

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

COMISSÃO DE GRADUAÇÃO DO CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Bacharelado em Ciências Biológicas: Trabalho de Conclusão de Curso

Fernando Bueno Ferreira Fonseca de Fraga

Influência da fonte de carbono na obtenção de compostos bioativos
produzidos por micro-organismos isolados do carrapato bovino

Rhipicephalus (Boophilus) microplus

Porto Alegre

2013

Fernando Bueno Ferreira Fonseca de Fraga

Influência da fonte de carbono na obtenção de compostos bioativos
produzidos por micro-organismos isolados do carrapato bovino

Rhipicephalus (Boophilus) microplus

Trabalho de Conclusão de Curso submetido à Comissão de Graduação do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande Do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre José Macedo

Porto Alegre

2013

NOTA

O presente Trabalho de Conclusão de Curso apresenta-se no formato de artigo científico, conforme previsto no art. 18 da decisão 02/2013 da Comissão de Graduação do Curso de Ciências Biológicas, a qual regulamenta a atividade de ensino Trabalho de Conclusão do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O artigo será submetido ao periódico Memórias do Instituto Oswaldo Cruz e a redação segue as instruções para autores do mesmo, as quais se encontram devidamente anexadas ao final do trabalho. No entanto, decidiu-se por adotar a língua portuguesa e a numeração das páginas devido à praticidade de leitura e correção pelos membros da banca examinadora.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Alexandre José Macedo, pelas orientações no desenvolvimento deste trabalho de conclusão de curso. Agradeço imensamente por ter aberto as portas do seu laboratório para eu realizar os experimentos e por ter se mostrado sempre disposto a ajudar ao longo do trabalho.

À professora Karine Rigon Zimmer, por aceitar o convite para integrar a Banca Examinadora deste trabalho. Agradeço também pelo incentivo e por todas as ajudas e sugestões para que este trabalho pudesse ser realizado. Estou certo que o seu conhecimento sobre o tema contribuirá imensamente para esse trabalho.

À professora Ana Paula Guedes Frazzon, por aceitar o convite para integrar a Banca Examinadora deste trabalho. Por ter me aguentado nas aulas de controle microbiológico e pelo seu jeito alegre que motiva as pessoas ao seu redor.

À minha família, especialmente na figura dos meus pais, Luiz Fernando e Maria da Graça, por sempre prezarem pela educação dos filhos e incentivarem constantemente os nossos estudos.

À Janira Prichula, minha colega e namorada, pelo amor, pelo carinho e pela compreensão, compartilhados durante a Faculdade.

Ao pessoal do laboratório e à Danielle Trentin pelo auxílio com o trabalho.

A todos os colegas e amigos com quem compartilhei risadas e bons momentos durante as aulas de graduação.

“Cada metro cúbico de terra e de húmus é um mundo que pulula com centenas de milhares dessas criaturas (os artrópodes), representando centenas de espécies. Junto a elas existem micróbios em quantidade e diversidade ainda maiores. Em um só grama de terra, ou seja, menos de um punhado, vivem cerca de 10 bilhões de bactérias, pertencentes a até 6 mil espécies diferentes.

A vida inteira dos organismos microscópicos e dos que mal são visíveis para nós se desenrola em espaços que o ser humano, um dos maiores animais da Terra, costuma ignorar.”

Edward O. Wilson – Biólogo

Antimicrobianos e controle de biofilmes

Influência da fonte de carbono na obtenção de compostos bioativos produzidos por micro-organismos isolados do carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

Fernando Bueno Ferreira Fonseca de Fraga^I, Alexandre José Macedo^{II}

^I Faculdade de Agronomia - UFRGS (Av. Bento Gonçalves, 7712 - CEP 91540-000 - Porto Alegre - RS - Brasil) – fernandocfh@yahoo.com.br

