production. Food borne diseases, food spoilage, and microbial ecology in foods.

Bacterial and Fungal Pathogenesis

The genetic, biochemical, and structural basis of bacterial pathogenesis.

Clinical Microbiology

Studies of medically-important bacteria, fungi and virus.

Environmental Microbiology

Ecology of natural microbial assemblages, microbial diversity of natural environments such as water, soil, sediments and higher organisms. Microbial interactions. Biodegradation, Bioremediation, and Environmental considerations for genetically engineered microorganisms.

Veterinary Microbiology

Diseases of animals, Control and/or treatment of animals, Animal pathogen diagnostics, and Veterinary or zoonotic pathogens

Fungal and Bacterial Physiology

Biochemistry, biophysics, metabolism, cell structure, stress response, growth, differentiation and other related process.

Genetics and Molecular Biology

Fungal and bacterial genetics, molecular biology, gene regulation, DNA replication and repair, genomics, proteomics, transcriptomics.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Human and animal rights

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association](#) (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans; [Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals](#). Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. If there are no conflicts of interest then please state this: 'Conflicts of interest: none'. [More information](#).

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' section of our ethics policy for more

information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [CrossCheck](#).

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this) to assign to the Brazilian Society of Microbiology the copyright in the manuscript and any tables, illustrations or other material submitted for publication as part of the manuscript (the "Article") in all forms and media (whether now known or later developed), throughout the world, in all languages, for the full term of copyright, effective when the Article is accepted for publication. . An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Open access

This is an open access journal: all articles will be immediately and permanently free for everyone to read and download.

The Brazilian Society of Microbiology pays for most of the publishing costs incurred by the journal.

Authors are required to pay a publication fee to the Brazilian Society of Microbiology in order to share in the costs of production:

- US 500.00/paper for non-Brazilian authors;
- R\$ 1.280,00/paper for Brazilian authors.

Permitted third party (re)use is defined by the following [Creative Commons user licenses](#):

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

Elsevier Publishing Campus

The Elsevier Publishing Campus (www.publishingcampus.com) is an online platform offering free lectures, interactive training and professional advice to support you in publishing your research. The College of Skills training offers modules on how to prepare, write and structure your article and explains how editors will look at your paper when it is submitted for publication. Use these resources, and more, to ensure that your submission will be the best that you can make it.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submit your article

Please submit your article via <https://www.evise.com/profile/api/navigate/BJM>.

Referees

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

PREPARATION

For **research papers**, the WORD file should contain:

Title (100 characters)
 Running title (40 characters)
 Authors and Affiliations
 Abstract (up to 200 words)
 Three to five keywords
 Introduction
 Materials and Methods
 Results
 Discussion
 Acknowledgements (optional)
 References

For **short communications**, the WORD file should contain:

Title
 Running title
 Authors and Affiliations
 Abstract (up to 50 words)
 Three to five keywords
 Text not divided in topics
 Acknowledgements (optional)
 References

For **short reviews**, the WORD file should contain:

Title (100 characters)
 Running title (40 characters)
 Authors and Affiliations
 Abstract (up to 200 words)
 Three to five keywords

Text
 Acknowledgements (optional)
 References

For **Letter to the Editor** the WORD file should contain:
 Title (100 characters)
 Running title (40 characters)
 Authors and Affiliations
 Text (no more than 500 words and must be typed double-spaced)
 References

All manuscripts should be typed double-spaced with 3 cm margins and pages should be numbered sequentially.

The lines in each page of the manuscript should be numbered too.

Research papers and short-review consist of 20 pages, including references, tables and figures.

The Editors recommend that the manuscript should be critically read by someone fluent in English before submission.

Manuscripts written in poor English will not be accepted.

Abbreviations of terms and symbols should follow the recommendations of IUPAC-IUB Commission (Commission on Biochemical Nomenclature, Amendments and Corrections).

Use of plant extracts in microbiological experiments

Articles that present studies with plant extracts, or other complex substances, will be accepted only after identification of compounds.

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. [More information on types of peer review.](#)

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

The Introduction should provide the reader with sufficient information so that the results reported in the paper can be properly evaluated without referring to the literature. However, the introduction should not be an extensive review of the literature. The introduction should also give the rationale for and objectives of the study that is being reported.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

If a published method is modified, such modification(s) must be described in the paper. Sources of reagents, culture media and equipment (company, city, state, country) should be mentioned in the text. Names that are registered trade marks should be so indicated. Subheading often makes this section easier to read and understand.

Results

Results should be clear and concise.

The Results section should, by means of text, tables and/or figures, give the results of the experiments, extensive interpretation of results has to be avoided but do so in the Discussion section.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Author affiliations should be presented in decreasing hierarchical order (e.g. Harvard University, Harvard Business School, Boston, USA) and should be written as established in its own language (e.g. Universit Paris-Sorbonne; Harvard University, Universidade de So Paulo). Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

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

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;

- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF) or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites). [Further information on the preparation of electronic artwork](#).

Illustration services

[Elsevier's WebShop](#) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. *Mendeley Data*, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB in total. Any single file should not exceed 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

RESEARCH DATA

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data page](#).

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

Data deposit and linking

Elsevier encourages and supports authors to share raw data sets underpinning their research publication where appropriate and enables interlinking of articles and data. [More information on depositing, sharing and using research data](#).

Virtual Microscope

The journal encourages authors to supplement in-article microscopic images with corresponding high resolution versions for use with the Virtual Microscope viewer. The Virtual Microscope is a web based viewer that enables users to view microscopic images at the highest level of detail and provides features such as zoom and pan. This feature for the first time gives authors the opportunity to share true high resolution microscopic images with their readers. [More information and examples](#). Authors of this journal will receive an invitation e-mail to create microscope images for use with the Virtual Microscope when their manuscript is first reviewed. If you opt to use the feature, please contact virtualmicroscope@elsevier.com for instructions on how to prepare and upload the required high resolution images.

AFTER ACCEPTANCE

Availability of accepted article

This journal makes articles available online as soon as possible after acceptance. This concerns the accepted article (both in HTML and PDF format), which has not yet been copyedited, typeset or proofread. A Digital Object Identifier (DOI) is allocated, thereby making it fully citable and searchable by title, author name(s) and the full text. The article's PDF also carries a disclaimer stating that it is an unedited article. Subsequent production stages will simply replace this version.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to [download the free Adobe Reader](#), version 9 (or higher). Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the [Adobe site](#).

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and scan the pages and return via e-mail. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).

© Copyright 2014 Elsevier | <http://www.elsevier.com>