

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR

COMBATE À ADESÃO DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS: BUSCA POR
COMPOSTOS ATIVOS ORIUNDOS DE MICRO-ORGANISMOS ASSOCIADOS
AO GÊNERO DROSERA

Dissertação de Mestrado
NEDY RAMIREZ LIZCANO
Porto Alegre – RS – Brasil

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR

COMBATE À ADESÃO DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS: BUSCA POR
COMPOSTOS ATIVOS ORIUNDOS DE MICRO-ORGANISMOS ASSOCIADOS
AO GÊNERO DROSERA

Orientador:

Prof. Dr. Alexandre José Macedo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular

Porto Alegre – RS – Brasil

Março de 2015

Agradecimentos ao Programa de Estudantes-Convênio de Pós-Graduação - PEC-PG, em especial a o CNPq, órgão que financiou a bolsa de estudos para o desenvolvimento deste trabalho; ao Laboratório de Peptídeos e Enzimas Proteolíticas do Centro de Biotecnologia desta Universidade, bem como o Laboratório de Biofilmes e Diversidade Microbiana da Faculdade de Farmácia que disponibilizaram os equipamentos e materiais necessários para a realização da presente tese.

A Deus.

*A meu marido Marco Aurelio por seu amor e apoio incondicional na
execução deste sonho.*

*Aos meus Pais: Héctor Gabriel e Clotilde, aos meus Irmãos e sobrinhas,
por seu apoio e compreensão, todos sempre me esperando para repor
todas aquelas saudades.*

A todos eles muito obrigada.

AGRADECIMENTOS

A o meu querido professor Alexandre José Macedo, por acreditar em mim e fazer possível vir a estudar no Brasil, pela confiança e por me permitir aprender ao seu lado.

Ao professor Dr. Carlos Termignoni, pela hospitalidade, por compartilhar parte do seu tempo e pelo incentivo de buscar o conhecimento. Sempre me lembrarei de seus conselhos.

À Dra. Marilene Henning Vainstein, por sua colaboração no processo de obtenção da minha bolsa de mestrado.

À Dra. Adriana Seixas, por sua orientação oportuna, sua amizade e ser parte da minha comissão de acompanhamento.

A o Dr. Marco Antonio Ayub, por aceitar ser parte da minha comissão de acompanhamento e dar sugestões para meu desempenho no mestrado.

À professora Guiomar Nates Parra da *Universidad Nacional de Colombia* (UCN) e o Dr. Alonso González do *International Center for Tropical Agriculture* (CIAT) da Colômbia, por acreditar em mim e me apoiar em meu propósito de estudar na pós-graduação.

Às Dras. Danielle da Silva Trentin e Karine Rigon Zimmer, por suas orientações, paciência, amizade e apoio.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, pelos valiosos ensinamentos durante as suas disciplinas.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, principalmente à Silvia Centeno e o Luciano Saucedo, duas pessoas sempre amáveis e dispostas na colaboração aos estudantes.

A meu querido parceiro de laboratório Marcelo Jung Eberhardt, por estar sempre disposto a colaborar, por permitir-me a aprender a seu lado, pelos momentos de alegria e pela força nas angústias, por sua amizade e paciência, muito obrigada.

A minhas colegas de laboratório Sharon dos Reis e Marina Xavier, por seu apoio, paciência e amizade, pelos momentos de descontração, não esquecerei que em Porto Alegre encontrei duas irmãs de trabalho e estarei eternamente grata com vocês.

A Flávia Brust, Anelise Baptista e Patrick Comassetto, por sua amizade, apoio, por compartilhar seu tempo e fazer dos dias de laboratório um agradável momento.

A o grupo do Laboratório de Biofilmes e Diversidade Microbiana, da Faculdade de Farmácia, Ana Paula Becker, Jéssica Bonfanti, Muriel Barros, Laura Nunes Silva, Franciane Senger e Rodrigo Campos, por sua amizade, sua ajuda e por permitir-me ser parte de seu grupo.

A o grupo de colombianos do programa do PPGBCM da UFRGS, Grethel, Mauricio, Victória, Lida e José, por sua amizade, o apoio, e pelas alegrias compartilhadas.

A meus colegas de casa Manuel, Lizeth e Emmanuel, por seu apoio, sua ajuda nas dificuldades e revisão do documento final, por sua companhia, por fazer da minha estadia em Porto Alegre um momento agradável e gratificante.

A Omaira Rosa Sierra por sua amizade e ajuda. Eu estarei eternamente grata.

A Silvana Macedo e Pedro, pelos bons momentos, por me permitir sentir numa família em Porto Alegre.

A Paula Isaac e Carolina Malafaia, por seu apoio, por ser parte da minha experiência de vida no Brasil e promover nossas saídas turísticas.

A minha sobrinha Erika Lizeth e a Diana Marcela, por sua colaboração na organização do documento final.

A o senhor Mauro e a senhora Neca, por me permitir viver na sua casa e ser parte da sua família.

A o meu amado marido Marco Aurelio, por seu amor, por me fazer companhia apesar da distância, por me ouvir e me dar força nos momentos mais difíceis, por vir no Brasil e levar bonitas lembranças deste país.

A meus pais Héctor Gabriel y Clotilde, a meus irmãos Jairo, Carlos Ariel e Emilse junto com o suas famílias por seu carinho, sua compreensão, por me esperar e fazer de sua companhia uns bonitos momentos.

A Jenny, Marcela e Carolina, por sua amizade, seu apoio, por ouvir-me e ajudar-me a recuperar a força quando tudo parece não ter solução.

A o meu sogro Onésimo Caviedes pelo apoio, a compreensão, o carinho, por ouvir-me e ter sempre uma resposta bem sucedida.

A meus amigos e a família de meu marido na Colômbia, por seu apoio, por torcer por que eu tivesse sucesso no mestrado.

Para todas aquelas pessoas que de alguma forma contribuíram durante meu mestrado e desenvolvimento deste trabalho Muito obrigada.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	2
LISTA DE TABELAS.....	2
LISTA DE ABREVIATURAS E UNIDADES	3
RESUMO.....	5
ABSTRACT	7
1. Introdução.....	9
2. Revisão do tema.....	15
2.1 Biofilmes bacterianos	15
2.2.1 Problemática da adesão bacteriana em dispositivos de uso clínico	20
2.3 O bacilo Gram-negativo <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23
2.5. Resistência antimicrobiana	30
2.5.1 Resistência antimicrobiana em nível celular.....	30
2.5.2 Resistência bacteriana no biofilme	34
2.6 Estratégias para tratamentos de biofilmes	37
2.7 Bactérias associadas a plantas carnívoras como fonte de metabólitos para erradicar biofilmes	41
3. Objetivos.....	47
3.1 Objetivo Geral	47
3.2 Objetivos específicos	47
CAPITULO I.....	48
Eradication of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> biofilm by metabolites from <i>Bacillus sp.</i> (CFS3632) isolated of Carnivorous Plant <i>Drosera</i> from South Brazil	49
CAPITULO II.....	84
CAPITULO III	87
1. Conclusões.....	88
1.1 Conclusão Geral.....	88
1.1.1 Conclusões específicas	88
2. Perspectivas	90
3. Referencias bibliográficas	91

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Estágios do desenvolvimento dos biofilmes (TRENTIN, 2013, modificado de MACEDO E ABRAHAM, 2009)..... 18
- Figura 3: Representação esquemática de um biofilme de *P. aeruginosa* indicando vários exemplos de mecanismos de resistência adaptativas expostos durante o estado de crescimento multicelular. O quadro mostra os gradientes de oxigênio e nutrientes formados dentro da estrutura do biofilme e como eles se relacionam com a diferenciação celular em diferentes estados de crescimento. Abreviaturas: QS, sinal de quorum-sensing; eDNA, DNA extracelular. (Modificado de DE LA FUENTE-NÚÑEZ *et al.*, 2013). 35
- Figura 4: Níveis de atividade das populações no biofilme de acordo com o gradiente de concentração de oxigênio, disponibilidade de nutrientes e resíduos (Adaptado de DAVIES, 2003)..... 36
- Figura 5: Principais alvos para combate aos biofilmes microbianos: 1) inibição da adesão bacteriana, 2) o rompimento da comunicação celular bacteriana - *Quorum sensing* 3) e a erradicação ou tratamento de biofilmes já formados (TRENTIN, 2013. adaptada de MACEDO e ABRAHAM, 2009). 38
- Figura 6: Espécies de plantas carnívoras do género *Drosera* A) *Drosera communis*. B) *Drosera capensis*. C) *Drosera callistos*. D) *Drosera spatulata*. (Fonte: www.omnisterra.com)..... 44
- Figura 7: As armadilhas compostas de *Drosera* A) Armadilha ativa de *D. anglica* B) *D. arcturi* as folhas da armadilha só apresentam tentáculos T0. C) *D. scorpioides* a armadilha tem tentáculos T0 e T1. D) *D. sessilifolia* tem tentáculos T0, T1 e T2. E) *D. glanduligera* tem tentáculos T3, T0 e T1. (modificado de POPPINGA *et al.*, 2013; *Drosera anglica*, NE4, 2006). 45

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: A magnitude do problema de infecções associadas a implantes médicos (adaptado de DAROUICHE, 2001)..... 22

LISTA DE ABREVIATURAS E UNIDADES

Abs - absorbance
AHL- acyl homoserine lactone
AI-2 - autoinducer-2, a furanosyl borate diester
BCP - bacteria associated with the carnivorous plants
BLAST - basic local alignment search tool
CDC- center for disease control
CF - Cystic fibrosis
c-di-GMP - Bis-(3'-5')-cyclic dimeric guanosine monophosphate
cfu/mL - colony forming unit / millilitre
CV - cristal violet
dNTP – deoxynucleotide triphosphate
eDNA - xtracellular DNA
EPS - extracellular polymeric substances
ESBL - extended spectrum beta-lactamase
FPLC - fast protein liquid chromatography
GE - healthcare life sciences
GF - gel filtration
h - hour
kDa – quilodaltons
LMW - low molecular weight
M – molar
MBEC - minimum biofilm eradication concentration
mg – milligrams
min – minute
mL – milliliter
mM – millimolar
NCBI - national center for biotechnology information
NIH - national institute of health
OD - optical density
OMS - *organização mundial de saúde* (global organization of the health)
PAGE – polyacrylamide gel electrophoresis

PBP - penicillin binding proteins
PCR – polymerase chain reaction
QS - quorum sensing
ROS - reactive oxygen species
rpm – revolutions per minute
rRNA – ribosomal ribonucleic acid
S.D. - standard deviation
SDS – sodium dodecyl sulfate
SEM - scanning electron microscope
SMA - skin milk agar
T3SS- type three secretion system
TSB - tryptone soy broth
U – enzyme unit
V – Volts
 μg – microgram
 μL – microlitre

RESUMO

A presença de bactérias patogênicas com capacidade de formar biofilme nos dispositivos de uso médico constitui um dos principais problemas na saúde pública. O biofilme confere proteção contra os mecanismos de defesa do hospedeiro e ação dos antimicrobianos, aumentando a virulência e resistência dos micro-organismos. A erradicação deste tipo de biofilmes é uma das principais estratégias no tratamento de doenças infecciosas associadas a bactérias patogênicas. A erradicação pode ser feita com o uso de biomoléculas produto do metabolismo secundário de diferentes micro-organismos. O objetivo deste estudo foi procurar novas moléculas com o potencial de erradicar biofilmes patogênicos associados a implantes médicos a partir de bactérias associadas ao gênero *Drosera* usando como bactérias alvo os patógenos *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus epidermidis*. Para isto, foram crescidos 193 isolados bacterianos associados à planta *Drosera* que cresce na região litoral de Nova Tramandaí (RS) no sul do Brasil. Do total de isolados bacterianos foram usados os 36 que apresentaram atividade proteolítica para a produção de sobrenadantes bioativos. Os sobrenadantes bioativos foram usados para testes de erradicação de biofilme usando placas de 96 poços e a técnica de Cristal Violeta nas duas bactérias alvo. Nove isolados bacterianos associados à *Drosera* apresentaram atividade de erradicação de biofilme por acima de 40%, três deles para *P. aeruginosa* e seis para *S. epidermidis*. Destes isolados foi escolhido o isolado com melhor atividade de erradicação para *P. aeruginosa* e

foram realizados testes para determinação da concentração mínima de erradicação de biofilme, antiformação de biofilme, viabilidade celular e microscopia eletrônica de varredura junto com a identificação da bactéria por método de genes 16S, bem como o fracionamento bioquímico do sobrenadante. Adicionalmente, o sobrenadante bioativo foi testado *in vitro* em um modelo de dispositivo médico (cateter). A bactéria Gram-positiva que apresentou maior atividade de erradicação em seu sobrenadante possui 99% de similaridade com o *Bacillus pumilus*. Esta atividade de erradicação de biofilme de *P. aeruginosa*, pode ser atribuída à presença de uma molécula ou composto de aproximadamente 34 kDa. Esta biomolécula ou composto pode constituir uma alternativa complementar ao uso dos antibióticos convencionais. A perspectiva de purificar e caracterizar esta biomolécula ou composto para *P. aeruginosa* permitirá estudar seu mecanismo de ação e o uso no tratamento deste biofilme patogénico na clínica.

ABSTRACT

The presence of pathogenic bacteria with the ability to form biofilm on medical devices is one of the major problems in public health. The biofilm protects against the host defense mechanisms and the action of antibiotics, increasing the virulence and resistance of microorganisms. The elimination of this type of biofilms is a main strategy in the treatment of infectious diseases associated with pathogenic bacteria. This elimination can be done by using biomolecules from the secondary metabolism product of different micro-organisms. The objective of this study was to look for new molecules with the potential to eradicate pathogenic biofilms associated with medical implants from bacteria associated with gaster Drosera using bacteria as targets *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis* pathogens. For this, were grown 193 bacterial isolates associated with Drosera plant that grows in the coastal region of New Tramandaí (RS) in southern Brazil. Of total bacterial isolates were used which had 36 proteolytic activity for the production of bioactive supernatants. The bioactive supernatants were used for biofilm eradication tests using 96-well plates and Crystal Violet technique in both target bacteria. Then the supernatant with the best eradication activity to *P. aeruginosa* was chosen to determine the minimum concentration to eradicate biofilm, biofilm inhibition, cell viability and scanning electron microscopy together with the identification of the bacteria by means of 16S and bioguided the fractionation of the supernatant. Additionally, the bioactive supernatant was tested in an in

vitro model using the clinical device. Nine bacterial isolates associated with Drosera showed biofilm eradication activity by over 40%, three for *P. aeruginosa* and six for *S. epidermidis*. The Gram-positive bacterium with 99% similarity to the *Bacillus pumilus* showed the best biofilm eradication activity to *P. aeruginosa* capacity allocated to the presence of a molecule composed of approximately 34 kDa. These biomolecules can be an alternative to complement the use of conventional antibiotics or the direct use of antibiotic activity is presented as the case of bioactive found for *P. aeruginosa* supernatant. The prospect of purify and characterize this biomolecule or compound to *P. aeruginosa* will allow us to study this mechanism of action and the use in the treatment of this pathogenic biofilm in the clinic.

1. Introdução

As infecções hospitalares causadas por agentes patogênicos com capacidade de formar biofilmes representam um dos grandes desafios atuais na saúde, gerando aumento no custo dos tratamentos e nas taxas de morbi-mortalidade (FUX *et al.*, 2005). O modo de vida de biofilme aumenta a virulência dos microorganismos conferindo proteção contra os mecanismos de defesa do hospedeiro e ação dos antimicrobianos (COSTERTON *et al.*, 2005). Em bactérias o biofilme proporciona uma barreira de proteção contra o sistema imunológico, os antibióticos, a ação de predadores, estímulos mecânicos ou físicos e facilita a conservação do genótipo (FLEMMING & WINGENDER, 2010). Estes biofilmes são considerados estados sésseis estruturados em comunidades multicelulares, organizadas e funcionais que mantêm um comportamento regulado por um sistema nomeado de *Quorum Sensing (QS)*, onde as bactérias liberam sinais químicos e expressam genes de virulência dependentes da densidade celular (DONLAN & COSTERTON, 2002; KALIA, 2013). O mecanismo de formação de biofilmes ainda é foco de investigação (TRENTIN, 2013). Entretanto, modelos experimentais “*in vitro*” mostram que a formação de biofilmes constitui um processo com uma adesão inicial a um substrato, seguida pela formação de microcolônias, a maturação, e finalmente a dispersão de células planctônicas de volta para o ambiente (SAUER *et al.*, 2002). Em geral a composição do biofilme é variável dependendo do sistema em estudo, o principal componente do biofilme é a água, que pode representar até 97% do conteúdo total e é suportado por uma matriz de exopolissacarídeos (EPS) e em alguns casos tem conformação de cogumelo permeado por canais de água.(UZCUDUN, 2010; QING & LUYAN, 2013).

A capacidade de formar biofilme favorece a permanência e a disseminação dos agentes etiológicos implicados no desenvolvimento de doenças crônicas e muitas das infecções hospitalares são consideradas consequência de contaminações das superfícies de dispositivos médicos e equipamentos a partir destes micro-organismos (MAH & O'TOOLE, 2001; HOIBY *et al.*, 2010; CARMONA-RIBEIRO *et al.*, 2011). O uso de dispositivos médicos invasivos constitui um dos principais fatores de risco para adquirir infecções nos tratamentos médicos (KALLEN *et al.*, 2010). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) existem cerca de 1,5 milhões de dispositivos médicos disponíveis no mercado (WHO, 2010). Na última década, o mercado global dos dispositivos médicos tem crescido com um aumento estimado em \$169 bilhões de dólares. Este crescimento pode ser explicado pelo aumento global da procura de cuidados de saúde, o envelhecimento da população e a evolução das doenças infecciosas de agudas para crônicas pela resistência a antibióticos (SANTOS *et al.*, 2011).

Nos dispositivos, as bactérias se aderem nas superfícies e seguidamente geram o desenvolvimento de biofilmes maduros, onde desenvolvem mecanismos de resistência gerados por: a) a proteção fornecida pelas propriedades da matriz de exopolissacarídeos; b) a heterogeneidade fisiológica do biofilme que contém subpopulações resistentes (*persistor cells*); c) a proteção específica de biofilme contra o estresse oxidativo; d) e a transferência horizontal de genes e mutações (BRIDIER *et al.*, 2011; ELIAS, 2011; ACKER *et al.*, 2014).

As bactérias mais frequentemente envolvidas em biofilmes infecciosos associados a dispositivos médicos incluem os agentes patogênicos Gram-

positivos *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus sp.*, as espécies Gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* e a Enterobacteriaceae *Escherichia coli* (RÖMLING & BALSALOBRE, 2012). Entre estas bactérias, *P. aeruginosa* é considerada como o patógeno que causa os problemas mais perigosos na clínica (MAY *et al.*, 1991; LYNCH & ROBERTSON, 2008; DRULIS-KAWAB *et al.*, 2012) juntamente com o Gram positivo *Staphylococcus epidermidis* reconhecido como uma importante causa de infecções humanas nosocomiais (WANG *et al.*, 2010; OTTO, 2009).

Para o combate de biofilmes patogênicos há diferentes estratégias incluindo a prevenção da formação do biofilme, modulação do biofilme e erradicação de biofilmes já formados. A prevenção pode ser feita pela inibição da adesão bacteriana nas superfícies e a modificação das superfícies (ALVIN *et al.*, 2013; RENNER & WEIBEL, 2011). A modulação e erradicação podem ser feitas pela interrupção da comunicação celular bacteriana (QS) com o uso de moléculas específicas (KALIA, 2013) e tratamentos mecânicos e físicos (RÖMLING & BALSALOBRE, 2013).

Muitas das moléculas usadas nestes tipos de tratamentos têm como fonte micro-organismos que pela evolução produzem substâncias únicas com funções ecológicas diversas como forma de defesa contra inimigos naturais, predadores e competidores (PINTO, 2002; TAYLOR, 2007). Entre estas moléculas encontram-se compostos sinalizadores que estimulam o mecanismo natural de dispersão dos biofilmes e constituem uma fonte na busca de substâncias ativas para a erradicação dos biofilmes (MACEDO & ABRAHAM, 2009; TRENTIN,

2013). O objetivo deste estudo inclui a procura deste tipo de biomoléculas, com a finalidade de extrair e produzir estas moléculas oriundas do metabolismo secundário de micro-organismos associados à planta carnívora *Drosera* visando a erradicação de biofilmes patogênicos em dispositivos de uso clínico tendo como alvo as bactérias *P. aeruginosa* e *S. epidermidis* e como modelo de dispositivo o cateter urinário.

Estes micro-organismos associados a plantas carnívoras mantêm uma ação cooperativa de simbiose com a planta, contribuindo na mineralização de nutrientes, fixação de nitrogênio e principalmente no auxílio da decomposição e digestão de insetos (BUTLER *et al.*, 2008, KOOPMAN *et al.*, 2010). Nas plantas carnívoras existem estruturas, produto de modificações nas folhas, em forma de armadilha para a captura de presas contendo uma mucilagem com fluidos nutricionais e enzimáticos que são propícios para o crescimento dos micro-organismos associados. Neste fluido os micro-organismos podem gerar competição pelo espaço e nutrientes. Essa competição se dá pela produção de metabólitos com capacidade de inibir a adesão desses micro-organismos na superfície das armadilhas e auxílio na digestão dos insetos, sendo esses metabólitos (moléculas) o foco deste estudo para prospecção de moléculas com capacidade de erradicar biofilmes.

Nesta dissertação são mostrados os resultados da análise de sobrenadantes obtidos de 193 isolados bacterianos associados a o gênero *Drosera*, o qual cresce na região litoral de Nova Tramandaí (R.S.-Brasil), visando a erradicação de biofilmes patogênicos que estão associados a dispositivos de uso médico. Estes resultados são apresentados na forma de um manuscrito para *P.*

aeruginosa no capítulo I e de um segundo capítulo com alguns resultados obtidos para *S. epidermidis*.

2. Revisão do tema

2.1 Biofilmes bacterianos

Os micro-organismos alternam-se entre formas de vida planctônicas (células de vida livre) e estados sésseis estruturados em comunidades multicelulares, organizadas e funcionais chamadas 'biofilmes' (DONLAN & COSTERTON, 2002). A primeira observação de um biofilme é atribuída a Antonie van Leeuwenhoek em 1675, quando este descreveu uma ocorrência no seu dente e que chamou de “pequenos animais”. No entanto, a forma de biofilme é reconhecida desde 1978 (COSTERTON *et al.*, 1978) e é caracterizada por ajudar na sobrevivência dos micro-organismos nas diversas e dinâmicas condições ambientais em quase todos os habitats na biosfera, incluindo seres humanos (HALL-STOODLEY *et al.*, 2004; RENNER & WEIBEL, 2011). A formação dos biofilmes depende dos organismos envolvidos, da natureza da superfície colonizada e das condições físicas e químicas. Nas bactérias a estrutura de biofilme proporciona uma barreira de proteção contra o sistema imune, a ação de predadores e estímulos mecânicos ou físicos, além da conservação do genótipo (FLEMMING & WINGENDER, 2010). Dentro do biofilme o comportamento é regulado pelo sistema de *Quorum sensing* (QS), onde as bactérias liberam sinais químicos e expressam genes de virulência dependentes da densidade celular (KALIA, 2013).