^{II} Faculdade de Farmácia - UFRGS

Resumo: O desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos conhecidos impulsiona a busca por novos compostos e por alternativas para o controle de micro-organismos patogênicos. A prospecção de novas moléculas tem sido realizada a partir da microbiota associada a diversos organismos, entre os quais estão os artrópodes. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da fonte de carbono sobre o potencial de bactérias associadas ao carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em produzir compostos com atividade antibiótica e anti-biofilme. Os resultados demonstram a capacidade dos isolados em produzir moléculas que interferem no crescimento e na formação de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus epidermidis*, dois patógenos de importância médica e veterinária. A melhor atividade antimicrobiana foi obtida após 96h cultivo utilizando glicose na concentração de 1,5% como fonte de

carbono para o crescimento dos isolados. Este trabalho demonstra o potencial biotecnológico das bactérias associadas ao carrapato bovino.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*; *Staphylococcus epidermidis*; Biofilmes Bacterianos

Summary: The development of antimicrobial resistance leads to the search for new compounds and alternatives for control of pathogenic micro-organisms. Novel molecules have been discovered from the microbiota associated with various organisms, including arthropods. The aim of this study was to evaluate the influence of carbon source on the production of antibiotics and anti-biofilm compounds by cattle tick-associated bacteria. The results show the ability of isolates to produce molecules that interfere with growth and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*, both pathogens of medical and veterinary importance. The best antimicrobial activity was obtained after 96 h cultivation using glucose at concentration of 1.5% as carbon source. This work demonstrates the biotechnological potential of cattle tick-associated bacteria.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*; *Staphylococcus epidermidis*; Bacterial Biofilms

Financiamento: CAPES (Edital Nanobio-2008)

INTRODUÇÃO

Biofilmes bacterianos são definidos como comunidades de bactérias aderidas de maneira irreversível a uma superfície e envoltas por uma matriz de substâncias poliméricas produzidas pela própria comunidade (Worthington et al. 2012). A agregação de bactérias formando biofilmes é, atualmente, considerada a forma de vida mais comum apresentada por esses organismos no ambiente. Além das bactérias, outros grupos de procariotos como as Arquéias e até mesmo eucariotos como leveduras, fungos filamentosos e algas unicelulares possuem a capacidade de desenvolver biofilmes microbianos (Orell et al. 2013).

Micro-organismos vivendo como biofilmes são uma grande preocupação no mundo todo em diversos setores como indústria, medicina e saúde, alimentação, entre outros. Parte dessa preocupação deve-se ao fato da dificuldade de remoção dos biofilmes e também a sua resistência aumentada aos tratamentos com antibióticos. Essa resistência aos antimicrobianos está associada a diversos fatores característicos dos biofilmes, entre eles a proteção conferida pela matriz de substância poliméricas extracelulares (EPS), produzida pelo biofilme, que é responsável tanto por manter as células unidas (coesão), quanto por manter a colônia fixa ao substrato (adesão) (Simões et al. 2010). O controle de biofilmes na área médica é de suma importância, uma vez que diversos patógenos que se apresentam sob esse modo de vida, entre os quais *Staphylococcus epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa*, possuem grande recalcitrância aos tratamentos com os antibióticos conhecidos e estão relacionados a diversas infecções em ambientes hospitalares e veterinários (Breidenstein et al. 2011; Schoenfelder et al. 2010)

É nessa perspectiva que a procura por novos compostos com atividade antimicrobiana emerge. Demain & Sanchez (2009) discutem a importância desta constante busca por novos antimicrobianos e o papel dos compostos oriundos do metabolismo secundário de micro-organismos e plantas nesta corrida. Uma das alternativas ao uso de antimicrobianos convencionais é a prospecção de moléculas para modular a atividade dos biofilmes, porém sem atividade sobre o crescimento celular. O uso dessas moléculas baseia-se principalmente nos sistemas de comunicação presentes nos biofilmes, entre estes o sistema *Quorum Sensing* (QS), no qual a comunicação célula-célula dentro do biofilme é realizado por moléculas auto-indutoras como as *acil homoserina lactonas* (AHLs) e os *peptídeos auto-indutores* (PAI) (Camilli & Bassler 2006). Diversos estudos tem objetivado a procura por compostos similares a estes com a finalidade de modular a atividade dos biofilmes microbianos, uma vez que o sistema de QS tem influência sobre a adesão, a formação e a expressão de fatores de virulência pelo biofilme (Worthington et al. 2012).

A prospecção destas moléculas bioativas ocorre a partir dos mais diversos ambientes, entre os quais está a própria microbiota de outros organismos, como os artrópodes. Neste estudo, foi investigada a capacidade de bactérias isoladas de carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em produzir compostos com atividade sobre *Pseudomonas aeruginosa* PA14 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, dois patógenos de importância médica e veterinária capazes de apresentar-se na forma de biofilmes.

METODOLOGIA

Cepas bacterianas

Neste estudo, *Pseudomonas aeruginosa* PA14 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 foram utilizadas como modelos para formação de biofilme bacteriano. As bactérias associadas ao carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* foram previamente isoladas do ovário e do órgão de gené dos artrópodes por Zimmer et al. (2013) e identificadas com base no sequenciamento de 16S rRNA como *Bacillus amyloliquefaciens* OV12 e *Microbacterium testaceum* GO18, respectivamente.

Condições de cultivo e obtenção do sobrenadante

Todas as cepas bacterianas utilizadas neste estudo foram cultivadas em meio sólido Luria-Bertani (LB: peptona 10g/L; extrato de levedura 5g/L; NaCl 10g/L; agar 10g/L) a 37°C. A produção de metabólitos por *Bacillus amyloliquefaciens* OV12 e *Microbacterium testaceum* GO18 foi realizada em cultivo submerso utilizando meio mineral M63 (de Breij et al. 2010) modificado (KH₂PO₄ [13,6 g/l]; K₂HPO₄ [7 g/l]; (NH₄)₂SO₄ [2g/l]; MgSO₄.7H₂O [1M 1mL/L]), suplementado com diferentes fontes de carbono orgânico (glicose, sacarose, amido, lactose) na concentração de 1,5%. Cada bactéria foi previamente crescida em meio LB por 48h e o inóculo foi obtido resuspendendo as colônias em solução salina estéril 0,9% e ajustando-se a densidade óptica em 0.3 para leitura em 600nm (OD₆₀₀) (*Epoch Microplate Spectrophotometer - Biotek*). O cultivo foi realizado em frascos erlenmeyer (250 mL) contendo 90 ml de meio mineral suplementado e 10 mL do inóculo bacteriano, mantidos a temperatura de 37°C, com agitação de 150 rpm durante 4 dias. A cada 24h foram coletadas alíquotas e o sobrenadante foi obtido por centrifugação (10.000 rpm/30min), filtrado em membranas de 0.22 µm e congelado para utilização nos ensaios posteriores. Os cultivos aqui

descritos foram conduzidos em duplicata, os controles foram mantidos sob as mesmas condições e formulados apenas com o meio mineral e a respectiva fonte de carbono.

Cinética de crescimento

O crescimento do cultivo bacteriano foi acompanhado em intervalos de 24h mediante a coleta de 200 µl do cultivo e leitura da absorbância no comprimento de onda de 600nm (OD₆₀₀) (*Epoch Microplate Spectrophotometer-Biotek*).

Ensaio de atividade anti-biofilme

Os ensaios de atividade anti-biofilme foram conduzidos em placas de 96 poços de poliestireno (Costar 3599 Corning, Inc. NY, USA), de acordo com o protocolo descrito por Zimmer et al (2013). *Pseudomonas aeruginosa* PA14 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 foram as cepas utilizadas como modelo para formação de biofilme nos ensaios. O ensaio de inibição da formação de biofilmes foi realizado adicionando-se 80 µl de suspensão bacteriana, 40µl de caldo LB e 80 µl do sobrenadante do cultivo bacteriano a ser testado e incubando para crescimento a 37°C. Após 24h, o conteúdo dos poços foi lavado gentilmente 3 vezes com 200µl de solução salina estéril 0,9%, as bactérias aderidas à superfície do poço foram fixadas em estufa por 1h a 60°C e depois coradas com 200µl de cristal violeta por 15 min à temperatura ambiente. O excesso de corante foi retirado cuidadosamente pela lavagem das placas em água corrente e as células aderidas aos poços foram resuspendidas em etanol 99% e levadas para leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570nm. Os controles de formação de biofilmes foram feitos usando apenas o meio mineral, suplementado com as respectivas fontes de carbono, no lugar do sobrenadante dos cultivos bacterianos. O crescimento celular foi estimado pela diferença de absorbância (600nm) entre o tempo 0h e 24h após a incubação. Como controle de crescimento para

Pseudomonas aeruginosa e *Staphylococcus epidermidis* foram usados Gentamicina (8 µg/ml) e Rifampicina (8 µg/ml), respectivamente. Todos os ensaios biológicos aqui descritos foram conduzidos em triplicata.