O desenvolvimento do biofilme pode ocorrer por três mecanismos: i) divisão binária de células aderentes ii) redistribuição das células filhas aderidas pela mobilidade superficial iii) captação de células planctônicas a partir do

fluxo para o biofilme desenvolvido (DALTON *et al.*, 1996; TOLKER-NIELSEN *et al.*, 2000; HEYDORN *et al.*, 2002).

No desenvolvimento do biofilme acontecem duas etapas com diferentes estágios (Fig. 1) (TRENTIN, 2013). A primeira etapa de adesão reversível é mediada pelas interações físico-químicas como forças hidrodinâmicas, interações eletrostáticas, forças de van der Waals e interações hidrofóbicas. Essa adesão transitória é reforçada por proteínas extracelulares, como lectinas ou adesinas localizadas na superfície da célula bacteriana ou em apêndices celulares, tais como flagelos, pili e fímbrias (ROSAN & LAMONT, 2000; DUNNE, 2002). Nas bactérias Gram-positivas tem sido descrita a participação de proteínas de superfície (AtlE, Bap, Esp) nesta primeira etapa (TOLEDO-ARANA *et al.*, 2001). Uma vez estabelecida a adesão na superfície, as células começam a replicar e crescer em microcolônias e produzir, liberar e detectar moléculas sinalizadoras que regulam respostas fenotípicas de formação de biofilme pelo processo de *QS* (TRENTIN, 2013).

A segunda etapa é a adesão secundária ou adesão de forma irreversível. Nesta etapa o *QS* induz a transcrição de genes específicos que regulam várias funções como motilidade, virulência e secreção de uma matriz exopolissacarídeos (EPS) que consiste em DNA extracelular (eDNA), proteínas, lípidos, e lipopolissacarídeos que mantêm as bactérias encapsuladas numa camada de hidrogel, a qual faz uma barreira física entre a comunidade e o ambiente extracelular (RENNER & WEIBEL, 2011; FLEMMING & WINGENDER, 2010). O biofilme maduro é uma arquitetura complexa semelhante a cogumelos, envoltos pela EPS e permeados por canais de água

(COSTERTON *et al.*, 1999; TRENTIN, 2013). Estas estruturas são influenciadas pelas características hidrodinâmicas e os fatores biológicos, o *QS*, crescimento celular, sinalização, produção de EPS, motilidade das bactérias e a competição ou cooperação entre as bactérias, fornecendo nichos com diferentes condições físico-químicas como a disponibilidade de oxigênio, concentração de substratos difusíveis, produtos metabólicos, pH e densidade celular (STOODLEY *et al.*, 2002; COSTERTON *et al.*, 1999). O biofilme maduro é um sistema dinâmico onde continuamente são liberadas bactérias planctônicas, microcolônias e fragmentos de biofilme. Este processo de dispersão pode ser influenciado pelas alterações das condições ambientais (por ex.: nível de nutrição e consumo de oxigênio) favoráveis ou desfavoráveis para aumentar o biofilme em locais próximos quando os nutrientes são abundantes e para colonizar outros locais quando os nutrientes são escassos. Este é um processo altamente regulado por fatores genéticos e a dispersão passiva é mediada por forças externas como os fluidos e a abrasão (KARATAN & WATNICK, 2009; KAPLAN, 2010).

O sistema de *QS* encontra-se relacionado com bioluminescência, formação de biofilme, expressão de fatores de virulência, produção de antibióticos, esporulação e competência pela absorção de DNA (QING & LUYAN, 2013). Este sistema de sinalização célula-célula microbiano correlaciona a expressão gênica com a densidade populacional (CAMILLI & BASSLER, 2006; ELIAS, 2011). Na sinalização, quando uma quantidade suficiente do auto-indutor se acumula extracelularmente, este ativa um receptor específico que altera a expressão de genes que afetam diferentes fenótipos (LASA *et al.*, 2005). As

moléculas auto-indutoras encontradas nas bactérias Gram-negativas são as N-acilhomoserinas-lactonas (AHLs), que se difundem através da membrana celular e se ligam a proteínas reguladoras dentro das células e oligopeptídeos nas bactérias Gram-positivas, que operam ligados à membrana através do receptor de histidina-cinase (KALIA, 2013). O auto-indutor Furanosil borato diéster (AI-2) tem sido encontrado tanto em bactérias Gram-positivas como em Gram-negativas (ELIAS, 2011).

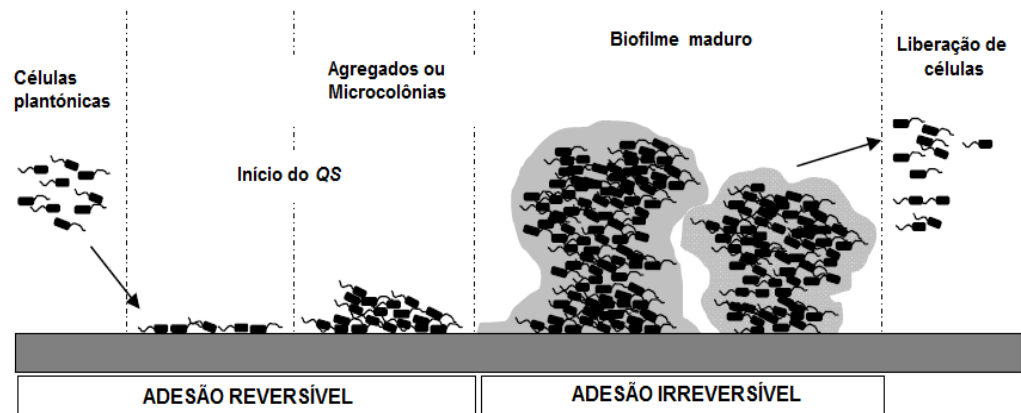


Figura 1: Estágios do desenvolvimento dos biofilmes (TRENTIN, 2013, modificado de MACEDO E ABRAHAM, 2009).

2.2 Incidência das bactérias formadoras de biofilme em humanos

Nos humanos, o modo de vida de biofilme das bactérias pode atuar de diferentes formas: a) como sistema de ajuda nos processos biológicos do organismo ou na proteção de patógenos exógenos, capacidade que é atribuível à produção de ácidos, de bacteriocinas, peróxido de hidrogênio, e biosurfactantes (REID, 2001); b) como fonte de infecções, sendo que o biofilme aumenta a virulência das bactérias patogênicas, conferindo proteção contra os mecanismos

de ação dos antibióticos, os desinfetantes químicos, a fagocitose e outros componentes do sistema de defesa inata e adaptativa do hospedeiro (COSTERTON *et al*, 1999; FUX *et al*, 2005; HOIBY *et al*, 2011).

O número de infecções bacterianas que envolve biofilmes varia de acordo com a agência de informações, por exemplo, os Estados Unidos apresentam uma estimativa de cerca de 65% de todas as infecções de acordo com o *Center for Disease Control* (CDC), e de 80% de acordo com o *National Institute of Health* (NIH) (JOO & OTTO, 2012). Destas infecções, é considerado que as crônicas são responsáveis por mais de 750.000 casos que resultam em 215 mil mortes, e custam cerca de 16.000 milhões de dólares americanos anuais nos cuidados de saúde (ANGUS, 2001).

Muitas das infecções crônicas são produzidas por bactérias que crescem no biofilme e se caracterizam por ser multirresistentes contra a antibioticoterapia, o sistema adaptativo imune e a resposta inflamatória do hospedeiro (HOIBY *et al.*, 2011). A Europa tem uma estimativa de 25.000 pessoas que morrem a cada ano como resultado de infecções por bactérias multirresistentes e de 23.000 mortes nos Estados Unidos, segundo o mais recente relatório do *World Economic Forum Global Risks* (BLAIR *et al.*, 2015).

Nas doenças crônicas após a infecção pelo patógeno pode ocorrer a destruição de tecidos, a disseminação sistêmica do patógeno, resultando em complicações graves e a morte (HALL-STOODLEY *et al.*, 2004). Entre as doenças infecciosas de maior importância clínica produzidas por bactérias formadoras de biofilme encontram-se: endocardite, fibrose cística (FC), broncopneumonia crônica, otite crônica e secretora média, a rinossinusite

crônica, osteomielite crônica e infecções de próteses articulares, em cateteres intravenosos, *stents* e em feridas crônicas (HOIBY *et al.*, 2011).

2.2.1 Problemática da adesão bacteriana em dispositivos de uso clínico

Muitas das infecções hospitalares são consideradas consequência de contaminações das superfícies de dispositivos médicos e equipamentos a partir de micro-organismos presentes na pele de pacientes ou no equipe hospitalar (MAH & O'TOOLE, 2001; HOIBY *et al.*, 2010; CARMONA-RIBEIRO *et al.*, 2011).

Segundo definição da *Global Harmonization Task Force* em 1992, o termo "dispositivo médico" é aplicado a qualquer instrumento, aparelho, implante, máquina, material ou produto semelhante que não tem o principal efeito pretendido no ou sobre o corpo humano pelos meios farmacológicos, imunológicos ou metabólicos e destina-se a utilização em seres humanos com as seguintes finalidades: investigação, diagnóstico, tratamento e gestão, acompanhamento e reabilitação (OMS, 2012).

Os dispositivos médicos já existem há séculos. Há evidências de que os egípcios já usavam bisturis, *slings*, talas, muletas e outros dispositivos no ano 7000 a.C. (OMS, 2012). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) existem cerca de 1.5 milhões de dispositivos médicos (WHO, 2010). Na última década, o mercado global dos dispositivos médicos têm crescido. Em 2010, foi estimado em cerca de \$169 bilhões de dólares e segue crescendo, tanto tecnológica como financeiramente (SANTOS *et al.*, 2011). Este crescimento pode ser explicado pelo aumento global da procura de cuidados de

saúde, o envelhecimento da população e a evolução das doenças infecciosas de agudas para crônicas pela resistência a antibióticos (SANTOS *et al.*, 2011).

Independentemente da sofisticação do implante, todos os dispositivos médicos ou tecidos construídos por engenharia estão suscetíveis ao risco de colonização microbiana e infecção (TRENTIN, 2013). Os micro-organismos podem colonizar os dispositivos no momento da colocação, inoculação direta durante a manipulação de tecido ou implante ou contaminação pelo ar da ferida; e após a implantação, por disseminação hematogênica ou por extensão direta de um foco de infecção adjacente (LASA *et al.*, 2005). O processo de colonização bacteriana na superfície dos dispositivos e implantes envolve uma série de passos, começando com a deposição de substâncias do hospedeiro (macromoléculas como colágeno e fibronectina) no material do dispositivo (COSTERTON *et al.*, 1999) que pode ser de aço inoxidável, de vidro ou polímeros (POZO *et al.*, 2014). Uma vez estabelecidos os biofilmes nas superfícies, é dado início ao processo de infecção que está associado com a quebra da barreira cutânea ou imunossupressão no hospedeiro, produzindo fatores inflamatórios que favorecem a cronicidade da infecção (CHAN *et al.*, 2003). Estes biofilmes podem envolver apenas uma ou diferentes espécies microbianas. No caso de uma infecção multiespécie, algumas delas apenas desempenham o papel de favorecer a virulência e a organização estrutural do biofilme, o que protege e permite a sobrevivência das demais espécies envolvidas, que por sua vez participam ativamente da infecção (TRENTIN, 2013).

A Tabela 1 mostra um exemplo da magnitude do problema das infecções associadas a implantes médicos, listando, em ordem decrescente, o número total de implantes médicos inseridos a cada ano nos Estados Unidos. Entretanto, as verdadeiras taxas de infecções podem ser maiores do que as apresentadas, principalmente porque a taxa de infecção de dispositivos reimplantados aumenta em diversas vezes; os antimicrobianos geralmente são administrados previamente à coleta para a realização de exame cultural, podendo gerar resultados falso negativos (DAIROCHE, 2001).

Tabela 1: A magnitude do problema de infecções associadas a implantes médicos (adaptado de DAROUICHE, 2001).

Dispositivo	Número de inserção por ano	Taxa de infecção na primeira inserção (%)	Mortalidade atribuída ^a
Cateteres urinários	> 30 milhões	10-30	Baixa
Cateteres venosos centrais	5 milhões	3-8	Moderada
Dispositivos de fixação de fraturas (placas pinos)	2 milhões	5-10	Baixa
Implantes dentários	1 milhão	5-10	Baixa
Próteses articulares	600 mil	1-3	Baixa
Enxertos vasculares	450 mil	1-5	Moderada
Marca-passos cardíacos	300 mil	1-7	Moderada
Implantes mamários	130 mil	1-2	Baixa
Válvulas cardíacas mecânicas	85 mil	1-3	Alta
Dispositivos de assistência Cardíaca	700	25-50	Alta

^a Escala semiquantitativa: Baixa (<5%); Moderada (5-25%); Alta (>25%). (adaptado de DAROUICHE, 2001)

Um dos principais fatores de risco para infecções é o uso de dispositivos médicos invasivos, tais como cateteres (KALLEN *et al.*, 2010). O primeiro relato científico do uso de cateteres data de 1823 (COOPER, 1823), em um caso onde o cateter foi utilizado para auxiliar a retirada de pedras da bexiga. Desde então, o uso de dispositivos médicos cresceu rapidamente.

As superfícies estéreis dos cateteres são colonizadas por micro-organismos, seguido pelo desenvolvimento de biofilmes maduros que representam um obstáculo significativo na clínica por sua resistência às terapias convencionais antimicrobianas (DAVIES, 2003). Neste sentido, as infecções relacionadas ao uso de cateteres podem aumentar os dias de internação e as taxas de morbimortalidade (GRADY et al., 2002). Dada a incidência de infecções geradas pelo uso de cateteres, este tipo de dispositivo é usado em muitos casos como modelo de estudo no combate da adesão bacteriana em dispositivos médicos.

As bactérias mais frequentemente envolvidas em biofilmes de dispositivos associados a infecções incluem os agentes patogênicos Gram-positivos *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* sp., as espécies Gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* e a Enterobacteriaceae *Escherichia coli* (RÖMLING & BALSALOBRE, 2012). No caso dos cateteres as bactérias mais comuns são *S. epidermidis* associado a cateter venoso central e *E. coli* e *P. aeruginosa* a cateter urinário (COSTERTON & STEWART, 1999; LYNCH & ROBERTSON, 2008).

Entre as bactérias que causam infecções via cateter, o gênero *Pseudomonas* é a espécie *S. epidermidis* são de muita importância pela resistência intrínseca a vários antimicrobianos usados nas terapias convencionais comparados com as outras espécies presentes nestes biofilmes (BLAIR et al., 2015).

2.3 O bacilo Gram-negativo *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria Gram-negativa, aeróbica da família Pseumonadaceae, caracterizada pela imensa diversidade ecológica,

ocupando talvez a mais ampla variedade de nichos ecológicos que qualquer espécie bacteriana com capacidade de formar biofilmes sobre superfícies vivas e não-vivas (KULASEKARA & LORY, 2004, TRAUTMANN *et al.*, 2005; WINGENDER & FLEMMING, 2011; REDELMAN *et al.*, 2014). É considerado como um patógeno oportunista com uma ampla gama de hospedeiros que incluem insetos, plantas, animais e os seres humanos (MIKKELSEN *et al.*, 2011).

No aspecto clínico, *P. aeruginosa* causa doenças respiratórias, incluindo o agravamento de infecções em pacientes portadores da fibrose cística (FC) e graves infecções nosocomiais em queimaduras, ferimentos e transplantes de órgãos, além da capacidade de formação de biofilmes em dispositivos médicos (MAY *et al.*, 1991; LYNCH & ROBERTSON, 2008). As infecções causadas pelo biofilme de *P. aeruginosa* podem ser agudas e crônicas. As infecções agudas são caracterizadas por um rápido crescimento bacteriano, motilidade, citotoxicidade e rápida progressão da doença. Por outro lado, as infecções crônicas têm um crescimento mais lento, com formação de biofilme, resistência aos antibióticos e persistência (FURUKAWA *et al.*, 2006; MIKKELSEN *et al.*, 2011).

O biofilme de *P. aeruginosa* é considerado como modelo de estudo por ter um desenvolvimento padrão com uma adesão inicial, seguida pela formação de microcolônias, maturação e, finalmente, a dispersão, que libera células planctônicas de volta para o ambiente (SAUER *et al.*, 2002). Estruturalmente o biofilme tem conformação de cogumelo permeado por canais de água e suportado pela matriz de EPS (QING & LUYAN, 2013).

A matriz de EPS de *P. aeruginosa* é composta pelos polissacarídeos (Psl, Pel, e alginato), eDNA, proteínas, e os apêndices proteicos como as fimbrias (por ex.: Cup), pili tipo IV e os flagelos (QING & LUYAN, 2013). Esta matriz constitui uma barreira protetora nos ambientes, tendo funções na adesão, agregação das células, retenção de água, absorção de compostos orgânicos e inorgânicos, atividade enzimática e troca de informação genética (ELIAS, 2011).

No desenvolvimento do biofilme de *P. aeruginosa*, as bactérias apresentam alterações fisiológicas na adesão inicial gerando a produção de apêndices extracelulares e polissacarídeos que ajudam na transição de vida livre a estado sésil (MIKKELSEN *et al.*, 2011). Os apêndices extracelulares exercem diferentes funções: os flagelos medeiam nos movimentos de *swimming* e *swarming* nas células, dirigindo a quimiotaxia de subpopulações móveis para as sésseis nas superfícies com ajuda de ramnolipídios MIKKELSEN *et al.*, 2011; QING & LUYAN, 2013). O pili tipo IV exerce o movimento tipo *twitching* das subpopulações de células móveis em associação com o eDNA liberado pelas células sésseis na organização das microcolônias (BARKEN *et al.*, 2008; MIKKELSEN *et al.*, 2011; QING & LUYAN, 2013). A fimbria Cup facilita a estruturação do biofilme (VALLET *et al.*, 2001) e as interações entre as subpopulações de células sésseis e as móveis permitem a formação das estruturas de cogumelo próprias dos biofilmes maduros (YANG *et al.*, 2011).

Os polissacarídeos estão envolvidos na manutenção da estrutura e resistência a antibióticos (QING & LUYAN, 2013) e são os maiores componentes da matriz de *P. aeruginosa*. Em cepas mucoides predomina o

alginato e nas cepas não-mucoides os polissacarídeos Pel e Psl (COLVIN *et al.*, 2012). O alginato atua na proteção e estabilidade do biofilme como uma barreira física que evita a fagocitose e a inibição da quimiotaxia de neutrófilos e a ativação do complemento de resposta imune (QING & LUYAN, 2013). O Psl e Pel podem variar nas funções (IRIE *et al.*, 2012), em geral atuam como moléculas que estimulam a formação de biofilme, interferem na adesão e fixação inicial, na estrutura do biofilme e na resistência aos antibióticos e mecanismos de defesa do hospedeiro (YANG *et al.*, 2011; IRIE *et al.*, 2012; QING & LUYAN, 2013).

O DNA extracelular pode estar localizado em altas concentrações principalmente no interior das hastas das microcolônias e ser gerado a partir de DNA cromossômico aleatório, como secreção direta, como lise das subpopulações, por fagos ou pela liberação de pequenas vesículas de membrana (ALLESEN-HOLM *et al.*, 2006; SPOERING & GILMORE, 2006). O eDNA serve na comunicação célula-a-célula, nutrição, estrutura, resistência a antimicrobianos e é o maior componente pró-inflamatório (QING & LUYAN, 2013).

O desenvolvimento e função do biofilme de *P. aeruginosa* é regulado pelo processo de *QS* ou auto-indução (WU *et al.*, 2004). Este processo inclui um grande número de genes (200 ~ 300 genes, acerca de 6% do genoma) envolvidos no desenvolvimento do biofilme e fatores de virulência. Estes genes são ativados pelas moléculas auto-indutoras AHL (QING & LUYAN, 2013). Adicionalmente, apresenta outros sistemas como o segundo mensageiro *Bis*-(3'-5')-cyclic dimeric guanosine monophosphate (c-di-GMP), que é uma molécula

de sinalização intracelular amplamente conservada e o promotor AlgC que atua na regulação metabólica, coordenando a quantidade total de exopolissacarídeos produzidos (BOYD & O'TOOLE, 2012; MA *et al.*, 2012).

Além da capacidade de formar biofilme, *P. aeruginosa* tem outros mecanismos de virulência nos processos de infecção em humanos, estes começam quando a bactéria tem contato com as células epiteliais em um processo mediado por adesinas e ativa diferentes sistemas de virulência. Um deles é o sistema de secreção tipo III (T3SS) que permite a liberação de determinadas proteínas efetoras dentro da célula epitelial, com a consequente deterioração da resposta imune, lesão celular e morte celular (DRISCOLL *et al.*, 2007). O T3SS é um complexo semelhante a uma seringa na superfície da bactéria e contém cinco grupos de proteínas: o complexo da agulha, o aparelho de translocação, proteínas reguladoras, chaperonas e toxinas efetoras (HAUSER, 2009). O T3SS de *P. aeruginosa* utiliza três proteínas para a translocação: popB, Popd e PcrV. O PcrV auxilia na montagem e ligação de PopB e PopD na membrana do hospedeiro para formar o poro de translocação. Com ajuda de chaperonas são excretadas quatro toxinas efetoras pelo poro de translocação: ExoS, ExoT, ExoY e ExoU (GALLE *et al.*, 2012). Estas toxinas podem modificar o sinal nas vias de transdução e neutralizar a imunidade inata, ação associada no aumento da mortalidade em pacientes com pneumonia, sepse e FC (DRISCOLL *et al.*, 2007).

Outros fatores de virulência secretados por *P. aeruginosa* são a exotoxina A, as exoenzimas S e T, as proteases alcalinas, fenazinas, elastases e protease IV, que em alguns casos tem interrupção na síntese de proteínas e atuam na

degradação de proteínas imunorreguladoras e na disfunção das vias aéreas das células hospedeiras (DRISCOLL *et al.*, 2007).

2.4 O coco Gram-positivo *Staphylococcus epidermidis*

Staphylococcus epidermidis pertence ao gênero *Staphylococcus* constituído por 47 espécies e 23 subespécies e faz parte do grupo dos *Staphylococcus* Coagulase Negativos (SCoN) que são cocos Gram-positivos, sem motilidade e não formadores de esporos. Fisicamente estão dispostos em pares ou tétrades, mas também ocorrem de forma isolada, ou em agregados irregulares (cachos de uva), ou em cadeias curtas de cerca de três ou quatro células (BECKER *et al.*, 2014).