RESULTADOS

O crescimento em diferentes fontes de carbono das bactérias isoladas de carrapato bovino, previamente identificadas como *Bacillus amyloliquefaciens* OV12 e *Microbacterium testaceum* GO18, está representado nas figuras 1 e 2. Verificou-se que ambas apresentaram um crescimento muito superior quando submetidas aos meios de cultivo suplementados com glicose ou sacarose como fonte de carbono. Com relação ao amido, destacamos que as características intrínsecas do substrato, como a turbidez gerada pelo amido na solução, podem ter interferido diretamente nos resultados e, portanto, decidimos realizar os demais ensaios apenas com os filtrados obtidos a partir dos cultivos de glicose, sacarose e lactose.

Com relação à atividade anti-biofilme apresentada por *Bacillus amyloliquefaciens* OV12 sobre *Pseudomonas aeruginosa* PA14, observamos que o filtrado com a melhor atividade foi obtido após 96h de cultivo na presença de glicose como fonte de carbono, reduzindo em mais de 50% a formação de biofilme por esta bactéria patogênica (Figura 3). Para os filtrados de *Microbacterium testaceum* GO18, que foram testados contra *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, os melhores resultados também foram obtidos utilizando glicose como fonte de carbono e nos tempos finais do cultivo, uma vez que reduziu em 75% a capacidade de *S. epidermidis* de formar de biofilmes (Figura 4).

Com a intenção de investigar se a atividade anti-biofilme apresentada estava relacionada com uma atividade antibiótica, analisamos o crescimento celular das bactérias após 24h de cultivo. Os resultados indicam uma redução do número de células superior a 50% para *Pseudomonas aeruginosa* PA14 (Figura 5) e próximo a 70% para *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 (Figura 6), quando incubados para crescimento juntamente com os filtrados de 96h obtidos com glicose como fonte de carbono dos cultivos de *Bacillus amyloliquefaciens* OV12 e *Microbacterium testaceum* GO18, respectivamente.

DISCUSSÃO

Associações entre bactérias e artrópodes são comuns e causam múltiplos impactos sobre o modo de vida do hospedeiro, como alterações nas taxas reprodutivas, na obtenção de alimento e até mesmo na proteção do hospedeiro devido à ação de metabólitos produzidos pelos simbiossitos (Duron & Hurst 2013). Estudos avaliando a microbiota associada a outras espécies de carrapato descreveram a presença dos gêneros *Bacillus* sp. e *Microbacterium* sp. em diversos estágios de desenvolvimento desses animais (Rudolf et al. 2009).

Nosso estudo mostra que as bactérias isoladas do carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* foram capazes de produzir compostos com atividade inibitória sobre o crescimento celular que, por consequência, interferiu na formação de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus epidermidis*, em um meio de cultivo quimicamente definido contendo apenas glicose como fonte de carbono. Esses resultados diferem dos encontrados por Zimmer et al. (2013), que cultivando os mesmos isolados em um meio complexo (caldo LB peptona 10g/L;

extrato de levedura 5g/L; NaCl 10g/L) demonstraram a atividade anti-biofilme desses micro-organismos, porém sem efeito sobre o crescimento celular dos patógenos. Neste sentido, fica evidente que a presença de glicose induz os micro-organismos a produzirem moléculas com efeito antibiótico, visto que o meio LB não contém glicose em sua composição.