Os SCoN são comensais normais da flora da pele, as vias orais e a mucosa nasal em animais e humanos (GORDON *et al.*, 2012). *Staphylococcus epidermidis* foi identificado pelo cirurgião escocês Sir Alexander Ogston e Louis Pasteur em 1880 (ROGERS *et al.*, 2009). *Staphylococcus epidermidis* geralmente, não causa doenças e é considerado contaminante de culturas microbiológicas (ROGERS *et al.*, 2009). Embora tenha sido reconhecido por causar infecções em situações clínicas específicas como na introdução de dispositivos ou em pacientes imunocomprometidos. Na introdução de dispositivos, as bactérias entram no momento da inserção de válvulas cardíacas, próteses de articulações, cateteres intravenosos, cateteres peritoniais de diálise, marca-passos, lentes intraoculares, implantes de mama, entre outros (OTTO, 2009; GORDON *et al.*, 2012).

A patogenicidade de *S. epidermidis* é dada pela capacidade de produzir macromoléculas extracelulares e de superfície que permitem aumentar a adesão bacteriana nas superfícies bióticas e abióticas produzindo biofilme (OTTO, 2009). A aderência inicial de *S. epidermidis* parece ser mediada por uma adesina polissacáridica chamada PS / A e as proteínas de superfície SSP-1, SSP-2 é a autolisina E (AtlE) (STOODLEY *et al.*, 2004; SEIJA, 2010; OTTO, 2012). A proteína AtlE hidrolisa o peptidoglicano da parede celular e libera o DNA extracelular (BECKER *et al.*, 2014). Outras proteínas associadas na formação de biofilme são a Bap e a proteína associada à acumulação (Aap) (STOODLEY *et al.*, 2004; FITZPATRICK *et al.*, 2005; LAVERTY *et al.*, 2013).

Após a adesão inicial, acontece a adesão célula-célula que é mediada pelo polissacarídeo beta-1,6-glicosaminoglicano chamado PIA (SEIJA, 2010). As enzimas envolvidas na síntese da PIA são codificadas pelo operon ica, que compreende os genes icaA, icaB, icaC e icaD (RACHID *et al.*, 2000).

A regulação do operon ica é fundamental na virulência do biofilme de *S. epidermidis*. O fator sigma B controla a transcrição deste operon e o mecanismo ainda não é claro, uma hipótese seria o controle por meio da presença de genes que codificam a proteína SarA. Esta proteína regula positivamente a produção de PIA por meio de um mecanismo icaR-independente, podendo ser influenciada por fatores ambientais como etanol, sal e limitação de ferro. (FITZPATRICK *et al.*, 2005; LAVERTY *et al.*, 2013). A SarA também afeta a expressão de mais de 100 genes, incluindo o sistema gene regulador acessório

(agr) de estafilococos, que por sua vez controla a expressão de muitos fatores de virulência (FITZPATRICK et al, 2005).

Staphylococcus epidermidis apresenta uma substancial adaptação em nível de genoma para o crescimento na forma de biofilmes, incluindo a regulação negativa (“down-regulation”) de processos celulares básicos como biossíntese de ácidos nucléicos, de proteínas e de parede celular, fato que associa a formação de biofilmes à sua patogenicidade (YAO *et al.*, 2005).

Em biofilmes de *S. epidermidis* o DNA extracelular (eDNA) atua como um componente estrutural, facilitando a agregação intercelular, sendo fonte de nutrientes e intercambiando da informação genética entre a comunidade microbiana. Os mutantes de *S. epidermidis* que não possuem o gene *atlE* formam biofilmes com menor abundância de eDNA quando comparados ao tipo selvagem e apresentam uma redução significativa na capacidade de causar infecção in vivo, sugerindo que o eDNA pode contribuir para a sua patogênese (DOROSHENKO *et al.*, 2014).

2.5. Resistência antimicrobiana

2.5.1 Resistência antimicrobiana em nível celular

A resistência antimicrobiana em nível celular é um fenômeno natural produto de milhões de anos de evolução que tem ligação com os sistemas de resposta ao estresse. Os antibióticos atuam como '*estressores*' interferindo nos processos chaves das células bacterianas (POOLE, 2012; BLAIR *et al.*, 2015).

As bactérias expostas a diferentes tipos de estresse sofrem mudanças na fisiologia celular, ativação de mecanismos de resistência, promoção de um estilo de vida resistente (biofilme) e indução de resistência por mutações (POOLE, 2012).

Os mecanismos de resistência anti-bacterianos gerais incluem o bloqueio da entrada do agente antimicrobiano na célula, a saída ativa da célula, a degradação enzimática e alteração da estrutura alvo (DRISCOLL *et al.*, 2007). A bactéria pode ter resistência intrínseca a certos antibióticos, mas também pode adquirir resistência por mutações dos genes ou pela transferência horizontal de genes e por plasmídeos (BLAIR *et al.*, 2015). Em *P. aeruginosa* há basicamente três tipos de resistência: i) presença de β -lactamases, ii) permeabilidade da membrana dada pela presença de bombas de efluxo (*efflux pumps*) e iii) as mutações das porinas transmembranais (GOMEZ *et al.*, 2005).

As enzimas β -lactamases hidrolisam o anel β -lactâmico dos antibióticos, destruindo assim o local ativo do antibiótico inibindo sua atividade (ZHAO & HU, 2010). *P. aeruginosa* tem duas classes de lactamases: A Amp-C e as β -lactamases de espectro estendido (ESBL) que têm resistência às penicilinas e cefalosporinas. Amp-C é codificada no cromossomo da bactéria e as ESBL são codificadas por plasmídeos adquiridos no DNA extacromossômico (GOMEZ *et al.*, 2005).

A permeabilidade da membrana externa é dada pelo sistema de bombas de saída que são constituídas por três compostos: uma proteína transportadora de droga-próton, um canal exterior na membrana periplasmática e uma proteína de fusão que liga as outras duas proteínas (AVRAIN *et al.*, 2013). Estas

bombas podem ser expressas constitutivamente em níveis baixos ou ser superexpressas quando existem mutações de genes repressores, gerando cepas resistentes aos antimicrobianos (DRISCOLL *et al.*, 2007). As cepas resistentes são o resultado do uso empírico de antibióticos que induziu a evolução na resistência bacteriana surgindo o fenótipo de Resistência a Múltiplos Medicamentos (MDR) (HIRSCH & TAM, 2010).

O genoma de *P. aeruginosa* tem pelo menos 10 diferentes *operons* que codificam o sistema de bombas. As principais bombas MexAB-OprM e MeXY-OprM pertencem à superfamília RND (*Resistance-Nodulation-Division*) que são expressas constitutivamente em nível basal em cepas selvagens e são induzíveis quando são expostas a antibióticos. Os outros sistemas (MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexJK, MexGHI-OPMD, MexVW, MexPQ-OPME, MexMN, e TriABC não são expressos em cepas tipo selvagem, mas podem contribuir na resistência a antibióticos e biocidas quando são expressas em cepas resistentes (DRISCOLL *et al.*, 2007; AVRRAIN *et al.*, 2013).

O sistema de bombas RND pode liberar uma ampla gama de substratos, incluindo a primeira linha de antibióticos antipseudomonas tal como β -lactâmicos, inibidores β -lactamase, cefalosporinas, cloranfenicol, macrolídeos, tetraciclinas, trimetoprima, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos (AVRAIN *et al.*, 2013; ACKER *et al.*, 2014).

As porinas transmembranas das bactérias Gram-negativas possibilitam a absorção passiva de aminoácidos básicos na membrana externa e permitem a entrada de alguns antibióticos (GOMEZ *et al.*, 2005). A principal porina associada na membrana de *P. aeruginosa* é a OprD. A redução na expressão

desta proteína por mutações tem incidência na resistência bacteriana pela redução na formação de poros que permitem a entrada de carbapenems e cefalosporinas (BLAIR *et al.*, 2015).

A atuação destes mecanismos pode ser observada na Figura 2 que mostra um exemplo do mecanismo de resistência intrínseca bacteriana que é resultado das características estruturais inerentes nas células (BLAIR *et al.*, 2015).

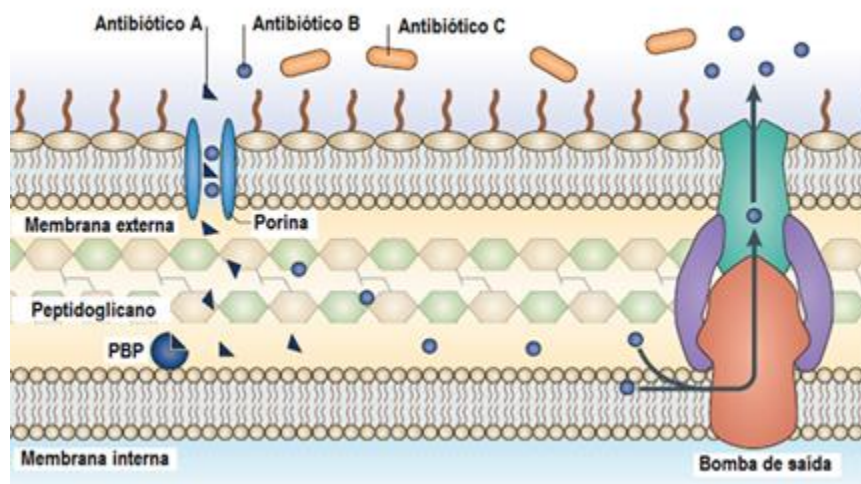


Figura 2: Mecanismo de resistência intrínseca.

A figura apresenta uma visão geral de um mecanismo de resistência intrínseca. No exemplo, um antibiótico β -lactâmico dirigido a uma proteína de ligação à penicilina (PBP). O antibiótico A pode entrar na célula através de uma proteína porina que atravessa a membrana e atingir na sua meta e inibir a síntese de peptidoglicano. O antibiótico B também pode entrar na célula através de uma porina, mas ao contrário do antibiótico A, é removido eficientemente pelo efluxo de saída. O antibiótico C não pode atravessar a membrana externa e é incapaz de acessar o alvo PBP. (Modificado de BLAIR *et al.*, 2015).

Em estafilococos a resistência antimicrobiana é gerada pela existência de reservatórios de genes que promovem a colonização e a virulência (OTTO, 2013). Dentre os fatores de virulência, incluem-se diferentes tipos de toxinas (citotoxinas, toxinas esfoliativas, enterotoxinas e a toxina 1 da síndrome do choque tóxico) e enzimas (coagulase, hialuronidase, fibrinolisinase, lipases,

nucleases) que facilitam a destruição tecidual e, um número de componentes estruturais (cápsula, camada limosa, proteína A e adesinas), que impedem a ação de fagócitos e anticorpos e medeiam a adesão tecidual e colonização (MURRAY *et al.*, 2009a).

Staphylococcus epidermidis é capaz de expressar determinantes que provocam sua persistência como a adaptação no nível de genoma para o crescimento na forma de biofilmes, incluindo a regulação negativa (“down-regulation”) de processos celulares básicos como biossíntese de ácidos nucléicos, de proteínas e de parede celular, fato que associa a formação de biofilmes à sua patogenicidade (YAO *et al.*, 2005).

2.5.2 Resistência bacteriana no biofilme

Na estrutura do biofilme a resistência bacteriana tem relação com diferentes mecanismos que garantem a sobrevivência das bactérias no biofilme. Na Figura 3, Da Fuente-Núñez e colaboradores apresentam alguns destes mecanismos.

Muitos destes mecanismos são produtos de alterações drásticas no programa transcricional das espécies do biofilme e podem afetar a ação de várias classes de antibióticos. Em contraste, outros mecanismos são muito específicos da espécie e / ou específicos para certos antibióticos (DE LA FUENTE-NÚÑEZ *et al.*, 2013).

Entre estes mecanismos, os mais estudados e frequentes na resistência bacteriana nos biofilmes são: a) a proteção fornecida pelas propriedades da EPS; b) a heterogeneidade fisiológica do biofilme que contém subpopulações resistentes (persistenter cells); c) a proteção específica de biofilme contra o

estresse oxidativo; d) e a transferência horizontal de genes e mutações (BRIDIER *et al.*, 2011; ELIAS, 2011; ACKER *et al.*, 2014).

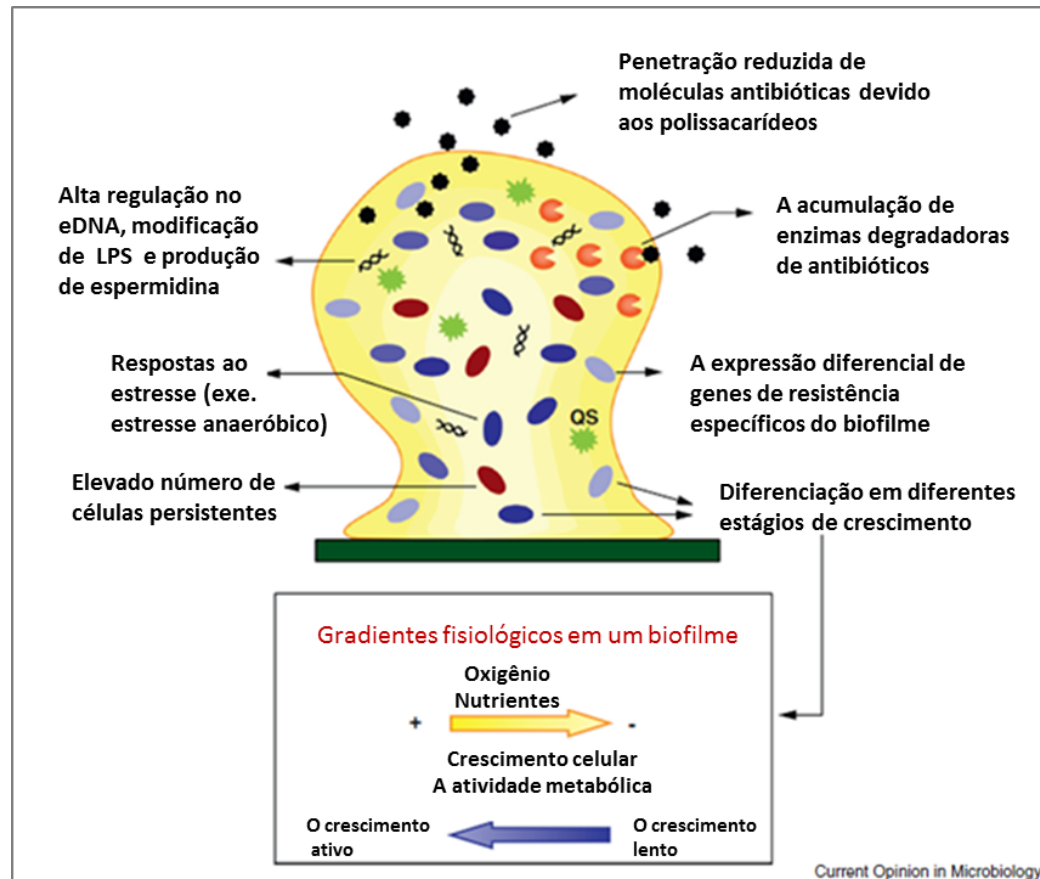


Figura 2: Representação esquemática de um biofilme de *P. aeruginosa* indicando vários exemplos de mecanismos de resistência adaptativa expostos durante o estado de crescimento multicelular. O quadro mostra os gradientes de oxigênio e nutrientes formados dentro da estrutura do biofilme e como eles se relacionam com a diferenciação celular em diferentes estados de crescimento. Abreviaturas: *QS*, sinal de quorum-sensing; eDNA, DNA extracelular. (Modificado de DE LA FUENTE-NÚÑEZ *et al.*, 2013).

a) Proteção fornecida pela matriz de EPS: as interações entre os componentes da EPS junto com as várias camadas de células podem restringir a difusão das moléculas dos antibióticos, gerando dificuldades para que estes penetrem nas camadas internas, dificultando, assim, a sua

eficácia (BRIDIER *et al.*, 2011). Além disso, é provável que a matriz facilite a acumulação de enzimas que degradam antibióticos, tais como β -lactamases e aumentem a produção de polissacarídeos, como acontece em *P. aeruginosa* que tem sobreprodução de alginato (ANDERL *et al.*, 2000; MAH, 2012).

b) Heterogeneidade fisiológica do biofilme: as populações no biofilme têm diferentes níveis de atividade, relacionado ao gradiente de concentração de oxigênio, disponibilidade de nutrientes e resíduos (Fig. 3 e 4). Assim, mesmo considerando os antimicrobianos que penetram no EPS, algumas células dentro do biofilme permanecem protegidas, devido a sua baixa taxa metabólica. Estas células são nomeadas células dormentes (*persisters*) e podem tolerar certos agentes antimicrobianos e são consideradas como células de sobrevivência especializadas (LEWIS, 2010).

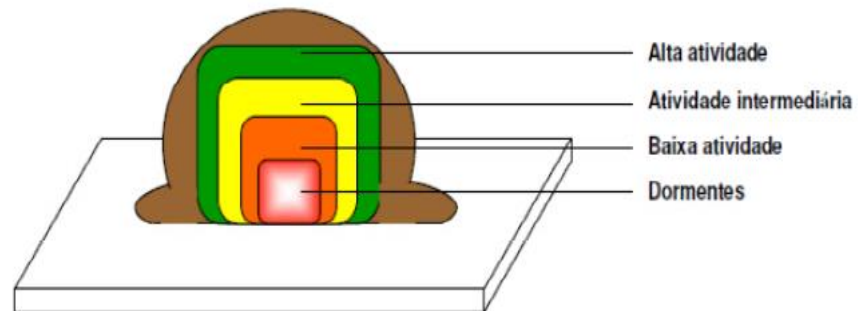


Figura 3: Níveis de atividade das populações no biofilme de acordo com o gradiente de concentração de oxigênio, disponibilidade de nutrientes e resíduos (Adaptado de DAVIES, 2003).

c) Proteção específica de biofilme contra o estresse oxidativo: o biofilme protege as células da ação de espécies reativas de oxigênio (EROs) que são altamente prejudiciais para as células, danificando macromoléculas e

levando à morte celular. Estas EROs são produto da ação de altas doses de antibióticos que induzem alterações bioquímicas e criam um ambiente intracelular que promove sua formação (Dwyer *et al.*, 2009).

d) Transferência horizontal de genes e mutações: a conformação de biofilme favorece a transferência de genes que participam na adaptação microbiana no meio ambiente através da troca de sequências gênicas, incluindo plasmídeos, transposons ou integrons que conferem características fenotípicas específicas nas células, tais como: as capacidades metabólicas, expressão de virulência e resistência antimicrobiana. Além da emergência de uma alta diversidade genética nas populações (Bridier *et al.*, 2011).

2.6 Estratégias para tratamentos de biofilmes

As bactérias patogênicas estão se tornando cada vez mais resistentes aos antimicrobianos e nos biofilmes são mais virulentas e menos suscetíveis ao tratamento (Stewart & Costerton, 2001; Olivares *et al.*, 2013). Neste contexto, surge a busca de estratégias para a prevenção na formação de biofilme, na modulação e erradicação de biofilmes já formados. A Figura 5 apresenta os principais alvos das possíveis estratégias que podem ser usadas no combate de biofilmes patogênicos.

1) Inibição da adesão bacteriana. Na inibição da adesão bacteriana inicial, as estratégias incluem a inibição da adesão de micro-organismos à superfície e a modificação das superfícies. A adesão dos micro-organismos em superfícies

bióticas pode ser alterada pela inibição do crescimento bacteriano com o uso de compostos bactericidas ou bacteriostáticos ou, através do bloqueio da adesão bacteriana por interferência na biossíntese dos apêndices proteicos (fimbrias e pili), indispensáveis na adesão inicial, com o uso de compostos como os pilicidas ou compostos quelantes de ferro (ALVIN *et al*, 2013; TRENTIN *et al.*, 2013). A modificação de superfícies abióticas pode ser feita com alterações nas propriedades físicas, químicas e topográficas (RENNER & WEIBEL, 2011). Entre estas se tem o desenvolvimento de superfícies com características físicas de antiaderência que evitam interações físico-químicas que medeiam a adesão primária ao substrato e o recobrimento das superfícies com antibióticos e moléculas inibidoras do sistema de *QS* (TRENTIN, 2013).

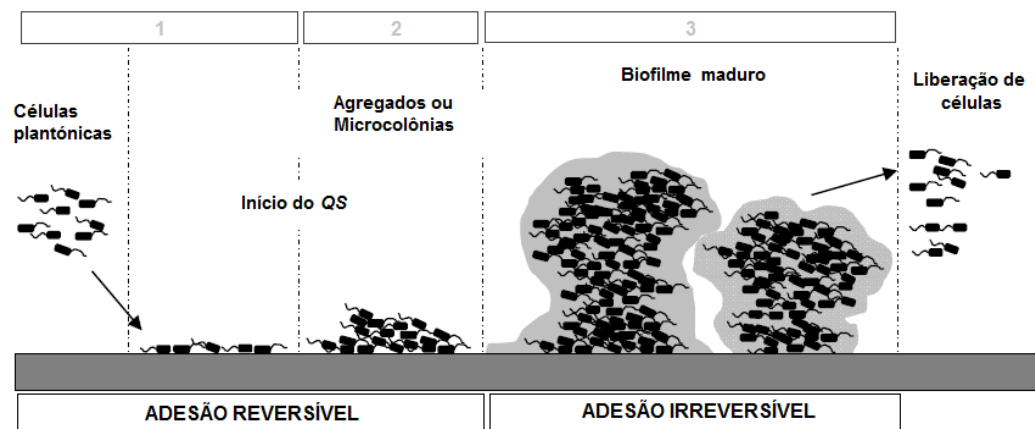


Figura 4: Principais alvos para combate aos biofilmes microbianos: 1) inibição da adesão bacteriana, 2) o rompimento da comunicação celular bacteriana - *Quorum sensing* 3) e a erradicação ou tratamento de biofilmes já formados (TRENTIN, 2013. adaptada de MACEDO e ABRAHAM, 2009).

2) **Rompimento da comunicação celular bacteriana (*QS*):** a interrupção do sistema de *QS* constitui um dos principais alvos no tratamento de biofilmes. Esta comunicação pode ser alterada por diferentes mecanismos: (i) redução da atividade das proteínas receptoras, (ii) inibição da produção de

moléculas sinalizadoras de *QS*, (iii) e mimetismo das moléculas sinalizadoras com compostos análogos, entre outros (KALIA, 2013).

Os inibidores de *QS* (QSI) diferem dos antibióticos convencionais por não ter como alvo o crescimento e a vida basal das bactérias e, por conseguinte, o desenvolvimento de resistência a drogas é minimizado (BJARNSHOLT *et al.*, 2013). Estes inibidores podem ser dos mesmos micro-organismos, de origem natural derivados de plantas, fungos ou sintetizados quimicamente (BJARNSHOLT *et al.*, 2013). Alguns exemplos de interferência no sistema de *QS* de *P. aeruginosa* são mencionados por Romling & Balsalobre (2012), entre estes se encontram: a interferência nos sinais da homoserina-lactona (HSL), o sequestro do segundo mensageiro c-di-GMP que remove as sequências de nucleotídeos a partir do sistema de sinalização, promovendo a dispersão do biofilme. Outro mecanismo é a interação no metabolismo do ferro. O ferro é um fator importante na sinalização na formação do biofilme e pode-se substituir o Fe (III) por íons metálicos inativos como Sc (III), In (III) ou Ga (III) gerando atividade anti-biofilme (BJARNSHOLT *et al.*, 2013).