A glicose é importante no metabolismo energético de grande parte dos organismos. O ciclo de vida do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* apresenta uma fase parasitária e uma de vida livre, que inicia com a queda das fêmeas ingurgitadas no solo e segue com a postura dos ovos (Zimmer 2012). A partir daí o desenvolvimento embrionário do carrapato depende do estoque de nutrientes obtidos pela fêmea durante a fase parasitária, sendo o sangue bovino a única fonte de alimento para o desenvolvimento do carrapato e parte de seus nutrientes são transformados e transferidos para os ovos (Campos et al. 2006). As alterações no metabolismo de carboidratos se relacionam diretamente com mudanças morfológicas no desenvolvimento de *Boophilus microplus* (Moraes et al. 2007) e o embrião utiliza a glicose materna, armazenada na forma de glicogênio nos oócitos, para obtenção de energia durante a fase inicial da embriogênese. Já em uma segunda fase ele passa a utilizar glicose proveniente da gliconeogênese no próprio embrião e aumenta os níveis de glicose até a eclosão larval (Guizzo et al. 2012). Sendo assim, é plausível pensar que *B. amyloliquefaciens* OV12 e *M. testaceum* GO18 produzam antibióticos na presença deste carboidrato, uma vez que os mesmos foram isolados de duas estruturas das fêmeas, órgão de gené e ovários, as quais estão diretamente relacionadas com o desenvolvimento da prole, onde o metabolismo de glicose é imprescindível. Ainda, a capacidade de produção de compostos bioativos por estas bactérias associadas ao

carrapato pode estar relacionada com uma estratégia de defesa do organismo durante a fase de vida livre, onde as ameaças e o contato com os micro-organismos presentes no solo, como bactérias do gênero *Pseudomonas*, aumentam.

Recentemente, estudos têm descrito compostos com capacidade de interferir na adesão celular bacteriana e na formação de biofilmes e que também apresentam ação sobre o crescimento celular. Schillaci et al. (2009) descreve a ação de um composto isolado do organismo marinho *Paracentrotus lividus* que apresenta atividade antimicrobiana sobre células planctônicas de *Staphylococcus epidermidis* e o mesmo composto, quando aplicado em concentrações subinibitórias, foi capaz de inibir a formação de biofilmes pela mesma cepa. Trentin et al. (2013) demonstrou que atividade de taninos sobre a formação de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa* pode estar relacionada ao efeito bacteriostático apresentado por esses compostos.

Com relação à produção de biomoléculas com atividade sobre o crescimento e a formação de biofilme obtida neste estudo, verificamos uma forte influência da fonte de carbono escolhida para suplementar o meio de cultivo. As cepas de *B. amyloliquefaciens* OV12 e *M. testaceum* GO18 apresentaram elevado crescimento durante cultivo submerso quando a fonte de carbono disponível era glicose ou sacarose em comparação com os demais carboidratos fornecidos (Figuras 1 e 2). Porém, as melhores atividades sobre o crescimento e formação de biofilme das bactérias patogênicas apresentadas por *Bacillus* e *Microbaterium* foram obtidas na presença de glicose (Figuras 4 e 5), que curiosamente é considerado como interferente na produção de diversos antibióticos (Sánchez et al. 2010). Além dos nutrientes, outros fatores influenciam a produção de moléculas com atividade biológica por micro-organismos, como disponibilidade de precursores, indução por enzimas e taxa de crescimento.

Nossos resultados evidenciam que a melhor produtividade foi alcançada após 96h de cultivo, de acordo com Demain (1998), que relaciona a produção de metabólitos secundários a baixas taxas de crescimento, o que ocorre depois do consumo de grande parte do nutriente disponível no meio, a partir da fase estacionária de crescimento.

Recorrendo à literatura, é possível confirmar que *B. amyloliquefaciens* é descrito como produtor de diversos compostos bioativos. He et al. (2013) demonstra a influência das condições de cultivo sobre o acúmulo e a produtividade de macrolídeos e Yuan et al. (2012) relata seu potencial de atuar como agente de biocontrole sobre diversos patógenos associados a plantas. Yin et al. (2010) constataram a presença de um gene responsável pela produção de AHL-lactonases, fato que demonstra a possibilidade desse micro-organismo em interferir no sistema QS mediado pelas N-acylhomoserina lactonas, amplamente utilizado por bactérias Gram-negativas.

Já *M. testaceum* tem sua presença geralmente associada a plantas e ao solo, com forte influência sobre a microbiota presente nesses substratos. A interferência da fonte de carbono na produção de substâncias com atividade antimicrobiana por essa bactéria foi descrita por Dikin et al. (2007) e, recentemente, Morohoshi et al. (2009) e Wang et al. (2010) mostraram que esse micro-organismo também é capaz de degradar N-acylhomoserina lactonas.