Para *P. aeruginosa* estão reportados diferentes inibidores de *QS* entre os que se encontram: furanonas, a solenopsina, alho, a patulina de origem natural; o ácido salicílico, nifuroxazida, a azitromicina em medicamentos aprovados e as furanonas modificadas (C30, C56), 4NPO, C10-CPA de tipo sintético (BJARNSHOLT *et al.*, 2010, 2013).

3) Erradicação ou tratamento de biofilmes já formados: a erradicação do biofilme já estabelecido inclui tratamentos mecânicos, físicos e químicos. Entre estes se encontram a terapia fotodinâmica, o uso de

nanopartículas, segmentação da matriz do biofilme para a degradação, a ativação de sinais bloqueadores, a interferência com a regulação do biofilme, a indução do desapego de biofilme e o uso de estratégias citotóxicas para o tratamento das bactérias formadoras de biofilme (RÖMLING & BALSALOBRE, 2013).

Nos biofilmes patogênicos o tratamento é focado na degradação da matriz de EPS e na dispersão das células bacterianas com o fim de facilitar a penetração dos antibióticos tradicionais nos patógenos. Os mesmos microorganismos produzem moléculas sinalizadoras que estimulam o mecanismo natural de dispersão de biofilmes e são capazes de dissolver o biofilme em condições desfavoráveis, como mudanças de pH e privação nutricional (TRENTIN, 2013). Estas moléculas constituem uma fonte na busca de compostos para a erradicação de biofilmes (MACEDO & ABRAHAM, 2009). Dentro destas moléculas se encontram enzimas e metabólitos microbianos (JOHANSEN *et al.*, 1997; LEQUETTE *et al.*, 2010; SIMÕES, 2011;).

Alguns exemplos de enzimas com atividade na erradicação de biofilmes são: a enzima dispersina B, uma N-acetilglicosaminidase produzida por *Actinobacillus actinomycetemcomitans* que atua na EPS de diferentes biofilmes bacterianos hidrolisando o polímero β -1,6-N-acetil-D-glucosamina (poly- β -1,6-GlcNAc) implicado nas adesinas do biofilme (KAPLAN *et al.*, 2003; SIMÕES, 2011). Enzimas oxidorreduzases, DNAses, esterases que alteram as propriedades físicas do biofilme, glicanases promovidas por fagos e enzimas do tipo alginato liase, capazes de degradar o polímero alginato (ALKAWASH *et al.*, 2006; SIMÕES, 2011).

Além das enzimas, outros tipos de moléculas podem ser usadas na erradicação de biofilme, como os polissacarídeos sintéticos (SIMÕES, 2011) e o uso de fagos que podem produzir enzimas que degradam a matriz EPS e podem induzir a dispersão do biofilme (BJARNSHOLT *et al.*, 2013).

Segundo dados compilados por Trentin (2013), após duas décadas de incansável esforço com produção de patentes e mais de 250 mil publicações, ainda não se tem o lançamento do primeiro produto antibiofilme. Somente o uso combinado das diferentes alternativas existentes permite combater os biofilmes. Esta necessidade latente faz que a maioria das pesquisas tenham focado na procura por estratégias para modular ou erradicar biofilmes microbianos patogênicos por ação de compostos bioativos oriundos de distintas fontes.

Essa estratégia é o foco desta pesquisa que visa procurar moléculas oriundas do metabolismo secundário de micro-organismos associados a Drosera para a erradicação de biofilmes patogênicos em dispositivos de uso clínico, tendo como alvo as bactérias, a Gram- negativa *P. aeruginosa* e a Gram negativa *S. epidermidis* e um modelo de dispositivo médico.

2.7 Bactérias associadas a plantas carnívoras como fonte de metabólitos para erradicar biofilmes

Dentre as cerca de 300.000 espécies de angiospermas, 650 espécies pertencem a plantas carnívoras (KRÓL *et al.*, 2012). O termo “*carnívoro*” é atribuído a plantas que podem digerir presas por meio de secreção de enzimas. A primeira evidência da síndrome de plantas carnívoras foi fornecida por

Darwin em 1875 em seu livro "*Insectivorous plants*", mas, o termo foi modificado por não incluir os demais tipos de presas que estas plantas podem consumir (BANASIUK *et al.*, 2012).

As plantas carnívoras são essencialmente organismos fototróficos que desenvolveram mecanismos para atrair, capturar e digerir pequenos animais para obter um suprimento extra de nutrientes como um tipo de adaptação em ambientes pobres em nutrientes (CRUZ *et al.*, 2010). Evolutivamente estas plantas têm desenvolvido nichos para as mais diversas populações de micro-organismos, entre as que se encontram bactérias, algas, protozoários e rotíferos que interferem na aptidão da planta, digestão da presa e adaptação ambiental (CARAVIERIA *et al.*, 2014).

No caso das bactérias associadas a plantas carnívoras, estas exercem uma ação cooperativa de simbiose com a planta, contribuindo na mineralização de nutrientes, a fixação de nitrogênio e principalmente no auxílio da decomposição e digestão de insetos (BUTLER *et al.*, 2008, KOOPMAN *et al.*, 2010).

Para poder capturar as presas, as plantas carnívoras têm desenvolvido modificações das folhas formando armadilhas que suportam as comunidades microbianas e as presas capturadas (SIROVÁ *et al.*, 2014). O tipo de bactérias associado nestas estruturas não é aleatório e parece ter uma interação planta-micro-organismo específica (KOOPMAN *et al.*, 2010). A adesão das bactérias nestas estruturas é auxiliada pela presença de mucilagem que contém as enzimas necessárias para libertar os nutrientes a partir da presa e em algumas

espécies também asseguram a retenção efetiva da presa devido às suas propriedades viscoelásticas (BONHOMME *et al.*, 2011; BAUER *et al.*, 2012).

A presença desta mucilagem e os fluidos são propícios para o crescimento dos micro-organismos. Neste ambiente, estes micro-organismos podem entrar em competição pelo espaço e nutrientes. Essa competição se dá pela produção de metabólitos com capacidade de inibir a adesão desses micro-organismos na superfície das armadilhas e o auxílio na digestão dos insetos – sendo esses metabólitos (moléculas) o foco deste estudo para prospecção de moléculas com capacidade de erradicar biofilmes.

Este tipo de metabólito tem sido evidenciado em diferentes espécies de bactérias como resultado evolutivo e a sobrevivência dos micro-organismos no meio ambiente, gerando micro-organismos que produzem substâncias únicas, com funções ecológicas diversas como forma de defesa contra inimigos naturais, predadores e competidores (PINTO, 2002; TAYLOR, 2007).

Neste estudo, os micro-organismos de interesse são as bactérias associadas ao gênero *Drosera* da família *Droseraceae*, que cresce na região litoral de nova Tramandaí no Rio Grande do Sul, Brasil. O gênero *Drosera* (Fig. 6) é um dos gêneros com o maior número de espécies dentro das plantas carnívoras, tendo 196 espécies reportadas (MURZA *et al.*, 2006).

Os habitats naturais deste gênero são os pântanos, mangues, arquibancadas molhadas, áreas pantanosas e linhas costeiras e está presente em todos os continentes exceto a Antártica (KRÓL *et al.*, 2012).

Muitas plantas deste gênero crescem em forma de roseta (algumas possuem um caule, embora a maioria não). Na maior parte dos casos, as flores

são produzidas sobre hastes florais, numa altura bastante superior ao do resto da planta (mas há casos em que as hastes florais são bem curtas ou até mesmo inexistentes) (HABERLANT, 1982).



Figura 5: Espécies de plantas carnívoras do género *Drosera* A) *Drosera communis*. B) *Drosera capensis*. C) *Drosera callistos*. D) *Drosera spatulata*. (Fonte: www.omnisterra.com)

As folhas são especializadas na captura, digestão da presa e absorção de nutrientes, diminuindo assim as suas taxas fotossintéticas (ADAMEC, 2010). Cada folha é formada pelo pecíolo e a lâmina e na face superior da lâmina estão presentes numerosos tentáculos, cujas pontas são cobertas por uma substância pegajosa chamada de mucilagem secretada por glândulas (reluzente quando

vista contra o sol). O conjunto destas estruturas forma as armadilhas (Fig. 7) (POPPINGA *et al.*, 2013).

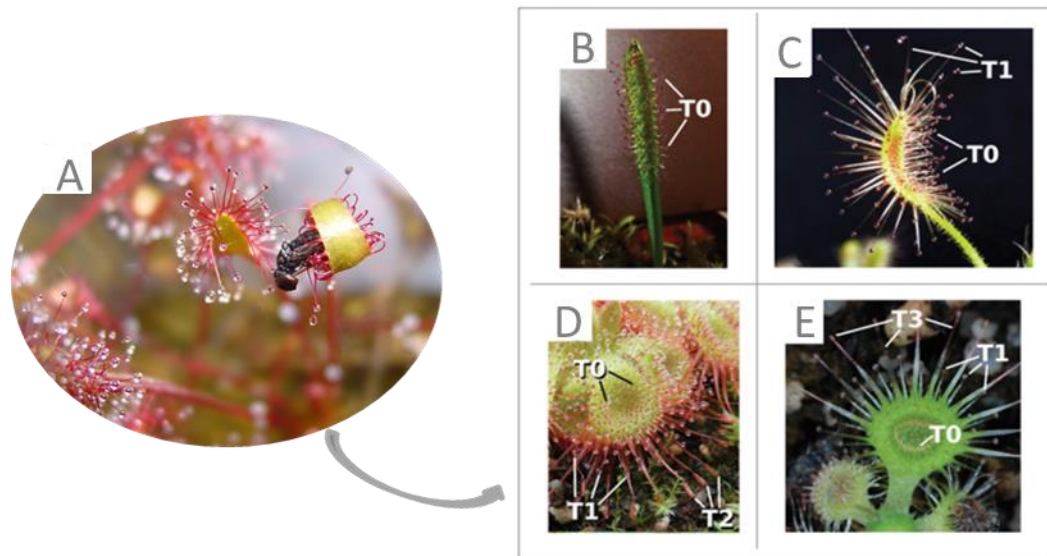


Figura 6: As armadilhas compostas de *Drosera* A) Armadilha ativa de *D. anglica* B) *D. arcturi* as folhas da armadilha só apresentam tentáculos T0. C) *D. scorpioides* a armadilha tem tentáculos T0 e T1. D) *D. sessilifolia* tem tentáculos T0, T1 e T2. E) *D. glanduligera* tem tentáculos T3, T0 e T1. (modificado de POPPINGA *et al.*, 2013; *Drosera anglica*, NE4, 2006).

Os tentáculos se caracterizam por ser extremamente sensíveis ao toque (HABERLANT, 1982). São diferenciados em quatro tipos: os T0 são os tentáculos típicos com pontas de mucilagem que aparecem em todas as espécies de *Drosera*; T1 são longos de simetria radial que se podem dobrar rapidamente de forma reversível de vários segundos até minutos; T2 são de simetria bilateral, livres de mucilagem e se podem dobrar no prazo de cinco segundos; T3 são tentáculos de simetria bilateral, sem mucilagem que se podem dobrar irreversivelmente em menos de um décimo de segundo (POPPINGA *et al.*, 2013).

Nas armadilhas as glândulas dos tentáculos cumprem funções simultâneas secretando enzimas digestivas, atendendo a absorção de nutrientes e exsudando compostos orgânicos que apoiam a associação das comunidades microbianas (KRÓL *et al.*, 2012), formando um fluido complexo no mucilagem.

Em algumas espécies têm sido reportado que mais de 58% da biomassa do complexo de fluido nas armadilhas é composto por bactérias (ADAMEC, 2010; KRÓL *et al.*, 2012). Em relação à *Drosera* têm sido reportado os gêneros de bactérias *Bacillus*, *Burkholderia*, *Methylobacterium*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas* e *Sphingomonas* (ALBINO *et al.*, 2006).

Muitos destes gêneros bacterianos são conhecidos pela produção de moléculas com atividade antibiótica e na anti-formação e degradação de biofilme (por ex.: ANWAR & SALEEMUDDIN, 1998; SINGH *et al.*, 2001) e são essas moléculas as que podem ser usadas com uma estratégia dupla para sua aplicação no combate dos biofilmes patogênicos, auxiliando na degradação da EPS o como antibiótico, além de visar seu uso no recobrimento de superfícies.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

- Procurar novas moléculas com o potencial de erradicar biofilmes patogênicos associados com implantes médicos.

3.2 Objetivos específicos

- Rastrear bactérias associadas a plantas carnívoras do gênero *Drosera* com capacidade de erradicar biofilmes dos patógenos *Pseudomonas aeruginosa* e ou *Staphylococcus epidermidis*;
- Produzir e extrair moléculas bioativas oriundas de bactérias associadas à *Drosera* e efetuar ensaios de atividade erradicadora de biofilmes patogênicos;
- Realizar o fracionamento bioguiado do sobrenadante bioativo com atividade promissora visando à purificação dos compostos ativos;
- Testar a atividade de erradicação de biofilme do sobrenadante bioativo usando o cateter urinário como modelo de dispositivo de uso na clínica.

CAPITULO I

**Eradication of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm by metabolites from
Bacillus sp. (CFS3632) isolated of Carnivorous Plant *Drosera* from
South Brazil**

Nedy Ramírez Lizcano^a, Marcelo Jung Eberhardt^a, Alexandre José Macedo^{a,b,*}

^a Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^b Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

*Corresponding author.

ABSTRACT

Pathogenic biofilms associated to medical devices are one of the main problems in hospital environments. This type of biofilms provides stability and protection to bacterial communities adhered on surfaces, promoting the development of resistance to treatments with antibiotics. These features enhance virulence and difficult treating chronic diseases, in addition to help spreading opportunistic pathogens. Treatment of these biofilms includes the inhibition of their formation or eradication. The eradication of pathogenic biofilms can be performed by physical or chemical methods, and the use of bioactive molecules can induce the degradation of the exopolysaccharides (EPS) matrix or intervention in metabolic pathways. Micro-organisms associated with carnivorous plants are important source of biomolecules due to their high production of metabolites for defense and their competition for space, in addition to the production of enzymes that helps digestion of the prey inside the plant. In this context, retrieving and producing bioactive extracts originated from bacteria associated to the genus *Drosera* have the potential to eradicate the pathogenic biofilm of *Pseudomonas aeruginosa*. One hundred ninety three bacterial isolates from carnivorous plants *Drosera* were collected in the seaside region of Nova Tramandaí (RS- Brazil) and cultivated in skin milk agar at room temperature to evaluate the proteolysis activity. Only 35 bacterial isolates presented proteolytic activity on this assay. They were cultivated in a R2A medium and the supernatants were obtained by centrifuged for the biofilm eradication assay against the *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, using a

violet crystal assay in a 96-well microplate. From those 35 samples, the bacterial isolate BCP_3632 identified as *Bacillus pumilus* had a constant biofilm eradication activity against *P. aeruginosa* *in vitro* assays. *Bacillus* supernatant was used for anti-biofilm activity, determination of the minimum biofilm eradication concentration and the bioguided fractionation of bioactive molecule. The bioactivity of *Bacillus sp.* supernatant for biofilm eradication can be attributed to one molecule of approximately 34 kDa that possibly degraded the EPS matrix in the biofilm and generates antimicrobial activity in the cells. This study provide an approach to obtain compounds produced by microorganism associated to *Drosera* with the ability to eradicate of *P. aeruginosa* biofilms. Also creates expectations about the usage of this biomolecule for controlling clinical infections from pathogenic bacteria with capacity to form biofilms in medical devices.

Keywords: Pathogenic biofilms, *Pseudomonas aeruginosa*, EPS matrix, Biofilm eradication, Carnivorous plants, *Drosera*

1. INTRODUCTION

Bacteria naturally exist as planktonic cells or associated in structures involved by hydrated matrix of exopolysaccharide (EPS), extracellular DNA (eDNA), and protein forming a slimy layer known as a biofilm (STEWART & COSTERTON, 2001). Biofilm development can be divided into three distinct stages: attachment of cells to a surface, growth of the cells into a sessile biofilm colony, and detachment of cells from the colony into the surrounding medium (STEWART & COSTERTON, 2001; KAPLAN, 2010). The mature biofilms have a characteristic mushroom-like structure that contains channels that are essential for providing nutrients to cells in deeper biofilm layers. The biofilm formation and maturation is regulated by changes in gene expression, including a system called *Quorum sensing (QS)*, which is a phenomenon dependent on cell density (JOO & OTTO, 2012).

The biofilm formation have evolutionary roots generated by a combination of stress signals that triggered the activation of certain molecular pathways in microorganisms resulting in the appearance of the biofilms as an advantageous adaptation of survival (DE LA FUENTE-NÚÑEZ *et al.*, 2013). Pathogenic strains in biofilms are resistant to disinfectant chemicals, to antibiotics, to phagocytosis and to other components of the innate and adaptive defense system of the host (HOIBY *et al.*, 2011). These features support the increase of virulence of the pathogenic microorganism in humans. In clinical settings this ability to form biofilms contributes to the chronicity of infections such as those associated with the use of medical implants (DAROUICHE, 2001; HOIBY *et al.*, 2011, ARCIOLA *et al.*, 2012b). Pathogenic bacteria adhere to the surface of biomaterials in different types of implants as central venous catheters, urinary catheters, prosthetic heart valves and orthopedic devices (STEWART & COSTERTON, 2001; LUANNE *et al.*, 2004).

Between bacteria involved in infections associated with biofilm development in medical devices are Gram-positive and Gram-negative species, being the most common *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* species (DE LA FUENTE-NÚÑEZ *et al.*, 2013). The Gram-negative *Pseudomonas aeruginosa* is able to form biofilms in a number of living and non-living surfaces and is an opportunistic pathogen with the capacity to cause serious diseases, including chronic biofilm infections in humans (CARLY *et al.*, 2014; WINGENDER & FLEMMING, 2011). The *P. aeruginosa* infections generally persist despite the use of long term aggressive antimicrobial therapy and have been associated with the formation of antibiotic-resistant biofilms (COSTERTON *et al.*, 1999; QING WEI & LUYAN, 2013).

The strategies to combat pathogenic biofilms include: a) inhibition of the initial adhesion by surface modification or interference in the cell-cell communication system (QS); b) removing biofilms formed by use of molecules able to disintegrate the EPS matrix. These molecules with activity in treating biofilms may have a biological or synthetic origin. Some metabolites and enzymes product of the secondary metabolism of bacteria demonstrated efficiency in the treatment of pathogenic biofilms (e.g. SHAKIR *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2014; RAJESH & RAVISHANKAR, 2014). This type of bacterial molecules is an evolutionary result generated by survival mechanisms in the environment by producing unique substances with functions of defense against predators and competitors (PINTO, 2002; TAYLOR, 2007).

Carnivorous plants are characterized by having developed a cooperative symbiosis with several bacterial species (KOOPMAN *et al.*, 2010). The bacterial species inhabit embedded in a mucilaginous substance produced by glands present in tentacles of the capture traps (SIROVÁ *et al.*, 2014). Within these traps bacterial communities contributing

to the mineralization of nutrients and nitrogen fixation assist in the decomposition and digestion of prey, and in return explore the high nutritional content present in the medium for their maintenance (BUTLER *et al.*, 2008; KOOPMAN *et al.*, 2010). The utilization of nutrients and retention within the medium generate competition among different bacterial communities producing of molecules that prevent the attachment of other bacteria within the trap. These molecules, along with the enzymes that bacterial communities produce helps in the degradation and digestion of prey and constitute a resource for the treatment of pathogenic biofilms.

Drosera is one of the genera of carnivorous plants most common present on all continents except Antarctica and grows in the marshes, swamps, wet stands, wetlands and shorelines (ALBINO *et al.*, 2006; MURZA *et al.*, 2006). In addition, most of the bacterial groups of interest known as able to produce molecules with antibiotic activity, anti-formation and biofilm degradation might be found in these plants (ANWAR & SALEEMUDDIN, 1998; SINGH *et al.*, 2001). The *Bacillus*, *Burkholderia*, *Methylobacterium*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas* and *Sphingomonas* have been associated with the Drosera genus. (KRÓL *et al.*, 2012). In this context, is intended to produce and extract bioactive molecules originated from bacteria associated to the genus Drosera to test for the ability to eradicate pathogenic biofilms of *P. aeruginosa*.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Isolation and screening of bacteria associated with the carnivorous plants (BCP)

Hundred and ninety-three bacterial strains were isolated from the *Drosera* growing in the seaside region of Nova Tramandaí (Rio Grande do Sul, Southern of Brazil) (S30° 05'27.9''/W050°10'11.9''). To collect the bacterial samples associated with the carnivorous plants was using a swab. The swab was hydrated in saline and passed on foliar structures collecting samples of mucilage. These mucilage samples were stored in saline solution (9%) and preserved at -20 °C. All samples of mucilage were grown in the Mueller Hinton Agar (MH) and samples grew were preserved in liquid Skin Milk Agar (SMA) containing 20% (v/v) glycerol at -20 °C. These samples preserved in SMA were grown in solid SMA for 48 h to evaluate proteolytic activity. The proteolytic activity was verified by the formation of a halo around the colonies in the SMA (Fig. S1).

2.2 Cell-free supernatants preparation

After first screening for proteolytic activity 35 strains that presented proteolytic activity on SMA were cultivated in 90 mL of modified R2A liquid medium, including 10% of chitin and 10 mL of inoculum of bacteria associated with carnivorous plants (BCP) using Erlenmeyer flasks at 25°C, for 72 h in an orbital shaker at 150 rpm. The inoculum was performed in saline solution (9%) at OD₆₀₀ with absorbance of 0.500 ± 0.005. The culture was centrifuged at 5000 rpm for 1 h and the supernatants were filtered through a 0.22-mm-pore-size filter and maintained as frozen stocks at -20 °C for the eradication biofilm assays in accordance with Trentin *et al* (2011).

2.3 Biofilm eradication assay

Eradication biofilm assay was performed in 96-well microplate (Costar 3599, Corning, Inc., USA) using *P. aeruginosa* ATCC 27853. The biofilm eradication assay was performed in three steps: 1) *Pseudomonas aeruginosa* was grown in the microtiter plates in 200 μL of solution of grown (40 μL Tryptone Soya Broth (TSB) (Oxoid Ltd., England, UK); 80 μL water Milli-Q; 80 μL of *P. aeruginosa* bacterial suspension (OD_{600} of Abs 0.150 ± 0.005)) and incubated at 37 °C overnight. In this step were implemented three controls: sterility, medium and untreated. 2) After incubation the solution of growth was removed and replaced by the treatment solution. The treatment solution contained (40 μL TSB; 80 μL water Milli-Q; 80 μL supernatant of BCP). In this step was implemented one new control replacing the 80 μL supernatant of BCP by 80 μL of gentamicin (20mg mL^{-1}) for antibiotic control and the plates were incubated at 37 °C overnight. 3) After incubation, subsequently the medium was removed and subjected to three washes and subjected to crystal violet (CV) technique (SAOTOMEA *et al.*, 1989). The results were verified to $\text{OD}_{570\text{nm}}$.

The most promising strain *B. pumilus* BCP3632, was grown in modified R2A liquid medium for 24, 48, 72 and 96 h under the same conditions used above to determine the best biofilm eradication time. The cell-free supernatant originated from *Bacillus sp.* BCP3632 was named as CFS3632 and the best biofilm eradication time was of 24 h. These BCP3632 produced for 24 h was used for the subsequent biofilm eradication assays.

2.4 Identification of strain BCP_3632

The strain was examined for Gram stain, cell shape and the 16S rRNA gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using universal primers: 1492R (5'-GGT

TAC CTT GTT ACG ACT T-3'); 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'), that amplifies an ~1,500-bp fragment of the 16S rRNA gene between positions 8 and 1509 of the *E. coli* 16S rRNA gene and is considered to be universal for the domain Bacteria (WEISBURG *et al.*, 1991) and for reamplification the primers: 357F (5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3'); 1087R (5'-CTC GTT GCG GGA CTT ACC CC-3'); 945F (5'-TGG GGC GCA ATC TGG AT-3') e 518F (5'-CCA GCA GCC GCG GTA ATA CG-3').

For PCR amplification, it was used 50 ng of extracted the Genomic DNA of BCP_3632 in a 50- μ l reaction mixture containing: 0.2 μ M concentration of each primer, a 0.2 mM of each dNTP, 5 μ l of 10X PCR Buffer (Invitrogen), 1.25 U of Platinum[®] Taq DNA Polymerase (Invitrogen) and 1.5 μ l of 50 mM of MgCl₂ (Invitrogen). Amplification was carried out under the following conditions: an initial 5-min denaturation step at 95°C followed by 40 cycles consisting of denaturation at 94°C for 30 seconds, annealing for 30 seconds at 55°C, and extension at 72°C for 2 min. Amplification was completed by incubation for 5 min at 72°C to allow complete extension of the PCR products. The PCR products were purified with an AxyPrep PCR Clean-up kit (Axygen Biosciences), according to the manufacturer's instructions and sequenced using the ABI PRISM[™] 3130xl DNA sequencer (Applied Biosystems). The 16S rDNA sequences obtained were compared with other sequences from data bank accessible in the NCBI website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) program.

2.5 Determination of the Minimum Biofilm Eradication Concentration (MBEC)

To determine the MBEC capable of eradicating *P. aeruginosa* biofilm, three concentrations of were compared: undiluted extract (CFS3632) and two dilutions, 1/2 and 1/4. The three concentrations were used in the eradication biofilm assay performed in 96-well plates using the *P. aeruginosa* bacteria according to the method used above to determine biofilm eradication.

2.6 Scanning Electron Microscope (SEM)

For the observation of activity of eradication in the biofilm through SEM Permanox™ segments (4 x 8 mm) were added in the microtiter plates. The segments were removed after treatment with the extracts before attaining with CV and the 96-well plates were taken to remove the growth solution and performing the CV method. The segments were immersed in eppendorf tubes containing 1.0 mL of 2.5 % (v/v) glutaraldehyde in sodium cacodylate buffer 0.05 M at pH 7.2 for 24 h. Next, the samples were washed with 0.9% NaCl solution and Sodium cacodylate buffer at room temperature. Afterwards, the samples were dehydrated in an increasing series of acetone (10, 30, 50, 75, 90 and 100%), embedded for 8 minutes in each concentration. The samples were dried by the CO₂ critical point technique and examined in a scanning electron microscope JEOL JSM 6060.

2.7 Bacterial viability assay

Besides the eradication of biofilm, the antibiotic and biofilm inhibition activity of the CFS3632 were determined in accordance with Trentin *et al*, (2011). To evaluate the bacterial viability *P. aeruginosa* was grown using a 96 well microplate with 200 µL of

solution (40µL TSB; 80 µL H₂O Milli-Q; 80 µL bacterial suspension (OD₆₀₀ of Abs 0,150 ± 0,005) and incubated at 37 °C overnight. Controls were: antibiotic gentamicin, sterility and untreated control. The planktonic bacterial growth was evaluated by the difference between the OD₆₀₀ absorbance measured at the end and at the beginning of the incubation time. After incubation an assay was performed to determine the bacteriostatic or bactericidal effect of CFS3632. In this assay 100 µL of culture medium of a well-treated with CFS3632 and an untreated control well were removed. The 100 µL of each of the treatments were subjected to a serial dilution up to 10⁻⁹. Fifty microliters of each suspension (10⁻⁹) were allowed to grown in Müller-Hinton agar incubated at 37 °C overnight. The resulting colonies were counted by determining the CFU/mL and CFU/mL among treated and untreated samples were compared.

2.8 Anti-biofilm activity of the CFS3632

The anti-biofilm activity was evaluated using the same assay in 96 well microplate plates. The *P. aeruginosa* was grown in 200 µL of solution (40µL TSB; 80 µL H₂O Milli-Q; 80 µL bacterial suspension (OD₆₀₀ Abs 0.150 ± 0.005) and incubated at 37 °C overnight. Additionally the formation of biofilm by CFS3632 was evaluated using 200 µL of solution (40µL TSB; 80 µL H₂O Milli-Q; 80 µL of CFS3632) and incubated at 37 °C overnight. The biofilm formation was verified after staining with cv (OD₅₇₀ nm).

2.9 Characterization of CFS3632

To determine if the bioactive molecule of the *cell-free* supernatant is a protein, an enzyme inactivation test was performed. The CFS3632 was submitted to three processes to inactivate the bioactive molecule: a) autoclaved at 121 °C for 30 min; b) enzymatic

inactivation by incubation with Proteinase K (PROK) (Cat. No. P1386, Sigma-Aldrich) ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) for 16 h at 25°C ; c) boiling the extract for 10 min. In addition the effect of Proteinase K in the eradication of biofilm was evaluated, using $80 \mu\text{L}$ of PROK to replace the extract as a control. Subsequently the treated extracts were used in the assay of biofilm eradication in the treatment solution of the second step in the biofilm eradication assay (Section 2.2). The results are reported as mean percentage \pm S.D. of the biofilm eradicated for the untreated supernatant compared with the supernatant with enzyme inactivation.

2.10 Bioguided Fractionation of CFS3632

For the bioguided fractionation of CFS3632 a Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) system was used. Two milliliter of CFS3632 ($\text{pH } 8.1 \pm 0.2$) were concentrated for SpeedVac Concentrators, obtaining a final volume of $90 \mu\text{L}$ with at equivalent of $90.8 \mu\text{g mL}^{-1}$ of protein determined by the Qubit™ Protein Assay Kit (Invitrogen). The product concentrated was dissolved in a minimum the 50 mM sodium phosphate buffer ($\text{pH } 8.0$) and the insoluble denatured proteins removed by centrifugation for 10 min at $10,000 \text{ rpm}$. $250 \mu\text{L}$ of the CFS3632 solution was fractionated by Gel Filtration (GF) on a Superdex 75 column ($1 \times 30 \text{ cm}$) equilibrated with the sodium phosphate buffer. The elution of protein was performed with the same buffer at a rate of 0.5 cm mL^{-1} . The fractions of $500 \mu\text{L}$ were tested for biofilm eradication assay. The active fractions were collected and dialyzed overnight against repeated changes of the 50 mM sodium phosphate buffer ($\text{pH } 7.0$) and injected into a HiTrap Q Sepharose High Performance strong anion exchange column ($1.6 \times 2.5 \text{ cm}$) previously equilibrated with 50 mM sodium phosphate buffer ($\text{pH } 7.0$) and 1 M NaCl at a rate of 0.5 cm mL^{-1} . The resulting fractions were used for biofilm eradication assay.

2.11 SDS-PAGE analysis

To evaluate purification steps 20 μL of the concentrated supernatant and active fractions of Gel Filtration and Anion Exchange were used. The fractions were subjected to sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) using 5 % stacking gel and 12 % resolving gel as reported for Laemmli, (1970) at 120 v. Protein bands were visualized by 1% Coomassie Brilliant Blue G-250 dissolved in methanol/acetic acid/water (5:1:14).

The approximate molecular weight of the active fraction was determined using the Gel Filtration Calibration Kit (Low Molecular Weight (LMW), GE, Healthcare Life Sciences). Known protein standards were used: Carbonic anhydrase (15 mg mL⁻¹; 29 kDa); Ovalbumin (50 mg mL⁻¹; 44 kDa) and Albumin (5 mg mL⁻¹; 66 kDa) in the Superdex 75 column in the same conditions used for fractionation of the crude extract.

2.12 *In vitro* biofilm eradication assay in urinary catheters

As an example of clinical interesting surfaces sections of silicone urinary catheters were used. The biofilm eradication assay for *P. aeruginosa* was performed using triplicates of sections of urinary catheters and the CFS3632 (Fig. S2). Sections of the catheters with capacity for 1.6 mL of solution (10 cm in length) were used. In each section the biofilm eradication assay for *P. aeruginosa* was performed keeping the proportions used in the solution of 200 μL of the microtiter plates (in this assay for 1600 μL : 320 μL TSB; 640 μL water Milli-Q; 640 μL bacterial suspension (OD₆₀₀ Abs 0.150 \pm 0.005) and performing the same steps, controls and treatments.. After the staining cv method, these fragments were divided into 8 fractions, each containing 200 μL . Each of these fractions was placed in a 96-well plate, obtaining 8 wells per plate which is the same number of wells used in the

above tests. The biofilm formed in each fraction was resuspended in the well with ethanol for 30 min and the quantification by OD_{570nm} was performed.

2.13 Statistical analysis

All microbiological experiments were carried out at least in triplicate. The biofilm eradication data results are presented as mean percentage \pm S.D. of the biofilm eradicated in relation to the biofilm remaining in the control untreated. The biofilm formation data are presented as mean percentage \pm S.D. of the biofilm remaining in relation to the biofilm remaining in the control untreated. Differences between groups were evaluated by Student's *t*-test and a $p \leq 0.05$ was considered significant.

3. RESULTS

3.1 Bacteria associated with *Drosera* screening for biofilm eradication

From 193 bacterial strains isolates from of the *Drosera* and seeded in SMA, 35 bacteria were able to grow and produce proteolytic halo (Fig. S1). The proteolytic halo occurs due to the degradation of casein present in the milk medium. This enzymatic activity is used as a parameter for determining activity of proteases.

The protease-producing bacteria were cultured in R2A liquid medium for 72 h and centrifuged supernatants were used to test the eradication of biofilm bacteria against *P. aeruginosa* (ATCC 27853) using the CV method in 96-well microplates. The quantification of biofilm eradication of 35 bacteria isolates showed that 3 isolates presented more than 40% of biofilm eradication. The isolates BCP_322, BCP_3632 and BCP_378 had the highest percentages of eradication among the 35 strains with 42.4%, 42.8% and 50.2% respectively (Fig. 1). Eradication percentages equal to or greater than 40% biofilm are accepted as a good result in the treatment of biofilms. Interestingly it was found that some strains did not have the ability to eradicate biofilm, but stimulated the biofilm formation of *P. aeruginosa*, showing percentages of eradication by below zero (Fig. 1).

The strains yielded the best percentages of eradication (BCP_3632 and BCP_378) were selected and cultivated in R2A liquid for 24, 48, 72 and 96 h for determine the best time of production of supernatant with biofilm eradication activity. The CFS3632 produced for BCP_3632 in 24 h was selected, due to its capacity to maintain the ability to eradicate biofilm throughout different test (results not shown) and was chosen for the following experiments.

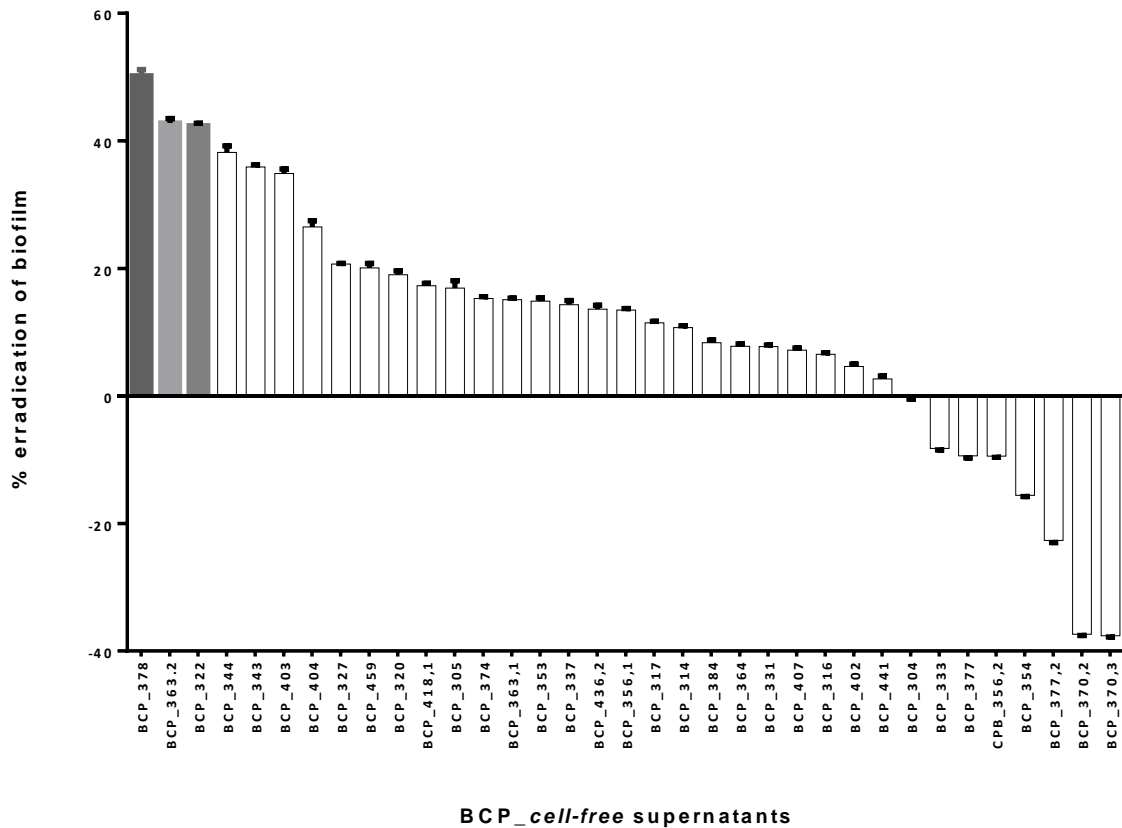


Figure1. Eradication of *P. aeruginosa* biofilm by 35 BCP cell-free supernatants. The supernatants were produced by growing strains by 72 h in modified medium R2A under assay condition by CV method. Percentages above zero indicate biofilm eradication and below zero indicates stimulation in the biofilm formation by the BCP_supernatants. Percentages of eradication of biofilm above or equal to 40% are considered significant for this test. The error bar represents standard deviations from reproduced results in three repeated experiments.

3.2 Identification of strain BCP3632

Results of 16S rRNA gene indicated that the isolated strain was 99% similar to *Bacillus pumilus* (accession no. NR074977.1 by BLAST analysis), but lack additional tests to confirm the identity whereby is treated as *Bacillus* sp.

3.3 Determination of the MBEC of the CFS3632 capable of eradicating biofilm and Scanning Electron Microscope (SEM)

Biofilm eradication by three different concentrations of the CFS3632 showed that the undiluted extract presented the best result for eradicating the *P. aeruginosa* biofilm. The figure 2 shows the percentages of biofilm eradication by the three extracts: the undiluted CFS3632 presented 47.1% of eradication activity, 15.9% for the 1/2 and the 7.42% for 1/4 in comparison with the untreated control. Besides, the result of the undiluted extract is similar to the eradication activity presented by the antibiotic gentamicin (48.14%). These results were also verified by the observations in SEM (Fig. 3).

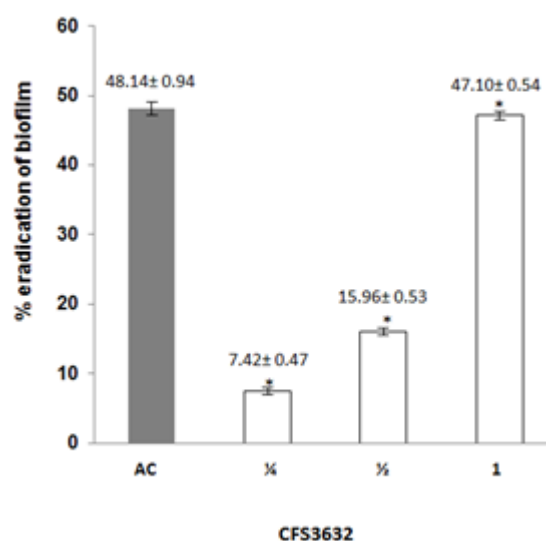


Figure 2. Biofilm eradication of *P. aeruginosa* using the CFS3632 in three concentrations. The quantification was performed by OD_{570nm} in the 96-well microplates of the biofilm eradication assay. The numbers on top of bars are the mean values ± standard deviation of the percentage of the biofilm eradicated in relation to the biofilm remaining in the untreated control considered as 100%. The error bar represents standard deviations from reproduced results in three repeated experiments. Antibiotic control (AC); CFS3632 undiluted (1); 1/2 of CFS3632 (1/2); 1/4 of CFS3632 (1/4). *Represents statistical difference in the percentage of the biofilm eradicated in relation to the biofilm remaining in the untreated control (Student's t-test; p < 0.05).

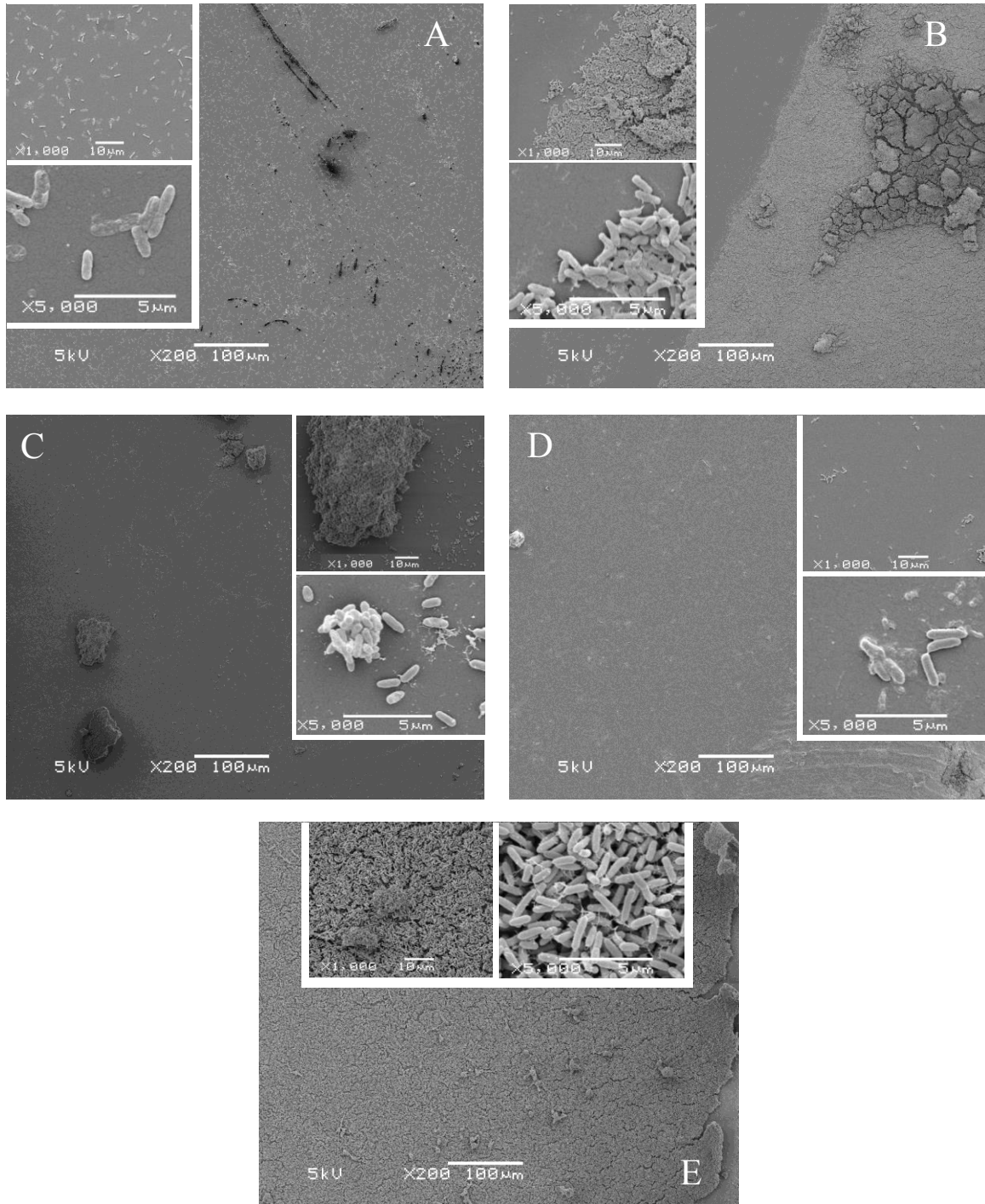


Figure 3. Scanning electron microscopy reveals *P. aeruginosa* biofilm eradication for the CFS3632 in three concentrations. A) antibiotic control. B) $\frac{1}{2}$ of CFS3632. C) $\frac{1}{4}$ of CFS3632. D) undiluted CFS3632. E) Untreated control.

The micrographics confirm that the undiluted CFS3632 undiluted present the highest efficiency to eradicate *P. aeruginosa* biofilm in comparison with the other two samples of CFS3632 diluted in half and a quarter and the untreated control. The CFS3632 extract clearly shows the ability to remove the matrix of EPS and to disperse bacterial cells in the biofilm. This activity is followed by ½ dilution of the CFS3632 and the 1/4 with the lowest capacity of eradication (Fig. 3: B and C).

3.4 Antimicrobial and anti-biofilm activity of CFS3632

Table 1 showed the percentages of the cellular growth in the *P. aeruginosa* biofilm treated with CFS3632 and untreated control. The cellular growth in the treatment with CFS3632 was 40.60%. These results suggest that the bacterial growth of *P. aeruginosa* decreases in the presence of CFS3632 in the biofilm. This result is consistent with of the result of colony formation where the cell viability of the *P. aeruginosa* is affected by CFS3632. These results showed that in the treatment with CFS3632 it was formed 2.90×10^4 UFC/mL compared with the untreated control which was 5.41×10^4 UFC/mL.

CFS3632 does not inhibit the *P. aeruginosa* biofilm formation. On the contrary seems to encourage their formation. The results showed a 125.17% in the biofilm formed under treatment with the CFS3632 in comparison with the untreated control taken as 100% (Table 1).

Table 1. Growth of *P. aeruginosa* and biological activity against biofilm formation by CFS3632.

Trials	<i>P. aeruginosa</i>	
	Untreated control (%)	In presence of CFS3632 (%)
Bacterial growth (%)	100.0±0.27	40.60±0.04*
Biofilm formation (%)	100.0±0.27	125.17±0.53*

Results represent mean ± standard deviation of 3 experiments.

* Represents significant difference in relation to control ($p < 0.05$).