Nosso estudo reforça a capacidade destes micro-organismos em produzir compostos com atividade antimicrobiana e demonstra o potencial biotecnológico, bem como a diversidade metabólica - que pode ser alcançada pela variação no meio de produção - das bactérias associadas ao carrapato bovino.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Breidenstein E B M, De la Fuente C, Hancock R E W 2011. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol* 19:419–426.

Camilli A, Bassler B L 2006. Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science* 311:1113-1116.

Campos E, Moraes J, Façanha A R, Moreira E, Valle D, Abreu L, Manso P P A, Nascimento A, Pelajo-Machado M, Lenzi H, Masuda A, Vaz Jr I S, Logullo C 2006. Kinetics of energy source utilization in *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) embryonic development. *Vet Parasitol* 138: 349–357

de Breij A, Dijkshoorn L, Lagendijk E, van der Meer J, Koster A, Bloemberg G, Wolterbeek R, van den Broek P, Nibbering P 2010. Do Biofilm Formation and Interactions with Human Cells Explain the Clinical Success of *Acinetobacter baumannii*? *PLoS ONE* 5(5): e10732.

Demain A L, Sanchez S 2009. Microbial drug discovery: 80 years of progress. *J Antibiot* 62:5-16

Demain A L. 1998. Induction of microbial secondary metabolism. *Internatl Microbiol* 1:259–264

Dikin A, Sijam K, Kadir J, Seman I A 2007. Effect of Different Carbon Sources and Peptones on the Production of Antimicrobial Substances from Bacteria Against *Schizophyllum commune* FR. *Int J Agri Biol* 9:49-53.

Duron O, Hurst G DD 2013. Arthropods and inherited bacteria: from counting the symbionts to understanding how symbionts count. *BMC Biology* 11:45.

Guizzo M G, Abreu L, Masuda A, Logullo C, Vaz Jr I S 2012. Metabolismo de biomoléculas na embriogênese do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Acta Scientiae Veterinariae* 40(1): 1010.

He S, Wang H, Wu B, Zhou H, Zhu P, Yang R, Yan X 2013. Response Surface Methodology Optimization of Fermentation Conditions for Rapid and Efficient Accumulation of Macrolactin A by Marine *Bacillus amyloliquefaciens* ESB-2. *Molecules* 18: 408-417.

Moraes J, Galina A, Alvarenga P H, Rezende G L, Masuda A, Vaz Jr I S, Logullo C 2007. Glucose metabolism during embryogenesis of the hard tick *Boophilus microplus*. *Comp Biochem Physiol A Physiol*. 146:528–533

Morohoshi T, Someya N, Ikeda T 2009. Novel N-acylhomoserine lactone-degrading bacteria isolated from the leaf surface of *Solanum tuberosum* and their quorum-quenching properties. *Biosci Biotechnol Biochem* 73(9):2124-2127.

Orell A, Fröls S, Albers S 2013. Archaeal Biofilms: The Great Unexplored. *Annu Rev Microbiol* 67:337–54.

Rudolf I, Mendel J, Sikutová S, Svec P, Masariková J, Nováková D, Bunková L, Sedláček I, Hubálek Z 2009. 16S rRNA gene-based identification of cultured bacterial flora from host-seeking *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus* and *Haemaphysalis concinna* ticks, vectors of vertebrate pathogens. *Folia Microbiol* 54:419–428.

Sánchez S, Chávez A, Forero A, García-Huante Y, Romero A, Sánchez M, Rocha D, Sánchez B, Ávalos M, Guzmán-Trampe S, Rodríguez-Sanoja R, Langley E, Ruiz B 2010. Carbon source regulation of antibiotic production. *J Antibiot* 63(8):442-59.

Schillaci D, Arizza V, Parrinello N, Di Stefano V, Fanara S, Muccilli V, Cunsolo V, Haagensen J J A, Molin S 2009. Antimicrobial and antistaphylococcal biofilm activity from the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *J Appl Microbiol* 108: 17–24.