3.5 Characterization of CFS3632

Figure 4 shows that the untreated CFS3632 present 44.9% percentage of biofilm eradicated. The CFS3632 treated to inactivate the bioactive molecule presents percentages of biofilm eradication by below of 40%.

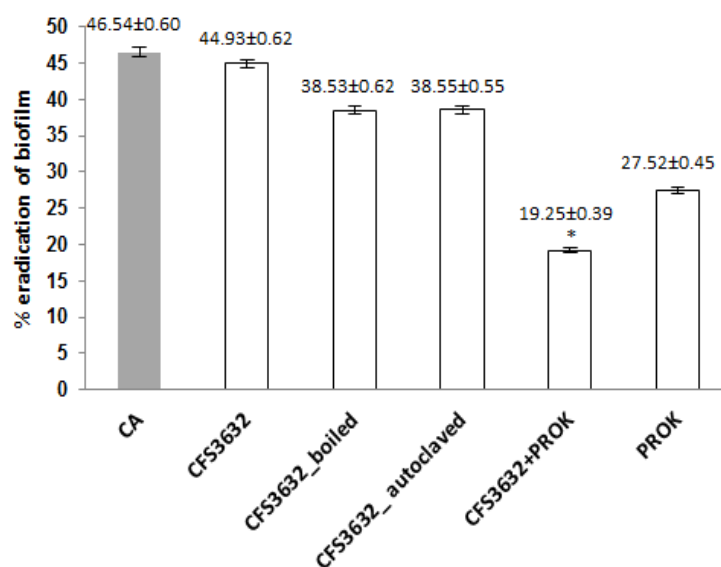


Figure 4. Biofilm eradication for *P. aeruginosa* using the CFS3632 submitted to three processes to determine if the molecule capable of eradicating biofilm is proteinaceous. The quantification of the biofilm eradication was performed by OD_{570nm}. The numbers on top of bars are the mean values ± standard deviation of the percentage of the biofilm eradicated in relation to the biofilm remaining in the untreated control considered with 100%. The

error bar represents standard deviations from reproduced results in three repeated experiments. Antibiotic gentamicin control (AC); Proteinase K (PROK).

*Represents statistical difference in the percentage of the biofilm eradicated in relation to the biofilm remaining in the non-inactivated control. (Student's t-test; $p < 0.05$).

3.6 Bioguided fractionation of the CFS3632 and SDS-PAGE analysis

CFS3632 was fractionated by Gel Filtration (GF) on a Superdex 75 column equilibrated with the sodium phosphate buffer. In this process 42 fractions were generated. These fractions were evaluated to eradicate the *P. aeruginosa* biofilm in pursuit of those that contain biologically active compounds. Three of the fractions presented ability to eradicate biofilm above 18%. These three fractions were mixed and injected into a HiTrap Q Sepharose High Performance strong anion exchange column. From these separation, 27 fractions were collected and used for biofilm eradication assay. In this assay two fractions presented ability to eradicate biofilm above 21%.

The active fractions have an approximate molecular weight of 34 kDa compared to molecular weight standards of the Gel Filtration Calibration Kit. The SDS-PAGE of figure 5 shows the CFS3632 and the active fractions of the bioguided fractionation.

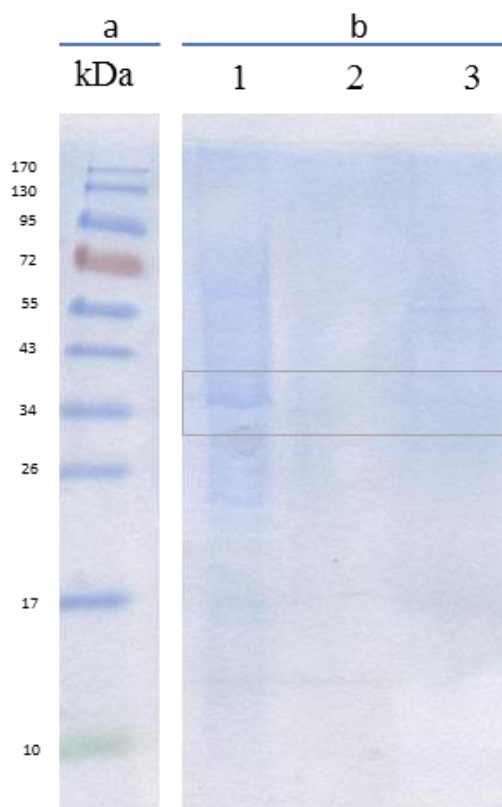


Figure 5. SDS-PAGE in polyacrylamide gel. Proteins were stained with 1% Coomassie Brilliant Blue G-250 after electrophoresis. a) Molecular mass marker (Page Ruler Prestained Protein Ladder, 10 – 170 kDa, Fermentas). b) Lane 1, the CFS3632; Lane 2, active fraction of Gel Filtration (GF) on a Superdex 75 column; Lane 3, active fraction of HiTrap Q Sepharose High Performance strong anion exchange column.

3.7 *P. aeruginosa* biofilm eradication in urinary catheters

For testing the *P. aeruginosa* biofilm eradication *in vitro* catheters treated with CFS3632 were used. The results showed that the CFS3632 possesses capacity to eradicate biofilm from the silicone catheters surface. Figure 6 shows percent biofilm eradication in the *in vitro* assay. In this result the CFS3632 eradicated 44.90% of the biofilm compared with the untreated control. These results become important considering that this example of device surface is among the most used at clinical level.

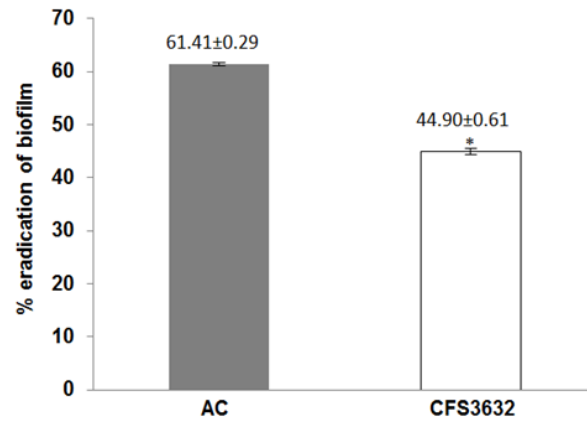


Figure 6. Biofilm eradication for *P. aeruginosa* using sections of catheters of silicone treated with the CFS3632. The quantification of biofilm eradication was performed by OD_{570nm} . The numbers on top of bars are the mean values \pm standard deviation of the percentage of the biofilm eradicated in relation to the biofilm remaining in the untreated control considered as 100%. The error bar represents standard deviations from reproduced results in three repeated experiments. Antibiotic gentamicin control (AC). *Represents statistical difference in the percentage of the biofilm eradicated in relation to the biofilm remaining in the untreated control (Student's *t*-test; $p < 0.05$).

4. DISCUSSION

The presence of promising bacterial species associated with the genus *Drosera* provides a great resource to obtain bioactive molecules for various biotechnological purposes. Of those bacterial species, there were found more than 20 bacteria with some capacity to eradicate the *P. aeruginosa* biofilm (Fig.1). Among these bacteria associated with *Drosera* three bacterial supernatants had activity eradication of biofilm above 40% for *P. aeruginosa*. Of these three bacterial supernatants one was chosen BCP3632 for consistency in the percentage of biofilm eradicated in different tests carried (data not shown).

The strain *Bacillus* sp. (BCP3632) was identified with a 99% of similarity with *Bacillus pumilus* by the 16S rRNA genes. The presence of species of *Bacillus* sp. in the genus *Drosera* was evidenced by KRÓL *et al* (2012) and is related to the symbiotic processes between carnivorous plants and bacterial species (LÜTTGE, 1983). *B. pumilus* is as a Gram-positive aerobic endospore forming *Bacillus* present in diverse environments. (NICHOLSON, 2002, TAM *et al.*, 2006).

The ability of the CFS3632 to eradicate significantly the *P. aeruginosa* biofilm was effective only with the undiluted supernatant, this can be attributed to the low active biomolecule content in the CFS3632, only 90.8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Fig. 2). The ability of CFS3632 to eradicate significantly the *P. aeruginosa* biofilm can be related to the loss of EPS matrix observed by SEM (Fig. 3) and/or the bactericidal activity shown by the noticeable difference in colony formation in cultures treated with the CFS3632 (Section 3.4) besides, of the decrease cell growth in the biofilm under treatment with the supernatant (Table 1) .

These results indicate that CFS3632 has the ability to eradicate significantly biofilm of *P. aeruginosa*, but not allow elucidate the mechanism of action on the biofilm.

The degradation of EPS can be related to different pathways of action of bioactive molecules in the biofilm. The *Bacillus sp.* is related to the production of different molecules that act in the degradation of biofilms (STEIN, 2005). These molecules are product of the ability to synthesize and secrete a variety of secondary metabolites, as well as various extracellular hydrolytic enzymes and lipopeptides (STEIN, 2005; NITHYA *et al.*, 2010a). Some examples of metabolites are (i) the production of a D-Amino acid that caused the release of amyloid fibers that linked cells in the biofilm (KOLODKIN-GAL *et al.*, 2010); ii) the production of lipopeptides BSs (biosurfactants) by *B. pumilus* (KALINOVSKAYA *et al.*, 2002) and iii) the intervention in the QS of the *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm by one protein produced by *B. pumilus* strain S8-07, which reduced the accumulation of N-acyl homoserine lactone (AHLs) and showed significant inhibition of LasA protease, LasB elastase, caseinase, pyocyanin and pyoverdine (NITHYA *et al.*, 2010a).

Regarding bactericidal activity, *Bacillus sp.* is known to have the ability to produce different bioactive metabolites in antibacterial processes against Gram-positive and Gram-negative bacterial species (ANWAN & SALEEMUDDIN, 1998; SINGH *et al.*, 2001; GENCKAL & TARIB, 2006; DENG *et al.*, 2010; NITHYA *et al.*, 2010a). An example of these antimicrobial active compounds are the produced by *B. subtilis* that include peptides that are either ribosomally synthesized and post-translationally modified (antibiotics and antibiotic-like peptides) or non-ribosomally generated, as well as a couple of non-peptidic compounds such as polyketides, an aminosugar, and a phospholipid (STEIN, 2005). In 2006, Morikawa reported that *B. pumilus* is induced to the production of antibiotic

molecules under growth conditions in a bioreactor with other bacterial species. These results suggest that the cross-species signaling system that induces planktonically grown cells to behave as if they were in a biofilm by regulating the expression of antimicrobial compounds. This behavior could explain the stimulation of the CFS3632 in the *P. aeruginosa* biofilm formation, considering that the percentage of biofilm formed in the presence of CFS3632 is lower compared to the total biofilm formed in the untreated control (Table 1). *B. pumilus* is a strong biofilm-forming (DUSANEA *et al.*, 2010) therefore; the biofilm formed in this assay can be product of the activity of regulatory molecules maintained in the BCP3632 used for biofilm formation in this species.

The active biomolecule of BCP3632 with capacity of biofilm eradication was pointed to a molecule of 34 kDa approximately compared to molecular weight standards (Fig. 5). Considering that the average of biofilm eradication by CFS3632 in all experiments performed was 44.9% and the averages of biofilm eradicated for the three enzymatic inactivation treatments for CFS3632 are close to this value, we might open some speculations about the results: (i) the bioactive molecule is not proteinaceous; ii) the 34 KDa protein is themoresistant, what is observed in many other cases from metabolites originated from *B. pumilus* (MUNIMBAZI & BULLERMAN, 1998; KUMAR, 2002; ABRIOUEL *et al.*, 2011; REISS *et al.*, 2011); (iii) the activity is due to a combination of metabolites which are present in the same fraction but not detectable in SDS-PAGE, as for example peptides or other molecules.

In addition the CFS3632 presents a significant eradication of the *P. aeruginosa* biofilm for *in vitro* tests with catheters (Fig.6). These results generate expectations regarding the use of this biomolecule for surfaces of other clinical devices, and motivates researches looking forward to obtaining a purified bioactive molecule or compounds.

The EPS degradation constitutes one of the main strategies for control of biofilms, considering that, one of the main problems to treat infections caused by bacterial biofilms is the penetrability of antibiotics to internal cells of the biofilm (ACKER *et al.*, 2014). This ability to prevent the arrival of biocidal molecules to internal cells is favored by different factors associated to the presence of EPS matrix in the biofilm (MAH, 2012). The EPS matrix provide protection of the external agents and favors the appearance of resistant phenotypes (WEI & MA, 2013; ACKER *et al.*, 2014). The protection is related to the architecture that it provides to the biofilm and the properties of components that comprise it. These components are involved in all stages of formation, maturation and dispersal of the biofilm (WEI & MA, 2013). Moreover, the production of these components can be altered according to the necessities of bacterial communities, e.g. the alginate overproduction by *Pseudomonas* favors the persistence and immune evasion in the biofilm (LEID *et al.*, 2005).

This work provides other initial testing results in eradication of *P. aeruginosa* biofilm (Fig. S3). The BCP_378 supernatant show percentages of biofilm eradication higher than 50% for *P. aeruginosa* biofilm in these initial tests. This result generate expectations for identification of the specie that produced the biomolecule, mechanism of action in the biofilm and determination of the minimum biofilm eradication concentration. The CFS3632 and the BCP_378 supernatants constituted sources of biomolecules that in a first approximation exhibit activity in the eradication of biofilm of *P. aeruginosa* and the identification of the type of biomolecules and their mechanisms of action constitutes a new stage to contribute to the eradication of this pathogenic biofilm. These results showed that the micro-organisms associate to the genus *Drosera* are an excellent alternative in developing compounds of clinical interest.

5. Conclusions

The results demonstrate that metabolites produced by bacteria associated with carnivorous plants are capable of eradicating significantly *P. aeruginosa* biofilm. The bioactivity of *Bacillus* sp. supernatant for eradication biofilm can be attributed to the presence of different molecules produced by this genus of bacteria. The eradication of the biofilm is a plausible consequence of the degradation of EPS in the biofilm by intervention or inhibition of bioactive molecules in the complex signaling pathways in the biofilm and antibiotic activity.

References

- ACKER, H.; DIJCK, P. & COENYE, T. (2014) Molecular mechanisms of antimicrobial tolerance and resistance in bacterial and fungal biofilms. *Trends in Microbiology*. 22: 6326-6333.
- ABRIOUEL, H.; FRANZ, C.M., OMAR, N.B. & 1 & GÁLVEZ, A. (2011) Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *Federation of European Microbiological Societies. Microbiology Reviews*. 35: 201–232.
- ALBINO, U. SARIDAKIS, D.P.; FERREIRA, M.C.; HUNGRIA, M.; VINUESA, P. & ANDRADE. G. (2006) High diversity of diazotrophic bacteria associated with the carnivorous plant *Drosera villosa* var. *villosa* growing in oligotrophic habitats in Brazil. *Plant Soil*. 287:199–207.
- ANWAR, A & SALEEMUDDIN, S. (1998) Alkaline proteases: a review. *Bioresource Technology*. 64: 175-183.
- ARCIOLA, C.R.; CAMPOCCIA, D.; SPEZIALE, P.; MONTANARO, L. & COSTERTON, J.W. (2012b) Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm resistant materials. *Biomaterials*. 33(26):5967–5982.
- BLAIR, J.; WEBBER, M.; BAYLAY, A.L.; OGBOLU, D. O. & PIDDOCK, L. (2015) Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*. 13: 42–51.
- BRIDIERA, B.R.; BRIANDETA, B.; THOMASC, V & DUBOIS-BRISSENETA, F. (2011) Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling*. 27(9): 1017-1032.
- BUTLER, J.L.; GOTELLI, N.J. & ELLISON, A. M. (2008) Linking the brown and green: nutrient transformation and fate in the *Sarracenia microecosystem*. *Ecology*. 89:898–904.

- CARLY, V. R.; SHUBHAM, C. & GREGORY, G. A. (2014) Antibiotic treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms stimulates expression of the magnesium transporter gene *mgtE*. *Microbiology*. 160: 165–178.
- COSTERTON, J.W.; STEWART, P.S. & GREENBERG, E.P. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 284(5418):1318-1322.
- DAROUCHE, R. (2001) Device-associated infections: a macro problem that starts with a microadherence. *Clinical Infectious Disease*. 33:1567-1572.
- DAVIES, D. (2003) Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2:114–122.
- DENG, A.; WUA,J.; ZHANG, Y.; ZHANG, G. & WENA, T. (2010) Purification and characterization of a surfactant-stable high-alkaline protease from *Bacillus sp.* B001. *Bioresource Technology*. 101: 7100–7106.
- DUSANEA, D.H.; NANCHARAI AHB, V.Y.; ZINJARDEA, S.S. & VENUGOPALANB, V. P. (2010) Rhamnolipid mediated disruption of marine *Bacillus Pumilus* biofilms. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 81 (1): 242-248.
- DE LA FUENTE-NÚÑEZ, C.; REFFUVEILLE, F.; FERNÁNDEZ, L. & HANCOCK, R.E.W. (2013) Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. *Current Opinion in Microbiology*. 16 (5):580–589.
- FURUKAWA, S., KUCHMA, S.L., & O'TOOLE, G.A. (2006) Keeping their options open: acute versus persistent infections. *Journal of Bacteriology*. 188: 1211–1217.
- GENCKAL & TARIB. (2006) Alkaline protease production from alkalophilic *Bacillus sp.* isolated from natural habitats. *Enzyme and Microbial Technology*. 39: 703–710.
- HOIBY, N.; CIOFU, O.; JOHANSEN, H.K.; SONG, Z.J.; MOSER, C.; JENSEN, P.O.; MOLIN, S., GIVSKOV, M., TOLKER-NIELSEN, T. & BJARNSHOLT, T. (2011) The clinical impact of bacterial biofilms. *Internal Journal Oral Sciences*. 3:55–65.
- JOO. H.S, & OTTO, M. (2012) Molecular basis of in vivo biofilm formation by bacterial pathogens. *Chemico-Biological Interactions*. 19(12):1503-13.
- KALINOVSKAYA, N.; KUZNETSOVA, T.A.; IVANOVA, E.P. ROMANENKO, L.A., VOINOV, V.G., HUTH, F., & LAATSCH, H. (2002) Characterization of surfactin-like cyclic depsipeptides synthesized by *Bacillus pumilus* from Ascidian *Halocynthia aurantium*. *Marine Biotechnology*. 4(2): 179-189.

KAPLAN, J.B. (2010) Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *Journal Dental Research*. 89, 205–218.

KOLODKIN-GAL, I.; ROMERO, D.; CAO, S.; CLARDY, J., KOLTER, R., LOSICK, R. & DAMINO, (2010) Acids Trigger Biofilm Disassembly. *Science*. 328 (5978) 627-629.

KOOPMAN, M.M.; FUSELIER, D.M.; HIRD, S. & CARSTENS, B.C. (2010) The Carnivorous Pale Pitcher Plant Harbors Diverse, Distinct, and Time-Dependent Bacterial Communities Applied and Environmental Microbiology. 76 (6):1851-1860.

KRÓL, E.; PŁACHNO, B.J.; ADAMEC, L.; STOLARZ, M.; DZIUBINSKA, H.; TREBACZ, K. (2012) Quite a few reasons for calling carnivores ‘the most wonderful plants in the world. *Annals of Botany*. 1(9): 47-64.

KUMAR, C.G. (2002) Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from alkalophilic *Bacillus pumilus*. *Letters in Applied Microbiology*. 34:13-17.

LAEMMLI, V. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.

WEISBURG, W.G.; BARNS, S.M.; PELLETIER, D.A. & LANE, D.J. (1991). "16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study". *Journal Bacteriologic*. 173(2): 697–703.

LEID, J.G.; WILLSON, C.J.; SHIRTLIFF, M.E.; HASSETT, D.J.; PARSEK, M.R. & JEFFERS, A.K. (2005) The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN γ -mediated macrophage killing. *Journal Immunology*. 175: 7512–7518.

LUANNE, H.; COSTERTON, J.W. & STOODLEY, P. (2004) Bacterial Biofilms: from the Natural Environment to Infectious Diseases. *Nature Reviews, Microbiology*. 2: 95.

LÜTTGE, U. (1983) Physiological Plant Ecology III. Ecophysiology of Carnivorous Plants. *Encyclopedia of Plant Physiology*. 12: 489-517.

LYNCH, A.S. & ROBERTSON, G.T. (2008) Bacterial and fungal biofilm infections. *Annual Review Medicine*. 59: 415–28.

MACEDO. A.J. (2015) Teacher, researcher group biofilms and bacterial diversity in the *Universidade Federal do Rio Grande do Sul*, Brazil.

MAH, T. (2012) Biofilm-specific antibiotic resistance. *Future Microbiology*. 7(9): 1061–1072
HENTZER, M. & GIVSKOV, M. (2003) Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *Journal of Clinical Investigation*. 112: 1300-1307.

- MAY, T.B., SHINABARGER, D.; MAHARAJ,R.; KATO, J., CHU,L.; DEVAULT,J.D.; ROYCHOUDHURY, S.; ZIELINSKI, N.A.; BERRY, A., ROTHMEL, A.K.; MISRAAND, T.K. & CHAKRABARTY. M. (1991) Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*: a key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients. *Clinical Microbiology Reviews*. 4:191–206.
- MIKKELSEN, H.; SIVANESON, M. & FILLOUX, A. (2011) Key two-component regulatory systems that control biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology*. 13(7): 1666-1681.
- MUNIMBAZI, C. & BULLERMAN, L.B. (1998) Isolation and partial characterization of antifungal metabolites of *Bacillus pumilus*. *Journal of Applied Microbiology*. 84: 959–968.
- NICHOLSON, W.L. (2002) Roles of *Bacillus* endospores in the environment. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 59: 410-416.
- NITHYA, C.; ARAVINDRAJA, C. & PANDIAN, S. K. (2010a) *Bacillus pumilus* of Palk Bay origin inhibits quorum-sensing-mediated virulence factors in Gram-negative bacteria. *Research in Microbiology*. 161(4): 293-304.
- NITHYA, C.; ARAVINDRAJA, C. & PANDIAN, S.K. (2010b) *Bacillus pumilus* of Palk Bay origin inhibits quorum-sensing-mediated virulence factors in Gram-negative bacteria. *Research in Microbiology* 161: 293-304.
- PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES. N.P. & EPIFANIO, R.A. (2002) Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Química Nova*. 25:45-61.
- QING, W. & LUYAN, Z. MA. (2013) Biofilm Matrix and Its Regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Molecular Sciences*. 14: 20983-21005.
- RAJESH, P.S.; RAVISHANKAR, R. (2014) Molecular identification of *aiiA* homologous gene from endophytic *Enterobacter* species and in silico analysis of putative tertiary structure of AHL-lactonase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 443 (1): 290-295.
- REISS, R.; IHSSSEN, J. & THÖNY-MEYER, L. (2011) *Bacillus pumilus* laccase: a heat stable enzyme with a wide substrate spectrum. *BMC Biotechnology*. 9:1-11.
- SAUER, K.; CAMPER, A. K.; EHRLICH, G. D.; COSTERTON, J. W. & DAVIES, D.G. (2002) *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of Bacteriology*. 184: 1140–1154.
- SHAKIR, A.; ELBADAWAY, M.R., SHIELDS, R.; JAKUBOVICS, N.S. & JAMES GRANT BURGESS, J.G. (2012) Removal of Biofilms from Tracheoesophageal Speech Valves Using a Novel Marine Microbial Deoxyribonuclease. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 147(3):509-142.

SIMÕES, M. (2011) Antimicrobial Strategies Effective Against Infectious Bacterial Biofilms. *Current Medicinal Chemistry*, 18: 2129-2145.

SINGH, J.; BATRA, N. & SOBTI, R.C. (2001) Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus sp.* SSR1. *Process Biochemistry*. 36: 781–785.

SIROVA, D.; SANTRUCEK, J., ADAMEC, L.; BARTA, J.; BOROVEC J.; PECH, J., OWENS, S.M.; SANTRŮČEK, H.; SANTRŮČKOVÁ, H.; SCHÄUFELE, R.; STORCHOVÁ, H.; & VRBA, J. (2014) Dinitrogen fixation associated with shoots of aquatic carnivorous plants: is it ecologically important?. *Annals of Botany* 114: 125–133.

STEIN, T. (2005) *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions *Molecular Microbiology* 56(4), 845–857.

STEWART, P. & COSTERTON, J.W. (2001) Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet*. 358: 135–38.

TAM, N.M.K.; UYEN, N.Q.; HONG, H.A.; DUC, L.H.; HOA, T.T., SERRA, C.H.; HENRIQUES, A.O. & CUTTING, S.M. (2006) The intestinal life cycle of *Bacillus subtilis* close relatives. *Journal Bacteriology*. 188: 2692-2700.

Taylor, M.W.; Radax, R.; Steger, D. & Wagner, M. (2007) Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology, and biotechnological potential. *Microbiol Molecular Biology Reived*. 71: 295–347.

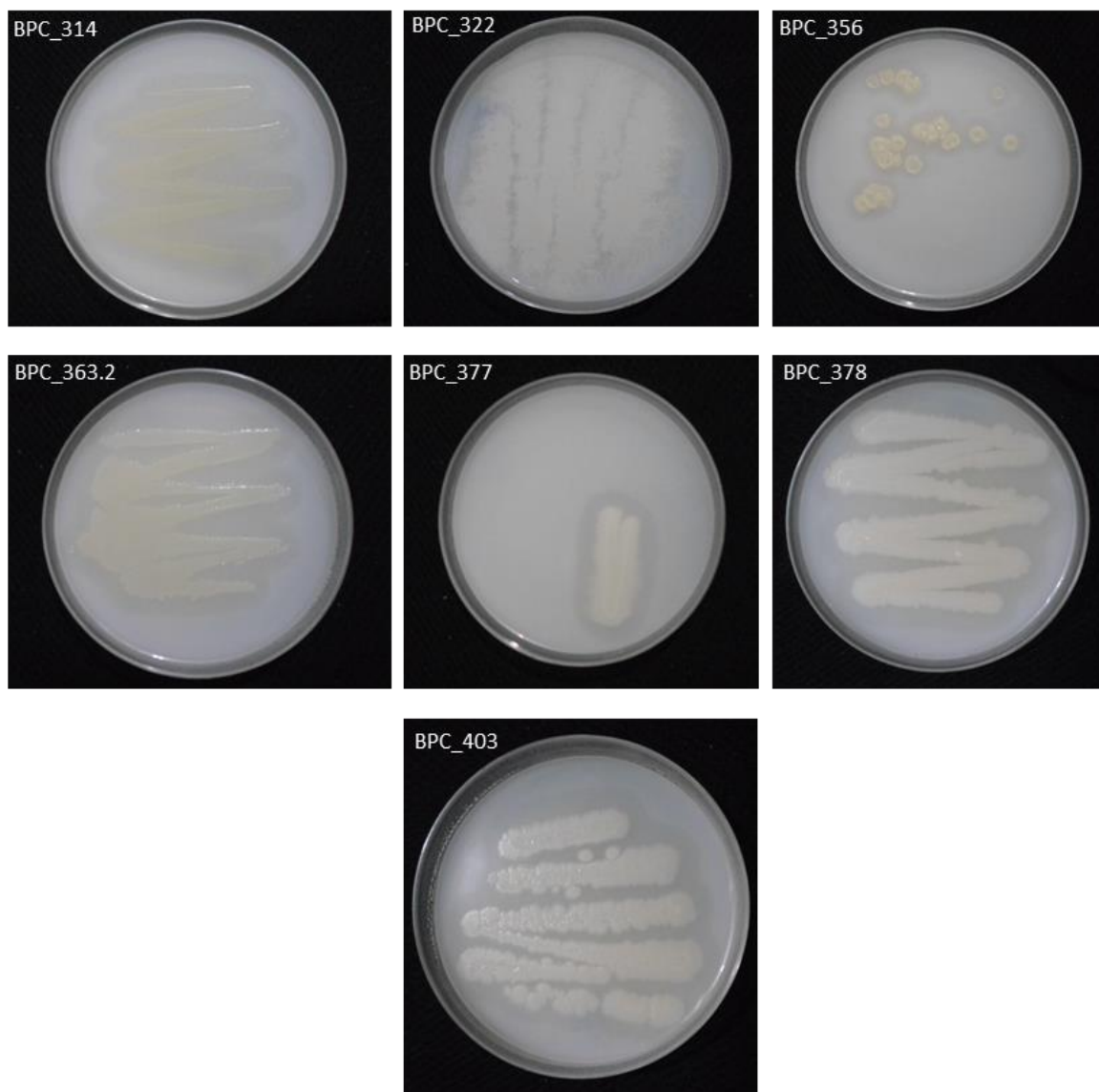
TRENTIN, D.S.; GIORDANI, R.B.; ZIMMER, K.R.; SILVA, A.G.; SILVA M.S.; CORREIA, M.T.S.; BAUMVOL, I.J.R. & MACEDO, A.J. (2011) Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. *Journal Ethnopharmacology*.137:327-335.

WEI, Q. & MA. (2013) Biofilm Matrix and Its Regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Molecular Sciences*. 14: 20983-21005.

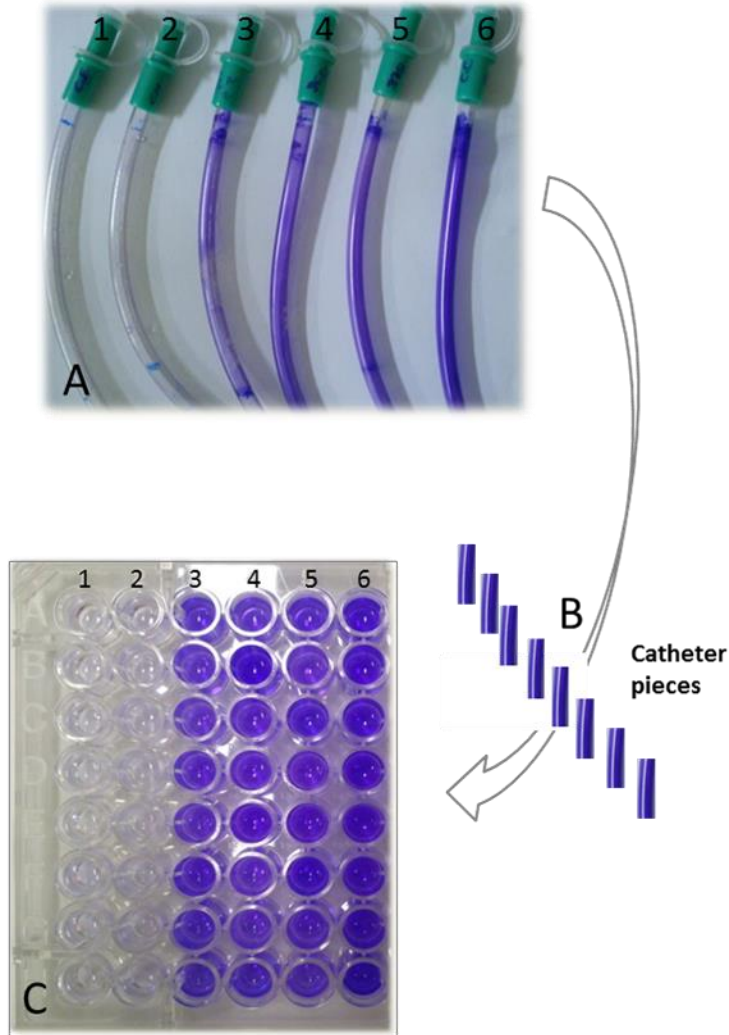
WINGENDER, J. & FLEMMING, H. C. (2011) Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *International Journal Hygiene Environmental Health*. 214: 417–423.

Zhang, Q.; Ye, P.K; Wang, H.H.; Xiao, H.M., Xu, X.L. & Zhou, G.H. (2014) Inhibition of biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* by an acylated homoserine lactones-containing culture extract. *LWT - Food Science and Technology*. 57(1): 230–235.

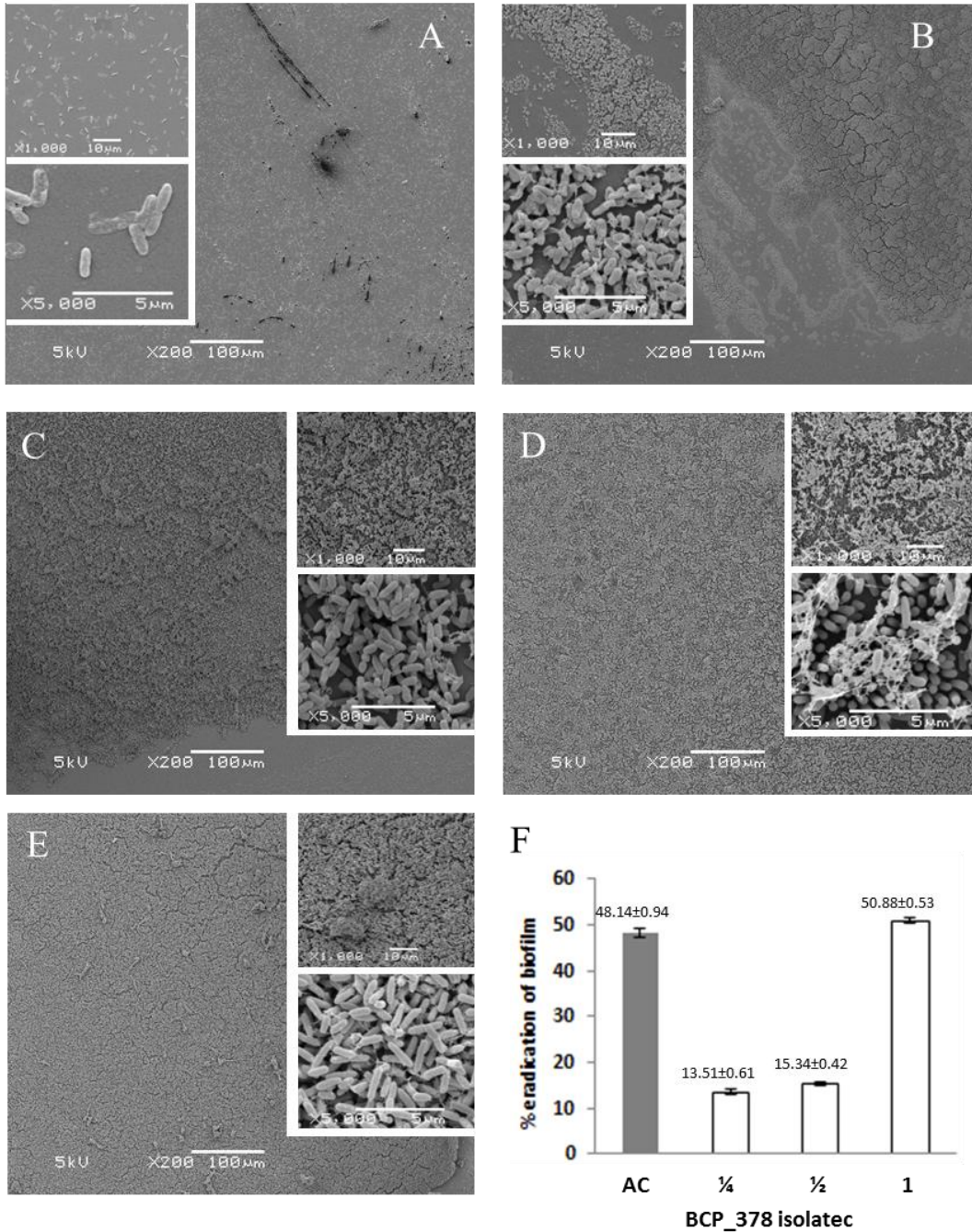
ZHAO, W. & HU, Z. (2010) β -Lactamases identified in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Critical reviews in microbiology*. 36(3): 245-258.



Supplementary Figure 1. Examples of strains isolate from *Drosera* genus and seeded in MA that produced proteolytic halo and had significant eradication of biofilm. The proteolytic halo occurs due to the degradation of casein present in the milk medium. This enzymatic activity is used as a parameter for determining activity of proteases.



Supplementary Figure 2. Biofilm eradication assay for *P. aeruginosa* performed using triplicates of sections of urinary catheters and the two BCP extracts (CFS3632; BCP_378). A) CV colored segments show the fragments of catheter used for the biofilm eradication assay. In each segment was performed the biofilm eradication assay keeping the proportions used in the solution of the microtiter plates (in this assay 1600 μ L of solution). B) After the CV method, the fragments were divided into 8 fractions, each with the capacity to 200 μ L of content. Each of these fractions was placed in a 96-well plate and the biofilm formed in each fraction was precipitated in the well with Ethanol for 30 min. C) In the 96-well plates was performed the quantification of biofilm eradicated by OD570nm. 1) sterility control; 2) medium control; 3) antibiotic control; 4) CFS3632; 5) BPC_378 bacterial extract; 6) untreated control.



Supplementary Figure 3. Scanning electron microscopy reveals *P. aeruginosa* biofilm eradication for the isolated BCP_378 in three concentrations. A) antibiotic control. B) 1/2 of BPC_378; C) 1/4 of BPC_378. D) undiluted BPC_378. E) Untreated control; F) Percentages of biofilm eradication of BCP_378 cell-free isolated in three concentrations. The numbers on top of bars are the mean values \pm standard deviation of the percentage of the biofilm eradicated in relation to the biofilm remaining in the control untreated considered with 100%. The error bar represents standard deviations from reproduced results in three repeated experiments. Antibiotic control (AC).

CAPITULO II

1. Ensaio de erradicação de biofilme em *Staphylococcus epidermidis*

Adicionalmente aos testes focados em *P. aeruginosa* foi feito um teste de erradicação de biofilme para a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus epidermidis*, ATCC-35984.

1.1 Metodologia

A metodologia utilizada para este ensaio foi a mesma usada para os ensaios de *P. aeruginosa* descritos nos numerais 2.1 e 2.2 do capítulo I. Para o ensaio de erradicação do biofilme de *S. epidermidis* foram usados 34 sobrenadantes produzidos por isolados das bactérias associadas ao género *Drosera* com atividade proteolítica. Estes 34 sobrenadantes produzidos em meio R2A modificado foram testados em placas de 96 poços para a erradicação do biofilme e os resultados foram verificados por OD700nm. Os resultados são apresentados como porcentagens de biofilme erradicado por comparação com o controle não tratado considerado como 100% do biofilme formado.

1.2 Resultados e discussão

Dos 34 sobrenadantes testados para erradicação de biofilme de *S. epidermidis* foi encontrado que seis dos sobrenadantes tiveram atividade de erradicação do biofilme por acima de 40% (Fig. 1). Estes sobrenadantes constituem uma importante fonte de biomoléculas para a erradicação deste tipo de biofilme patogénico e precisam o desenvolvimento de novas abordagens no laboratório para ser obtidas. O isolamento destas

biomoléculas permitirá gerar estratégias alternativas ou de apoio no combate do biofilme de *S. epidermidis*.

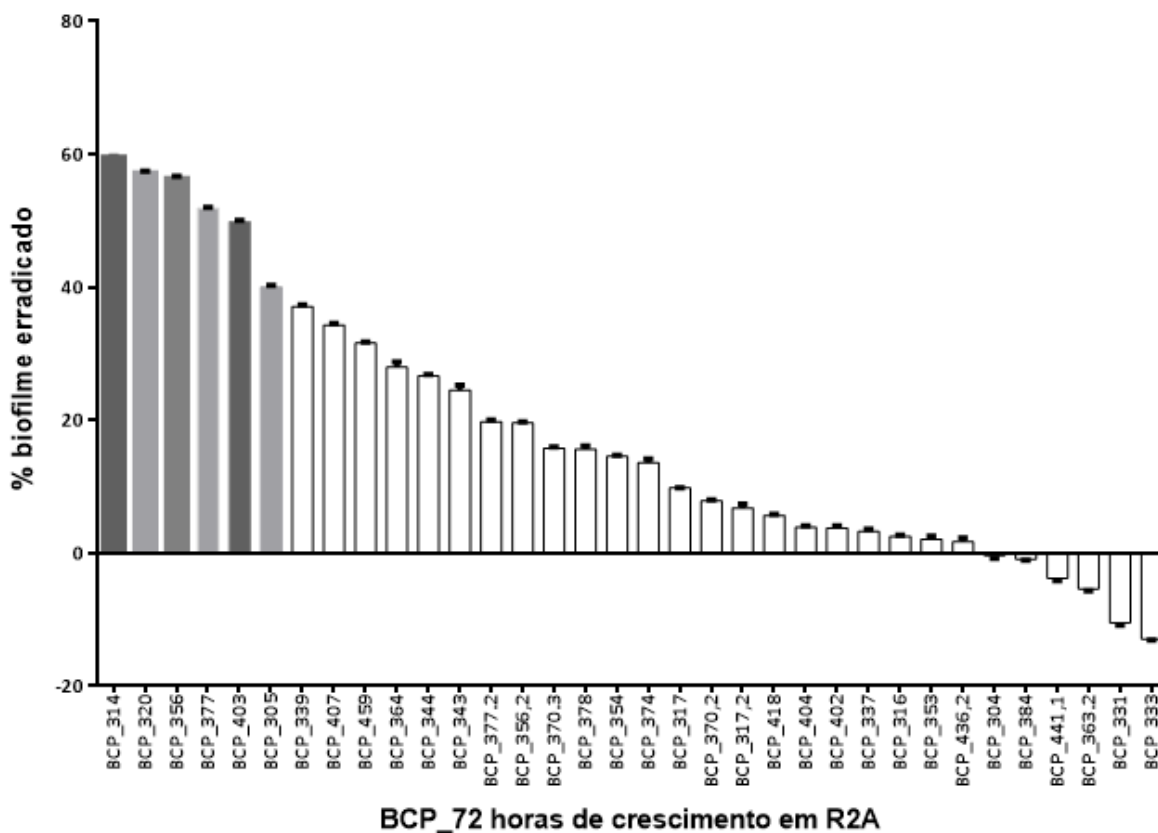


Figura 1. Percentagens de biofilme erradicado em *S. epidermidis* por 34 isolados bacterianos associados a Drosera (BCP). Os sobrenadantes foram produzidos por crescimento dos isolados bacterianos em meio R2A por 72 horas e usados no método de Cristal Violeta. As percentagens de erradicação acima de 40% são aceitas como bom resultado para este tipo de biofilme. Os resultados da percentagem de biofilme erradicado são apresentados com relação ao biofilme remanescente do controle não tratado e considerado como 100%. As barras representam o desvio padrão dos resultados obtidos por triplicata no ensaio.

CAPITULO III

1. Conclusões

1.1 Conclusão Geral

O conjunto de resultados desta dissertação permite concluir que biomoléculas produzidas por bactérias associadas a plantas carnívoras do gênero *Drosera* com ocorrência no litoral sul do Brasil têm a capacidade de erradicar biofilmes patogênicos.

1.1.1 Conclusões específicas

- ✓ O gênero *Drosera* da região litoral de Nova Tramandaí no sul do Brasil apresenta uma importante diversidade bacteriana endossimbiótica.
- ✓ As bactérias associadas a plantas carnívoras do gênero *Drosera* constituem um importante reservatório de biomoléculas de interesse biotecnológico.
- ✓ A erradicação significativa do biofilme de duas bactérias patogênicas por isolados bacterianos associados ao gênero *Drosera* promove o interesse neste tipo de micro-organismos de fácil aquisição na natureza.
- ✓ A capacidade de erradicar o biofilme de *P. aeruginosa* por *Bacillus* sp. é associada com presença de uma biomolécula que poderia agir na degradação da matriz de exopolissacarídeos ou atuar com a capacidade antibiótica nas células bacterianas em alguma de suas vias metabólicas.

- ✓ A capacidade de erradicar o biofilme patogénico de *S. epidermidis* por seis isolados bacterianos associados à Drosera promove o interesse para obter as moléculas bioativas e gera novos interesses adicionais nesta pesquisa.
- ✓ A capacidade de erradicar biofilmes patogénicos por meio deste tipo de biomoléculas permite criar estratégias no auxílio do combate de infecções hospitalares diretamente o como estratégia dupla no uso dos tratamentos convencionais com antibióticos.
- ✓ Este trabalho constitui uma aproximação à utilidade de biomoléculas isoladas de bactérias associadas a plantas carnívoras do género Drosera com fins biotecnológicos.

2. Perspectivas

- ✓ Purificar e caracterizar a biomolécula com atividade significativa na erradicação do biofilme de *P. aeruginosa* e testar sua atividade em diferentes modelos de superfícies associadas a dispositivos de uso clínico.

- ✓ Produzir esta biomolécula e testar seu uso na clínica em modelos *in vivo*.

- ✓ Identificar por meio dos genes 16S rRNA as demais bactérias com capacidade de erradicar significativamente o biofilme de *P. aeruginosa* e *S. epidermidis*.

- ✓ Purificar e caracterizar as biomoléculas dos demais isolados com capacidade de erradicar significativamente o biofilme de *P. aeruginosa* e *S. epidermidis*.

- ✓ Testar *in vitro* as biomoléculas resultantes em diferentes modelos de superfícies de dispositivos de uso médico e produzir estas biomoléculas para o uso *in vivo*.

- ✓ Explorar a coleção de bactérias do gênero *Drosera* feita pelo laboratório na procura de metabólitos com outros interesses no tratamento de biofilmes patogênicos.

3. Referencias bibliográficas

- ACKER, H.; DIJCK, P. & COENYE, T. (2014) Molecular mechanisms of antimicrobial tolerance and resistance in bacterial and fungal biofilms. *Trends in Microbiology*. 22: 6326-333.
- ADAMEC, L. (2010) Field growth analysis of *Utricularia stygia* and *U. intermedia* – two aquatic carnivorous plants with dimorphic shoots. *Phyton* 49: 241–251.
- ALBINO, U. SARIDAKIS, D.P.; FERREIRA, M.C.; HUNGRIA, M.; VINUESA, P. & ANDRADE, G. (2006) High diversity of diazotrophic bacteria associated with the carnivorous plant *Drosera villosa* var. *villosa* growing in oligotrophic habitats in Brazil. *Plant Soil* 287:199–207.
- ALLESEN-HOLM, M.; BARKEN, K.B.; YANG, L.; KLAUSEN, M.; WEBB, J.S. & KJELLEBERG, S. (2006) A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Molecular Microbiology*. 59:1114– 1128.
- ALVIN, W.H.; MOONENS, K.; & REMAUT, H. (2013) Chemical attenuation of pilus function and assembly in Gram-negative bacteria. *Current Opinion in Microbiology*. 16 (1): 85–92.
- ANDERL, J.N.; FRANKLIN, M.J. & STEWART, P.S. (2000) Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 44:1818-1824.
- ANGUS, D.C.; LINDE-ZWIRBLE W.T., LIDICKER, J., CLERMONT, G.; CARCILLO, J. & PINSKY, M.R. (2001) Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Critical Care Medicine*. 29:1303–1310.
- ANWAR, A & SALEEMUDDIN, S. (1998) Alkaline proteases: a review. *Bioresource Technology* 64: 175-183.
- AVRAIN, L.; MERTENS, P. & VAN F. (2013) RND efflux pumps in *P. aeruginosa*: an underestimated resistance mechanism. *Antibiotic susceptibility*. 26-29.
- BANASIUK, R.; KAWIAK, A.; KRÓLICKA, A. (2012) In vitro cultures of carnivorous plants from the *Drosera* and *Dionaea* genus for the production of biologically active secondary metabolites. *Computational Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology*. *BioTechnologia*. 93(2): 87-96.
- BARKEN, K.B.; PAMP, S.J. & YANG, L. (2008) Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environmental Microbiology*. 10: 2331–2343.
- BAUER, U.; CLEMENTE, C.J.; RENNER, T. & FEDERLE, W. (2012) Form follows function: morphological diversification and alternative trapping strategies in carnivorous *Nepenthes* pitcher plants. *Journal of Evolutionary Biology*. 25(1): 90–102.
- BECKER, K.; HEILMANN, C. & PETERS, G. (2014) Coagulase-Negative *Staphylococci*. *Clinical Microbiology Reviews*. 27(4): 870–926.

- BJARNSHOLT, T.; CIOFU, O.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M.; & HØIBY, N. (2013) Applying insights from biofilm biology to drug development - can a new approach be developed?. *Nature Reviews Drug Discovery*. 12: 791-808.
- BLAIR, J.; WEBBER, M.; BAYLAY, A.L.; OGBOLU, D. O. & PIDDOCK, L. (2015) Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*. 13: 42–51.
- BRIDIER, B.R.; BRIANDETA, B.; THOMAS, V & DUBOIS-BRISSONNETA, F. (2011) Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling*. 27(9): 1017-1032.
- BUTLER, J.L.; GOTELLI, N.J. & ELLISON, A. M. (2008) Linking the brown and green: nutrient transformation and fate in the *Sarracenia microecosystem*. *Ecology* 89:898–904.
- CAMILLI, A. & BASSLER, B.L. (2006) Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science*. 311: 1113–1116.
- CARAVIERIA, F.A.; FERREIRAB, A.J.; FERREIRAC, A.; CLIVATI, A.D.; FERNANDES, V.O.; DE MIRANDA, D. & WELINGTON, L.A. (2014) Bacterial community associated with traps of the carnivorous plants *Utricularia hydrocarpa* and *Genlisea filiformis*. *Aquatic Botany*. 116:8-12.
- CARMONA-RIBEIRO, A.M.; BARBASSA, L. & DIAS DE MELO, L. (2011). *Antimicrobial Biomimetics, Biomimetic Based Applications*. ISBN: 978-953-307-195-4.
- CHUGANI, S., WHITELEY, M., LEE, K.; D'ARGENIO, D.; MANOIL, C. & GREENBERG, P. (2001) QscR a modulator of quorum- sensing signal synthesis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of Natural Academy of Sciences*. 98:2752-2757.
- COLVIN, K.M.; IRIE, Y.; TART, C.S.; URBANO, R.; WHITNEY, J.C.; RYDER, C.; HOWELL, P.L.; WOZNIAK, D.J. & PARSEK, M.R. (2012) The Pel and Psl polysaccharides provide *Pseudomonas aeruginosa* structural redundancy within the biofilm matrix. 14(8):1913-1928.
- COOPER, A. (1823) Account of a Stone and of a Portion of a Catheter extracted from the Female Bladder by a Dilator; with an Appendix by Mr. Chapman of Wands worth, and by Mr. Birt, of Diss, Norfolk, on the removal of a Catheter and of a Stone from the Female Bladder by Dilatation. *Medico-Chirurgical Transaction*. 12(1):235-254.7.
- COSTERTON, J.W.; GEESEY, G.G. & CHENG, K.J. (1978) How bacteria stick. *Scientific American*. 238:86-95.
- COSTERTON, J.W.; STEWART, P.S. & GREENBERG, E.P. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 284(5418):1318-1322.
- CRUZ, S.; JIMÉNEZ, S.; NIETO, I.; VILLAREJO, B. (2010) Plantas Carnívoras. http://pendientedemigracion.ucm.es/info/cvicente/seminarios/plantas_carnivoras.pdf 24/02/2015
- DALTON, H. M.; GOODMAN, A. E. & MARSHALL, K. C. (1996) Diversity in Surface colonization behavior in marine bacteria, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 17: 228-234.

DAROUICHE, R. (2001) Device-associated infections: a macro problem that starts with a microadherence. *Clinical Infectious Disease*. 33:1567-1572.

DAVIES, D. (2003) Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2:114–122.

DE LA FUENTE-NÚÑEZ, C.; REFFUVEILLE, F.; FERNÁNDEZ, L. & HANCOCK, R.E.W. (2013) Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. *Current Opinion in Microbiology*. 16 (5):580–589.

DONLAN, R.M. & COSTERTON, J.W. (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical of Microbiology Review*. 15: 167-193.

DOROSHENKO, N.; TSENG, B. S.; HOWLIN, R. P.; DEACON, J.; WHARTON, J. A.; THURNER, P. J.; GILMORE, B. F.; PARSEK, M. R. & STOODLEY, P. (2014) Extracellular DNA Impedes the Transport of Vancomycin in *Staphylococcus epidermidis* Biofilms Preexposed to Subinhibitory Concentrations of Vancomycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 58 (12): 7273–7282.

DRISCOLL, J.A.; BRODY, S.L. & KOLLEF, M.H. (2007) The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs*. 67(3):351-68.

“*Drosera anglica*” ne4. (2006) Publicado bajo la licencia CC BY-SA 2.5 Wikimedia Commons http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Drosera_anglica_ne4.jpg#mediaviewer/File:Drosera_anglica_ne4.jpg.

DUNNE, W.M. (2002) Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clinical Microbiology Reviews*. 15:155-166.

DWYER, D.; KOHANSKI, M.A. & COLLINS, J.J. (2009) Role of reactive oxygen species in antibiotic action and resistance. *Current Opinion in Microbiology*. 12: 482–489.

ELIAS, S. (2011) Estudo da atividade antibiofilme de sobre microrganismos de importância médica ciências básicas da saúde. Tese de graduação. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1-67.

FITZPATRICK, F.; HUMPHREYS, H. & O’GARA, J. P. (2005) The genetics of staphylococcal biofilm formation - will a greater understanding of pathogenesis lead to better management of device-related infection? *Clinical Microbiology and Infection*. 11: 967-973.

FLEMMING, H.C. & WINGENDER, J. (2010) The biofilm matrix. *Nature Review Microbiology*. 8 (9): 623-633.

FUX, C.A.; COSTERTON, J.W.; STEWART, P.S. & STOODLEY, P. (2005) Survival strategies of infectious biofilms. *Trends in Microbiology*. 13(1):34-40.

GALLE, M.; JIN, S.; BOGAERT, P.; HAEGMAN, M. & VANDENABEELE, P. (2012) The *Pseudomonas aeruginosa* Type III Secretion System Has an Exotoxin S/T/Y Independent Pathogenic Role during Acute Lung Infection. *PLoS ONE* 7(7): e41547.

GOMEZ, C. A.; LEAL, A. L.; PEREZ, M. de J. & NAVARRETE, M.L. (2005) Mecanismos de resistencia en *Pseudomonas aeruginosa*: entendiendo a un peligroso enemigo. Revista de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia. 53(1): 27-34.

GORDON, R.J.; MIRAGAIA, M; WEINBERG, A.D.; LEE, C.J.; ROLO, J.; GIACALONE, J.C.; SLAUGHTER, M.S.; PAPPAS, P.; NAKA, Y.; TECTOR, A.J.; DE LENCASTRE, H. & LOWY F.D. (2012) *Staphylococcus epidermidis* Colonization Is Highly Clonal Across US Cardiac Centers. Journal of Infectious Diseases. 205:1391–1398.

HABERLANDT, G. (From Sinnesorgane Im Pflanzenreich, Trans. by Powell, R.C.) (1982) Insectivores: *Drosera* and *Drosophyllum. Carnivorus*. Plant Newslett. 11(3):66-73.

HALL-STOODLEY; COSTERTON, J.W. & STOODLEY, P. (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. Nature Review Microbiology. 2(2):95-108.

HAUSER, A.R. (2009) The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. Nature Review Microbiology. 7: 654–665.

HEYDORN, A.; NIELSEN, A. T.; HENTZER, M.; STERNBERG, C.; GIVSKOV, M.; ERSBOLL, B. K.; & MOLIN, S. (2000) Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT, Microbiology. 146 (10): 2395-2407.

HIRSCH, E.B. & TAM, V.H. (2010) Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patient outcomes. Expert Review of Pharmacoeconomics and Outcomes. 10(4): 441-451.

HOIBY, N.; BJARNSHOLT, T.; GIVSKOV, M.; MOLIN, S. & CIOFU, O. (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. International Journal of Antimicrobial Agents. 35(4): 322-332.

HOIBY, N.; CIOFU, O.; JOHANSEN, H.K.; SONG, Z.J.; MOSER, C.; JENSEN, P.O.; MOLIN, S., GIVSKOV, M., TOLKER-NIELSEN, T. & BJARNSHOLT, T. (2011) The clinical impact of bacterial biofilms. Internal Journal Oral Sciences. 3:55–65.

IRIE, Y.; BORLEE, B.R.; O’CONNOR, J.R.; HILL, P.J.; HARWOOD, C.S.; WOZNIAK, D.J.; PARSEK, M.R. (2012) Self-produced exopolysaccharide is a signal that stimulates biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. Proceeding of the National Academy of Sciences. 109: 20632–20636.

JOHANSEN, C; FALHOLT, P & GRAM. L. (1997) Enzymatic removal and disinfection of bacterial biofilms. Applied and Environmental Microbiology. 63: 3724-3728.

JOO. H.S, & OTTO, M. (2012) Molecular basis of in vivo biofilm formation by bacterial pathogens. Chemico-Biological Interactions. 19(12):1503-13

KAPLAN, J.B.; RAGUNATH, C.; RAMASUBBU, N.; FINE, D.H. (2003) Detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilm cells by an endogenous beta-hexosaminidase activity. Journal of Bacteriology. 185: 4693-4698.

KAPLAN, J.B. (2010) Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. Journal Dental Research. 89, 205–218.

KARATAN, E. & WATNICK, P. (2009) Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiology and Molecular Biology. Reviews.* 73: 310–347.

KOLODKIN-GAL, I.; ROMERO, D.; CAO, S.; CLARDY, J., KOLTER, R., LOSICK, R. & DAMINO, (2010) Acids Trigger Biofilm Disassembly. 328 (5978) 627-629.

KOOPMAN, M.M.; FUSELIER, D.M.; HIRD, S. & CARSTENS, B.C. (2010) The Carnivorous Pale Pitcher Plant Harbors Diverse, Distinct, and Time-Dependent Bacterial Communities Applied and Environmental Microbiology. 76 (6):1851-1860.

KRÓL, E.; PŁACHNO, B.J.; ADAMEC, L.; STOLARZ, M.; DZIUBINSKA, H.; TREBACZ, K. (2012) Quite a few reasons for calling carnivores ‘the most wonderful plants in the world. *Annals of Botany.* 1(9): 47-64.

KULASEKARA, B. & LORY, S. (2004) The genome of *Pseudomonas aeruginosa*. Academic/Plenum Publishers. (1): 47–75.

LASA, I.; POZO, J. L. DEL; PENADES, J. R. & LEIVA, J. (2005) Biofilmes bacterianos e infección. *Anales Sis San Navarra.* 28 (2): 163-175.

LAVERTY, G.; GORMAN, S. P. & GILMORE, B. F. (2013) Biomolecular mechanisms of staphylococcal biofilm formation. *Future Microbiology.* 8 (4):.509-524.

LEQUETTE, Y.; BOELS, G.; CLARISSE, M.; FAILLE, C. (2010) Using enzymes to remove biofilms of bacterial isolates samples in the food industry. *Biofoul.* 4: 421-431.

LEWIS, K. (2010) Persister cells. *Annual Review of Microbiology.* 64: 357–372.

LYNCH, A.S. & ROBERTSON, G.T. (2008) Bacterial and fungal biofilm infections. *Annual Review Medicine.* 59: 415–28.

MA, L.; WANG, J.; WANG, S.; ANDERSON, E.M.; LAM, J.S.; PARSEK, M.R. & WOZNIAK, D.J. (2012) Synthesis of multiple *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix exopolysaccharides is post-transcriptionally regulated. *Environmental Microbiology.* 14: 1995–2005.

MACEDO, A.J. & ABRAHAM, W.R. (2009) Can infections biofilm be controlled 372 by blocking 373 bacterial communication? *Medicinal Chemistry.* 5: 517-528.

MAH, T. (2012) Biofilm-specific antibiotic resistance. *Future Microbiology.* 7(9): 1061–1072.

HENTZER, M. & GIVSKOV, M. (2003) Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *Journal of Clinical Investigation.* 112: 1300-1307.

MAH, T.F.C. & O'TOOLE, G.A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology.* 9: 34-39.

MAY, T.B., SHINABARGER, D.; MAHARAJ,R.; KATO, J., CHU,L.; DEVAULT,J.D.; ROYCHOUDHURY, S.; ZIELINSKI, N.A.; BERRY, A., ROTHMEL, A.K.; MISRAAND, T.K. & CHAKRABARTY. M. (1991) Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*: a key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients. *Clinical Microbiology Reviews.* 4:191–206.

- McSPADDEN, G. B.B. (2004) Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in Agricultural Systems. *Phytopathology*. 94 (11): 1252-1258.
- MIKKELSEN, H.; SIVANESON, M. & FILLOUX, A. (2011) Key two-component regulatory systems that control biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology*. 13(7): 1666-1681.
- MURZA, G.L., HEAVER, J.R. & DAVIS, A. R. (2006) Minor pollinator–prey conflict in the carnivorous plant, *Drosera anglica*. *Plant Ecology*. 184(1): 43-52.
- MURRAY, G. L.; MOREL, V.; CERQUEIRA, G. M.; CRODA, J., SRIKRAM, A.; HENRY, R.; KO, A. I.; DELLAGOSTIN, O. A. & BULACH, D. M. (2009a). Genome-wide transposon mutagenesis in pathogenic *Leptospira* species. *Infection Immunology*. 77. 810–816.
- OTTO, M. (2009) *Staphylococcus epidermidis* – the ‘accidental’ pathogen. *Nature Reviews*. 7:555-567.
- OTTO, M. (2012) Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections. *Seminars in Immunopathology*. 34: 201-214.
- OTTO, M. (2013) Staphylococcal Infections: Mechanisms of Biofilm Maturation and Detachment as Critical Determinants of Pathogenicity. *Annual Review of Medicine*. 64:175-188.
- PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P. & EPIFANIO, R.A. (2002) Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Química Nova*. 25:45-61.
- POLANCO, N. & O'DALY, J.A. (2007) Reconocimiento de la variabilidad de los exoproductos de *Pseudomonas aeruginosa* en medios de cultivo y en infecciones clínicas. *Academia Biomédica Digital*. 33: 3-10.
- POOLE, K. (2012) Stress responses as determinants of antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. *Trends in Microbiology*. 20(5): 227–234.
- POPPINGA, S.; SIEGFRIED, R.H.; HARTMEYER, MASSELTHER, T.; HARTMEYER, I. & SPECK, T. (2013) Trap diversity and evolution in the Family Droseraceae. *Plant Signaling & Behavior* 8(7): 24685.
- QING & LUYAN (2013) Biofilm Matrix and Its Regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Molecular Sciences*14: 20983-21005, 2013.
- RACHID, S.; OHLSEN, K.; WITTE, W.; HACKER, J. & ZIEBUHR, W. (2000) Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 44 (12): 3357-3363.
- REDELMAN, C.V.; CHAKRAVARTY, S. & ANDERSON G.G. (2014) Antibiotic treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms stimulates expression of the magnesium transporter gene *mgtE*. *Microbiology*. 160: 165–178.
- ROGERS, K. L.; FEY, P. D. & RUPP, M. E. (2009) Coagulase-Negative Staphylococcal Infections. *Infectious Disease Clinics of North America*. 23:73-98.

- REID, G. (2001) Probiotic agents to protect the urogenital tract against infection. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 73: 437S-443S.
- RENNER, L.D & WEIBEL, D.B. (2011) Physicochemical regulation of biofilm formation. *MRS Bull.* 36(5): 347–55.
- ROSAN, B. & LAMONT, R.J. (2000). Dental plaque formation. *Microbes and Infection Journal*. 2:1599-1607.
- RÖMLING, U, & BALSALOBRE C. (2012) Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies (Review). *Journal of Internal Medicine*. 272: 541–561.
- SANTOS, I., SCOTT, G.; LUÍS A. ROCHA, L.A. & TAVARES, J.M. (2011) Desenvolvimento de dispositivos médicos: vantagens de uma metodologia dedicada. *CIBIM*. 10.
- SAUER, K.; CAMPER, A. K.; EHRLICH, G. D.; COSTERTON, J. W. & DAVIES, D.G. (2002) *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of Bacteriology*. 184: 1140–1154.
- SEIJA, V. (2010) Etiopatogenia microbiológica, Seccion III. Género *Staphylococcus*. *Temas de Bacteriología y Virología Médica*. 257-271.
- SIMÕES, M. (2011) Antimicrobial Strategies Effective Against Infectious Bacterial Biofilms. *Current Medicinal Chemistry*, 18: 2129-2145.
- SINGH, J.; BATRA, N. & SOBTI, R.C. (2001) Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. SSR1. *Process Biochemistry*. 36: 781–785.
- SIROVA, D.; SANTRUCEK, J., ADAMEC, L.; BARTA, J.; BOROVEC J.; PECH, J., OWENS, S.M.; SANTRŮČEK, H.; SANTRŮČKOVÁ, H.; SCHÄUFELE, R.; STORCHOVÁ, H.; & VRBA, J. (2014) Dinitrogen fixation associated with shoots of aquatic carnivorous plants: is it ecologically important?. *Annals of Botany*. 114:125–133.
- STEIN, T. (2005) *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions *Molecular Microbiology*. 56(4): 845–857.
- STEWART, P. & COSTERTON, J.W. (2001) Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet*. 358: 135–38.
- STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D.G. & COSTERTON, J.W. (2002) Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology*. 56:187-209.
- STOODLEY, L. H.-; COSTERTON, J.W. & STOODLEY, P. (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature reviews*. 2: 95-108.
- TAM, N.M.K.; UYEN, N.Q.; HONG, H.A.; DUC, L.H.; HOA, T.T., SERRA, C.H.; HENRIQUES, A.O. & CUTTING, S.M. (2006) The intestinal life cycle of *Bacillus subtilis* close relatives. *Journal of Bacteriology*. 188: 2692-2700.

TAYLOR, M.W.; RADAX, R.; STEGER, D. & WAGNER, M. (2007) Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology, and biotechnological potential. *Microbiol Molecular Biology Review*. 71: 295–347.

THOMAS. W.E.; NILSSON, L.M.; FORERO. M.; SOKURENKO, E.V. & VOGEL,V. (2004) Shear-dependent 'stick-and-roll' adhesion of type 1 fimbriated *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*. 53(5):1545-57.

TOLEDO-ARANA, A.; VALLE, J.; SOLANO, C.; ARRIZUBIETA, M.J.; CUCARELLA, C.; LAMATA, M.; AMORENA, B.; LEIVA, J.; PENADES, J.R. & LASA, I. (2001) The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Applied Environment Microbiology*. 67: 4538-4545.

TOLKER-NIELSEN, T.; BRINCH, U. C.; RAGAS, P. C.; ANDERSEN, J. B.; JACOBSEN, C. S. & MOLIN, S. (2000) Development and dynamics of *Pseudomonas* sp. biofilms, *Journal of Bacteriology*. 182: 6482-6489.

TRAUTMANN, M., LEPPER, P. M. & HALLER, M. (2005) Ecology of *Pseudomonas aeruginosa* in the intensive care unit and the evolving role of water outlets as a reservoir of the organism. *American Journal of Infection Control*. 33 (Suppl. 1): S41–S49.

TRENTIN, D.S. (2013) Estratégias de combate à adesão de bactérias patogênicas e formação de biofilmes: prospecção de fitocompostos e modificações de superfícies visando uso biomédico. Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio Grande Do Sul – Brasil. 1-319.

TRENTIN, D.S.; GIORDANI, R.B.; ZIMMER, K.R.; SILVA, A.G.; SILVA M.S.; CORREIA, M.T.S.; BAUMVOL, I.J.R. & MACEDO, A.J. (2011) Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. *Journal Ethnopharmacol*.137:327-335.

UZCUDUN, I.(2010). Biofilms bacterianos. *Actualidad SEM*. 37:14-18.

VALLET, I.; OLSON, J.W.; LORY, S.; LAZDUNSKI, A.; FILLOUX, A. (2001) The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: Identification of fimbrial gene clusters (cup) and their involvement in biofilm formation. *Proceedings of the National. Academy of Sciences*. 98: 6911-6916.

WANG, Q.; SUN, F-J.; LIU, Y.; XIONG, L-R.; XIE, L-L. & XIA, P-Y. (2010) Enhancement of Biofilm Formation by Subinhibitory Concentrations of Macrolides in ica ADBC-Positive and -Negative Clinical Isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 54 (6): 2707-2711.

WINGENDER, J. & FLEMMING, H. C. (2011) Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 214: 417-423.

WU, H.; SONG, Z. & HENTZER, M. (2004) Synthetic furanones inhibit quorum-sensing and enhance bacterial clearance in *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 53: 1054-1061.

YANG, L.; HU, Y., LIU, Y.; ZHANG, J.; ULSTRUP, J. & MOLIN, S. (2011) Distinct roles of extracellular polymeric substances in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Environmental Microbiology*. 13(7): 1705–1717.

YAO, J.; ZHONG, J. & LAMBOWITZ, A.M. (2005) Gene targeting using randomly inserted group II introns (targetrons) recovered from an *Escherichia coli* gene disruption library. *Nucleic Acids Research*. 33: 3351–3362.

ZHAO, W. & HU, Z. (2010) β -Lactamases identified in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Critical reviews in microbiology*. 36(3): 245-258.