Schoenfelder S M K, Lange C, Eckart M, Henning S, Kozytska S, Ziebuhr W 2010. Success through diversity – how *Staphylococcus epidermidis* establishes as a nosocomial pathogen. *Int J Med Microbiol* 300:380–386.

Simões M, Simões L C, Vieira M J 2010. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology* 43: 573–583.

Trentin D S, Silva D B, Amaral M W, Zimmer K R, Silva M V, Lopes N P, Giordani N B, Macedo A J 2013. Tannins Possessing Bacteriostatic Effect Impair *Pseudomonas aeruginosa* Adhesion and Biofilm Formation. *PLoS ONE* 8(6): e66257

Wang W-Z, Morohoshi T, Ikenoya M, Someya N, Ikeda T 2010. AiiM, a Novel Class of N-Acylhomoserine Lactonase from the Leaf-Associated Bacterium *Microbacterium testaceum*. *Appl Environ Microbiol* 76(8):2524–2530

Worthington R J, Richards J J, Melander C 2012. Small molecule control of bacterial biofilms. *Org Biomol Chem* 37: 7457-7474.

Yin X-T, Xu L, Fan S-S, Xu L-N, Li D-C, Liu Z-Y 2010. Isolation and characterization of an AHL lactonase gene from *Bacillus amyloliquefaciens*. *World J Microbiol Biotechnol* 26:1361–1367

Yuan J, Li B, Zhang N, Waseem R, Shen Q, Huang Q 2012. Production of Bacillomycin- and Macrolactin-Type Antibiotics by *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 for Suppressing Soilborne Plant Pathogens. *J. Agric. Food Chem* 60:2976–298

Zimmer K R, Seixas A, Conceição J M, Zvoboda D A, Barros M P, Tasca T, Macedo A J, Termignoni C 2013. Cattle tick-associated bacteria exert anti-biofilm and anti-*Tritrichomonas foetus* activities. *Vet Microbiol* 164:171–176.

Zimmer K R 2012. Atividade antibiofilme e antibiótica da cera dos ovos e de metabólitos produzidos por bactérias associadas ao carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 241pp.

ANEXO 1 - Figuras

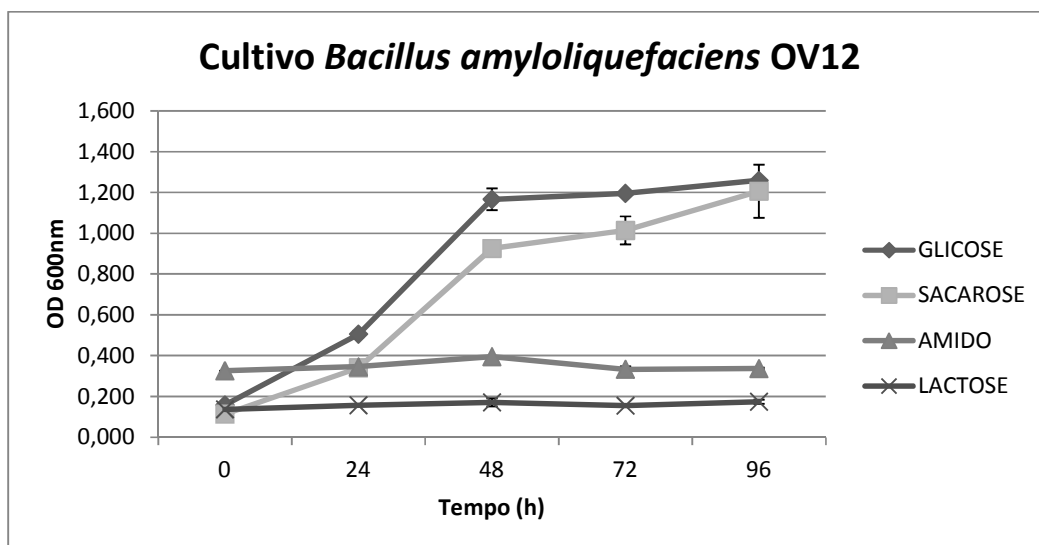


Figura 1 – Crescimento celular (OD 600nm) do cultivo de *Bacillus amyloliquefaciens* OV12 em diferentes fontes de carbono. Os valores representam as médias e os desvios padrão dos cultivos conduzidos em duplicata.

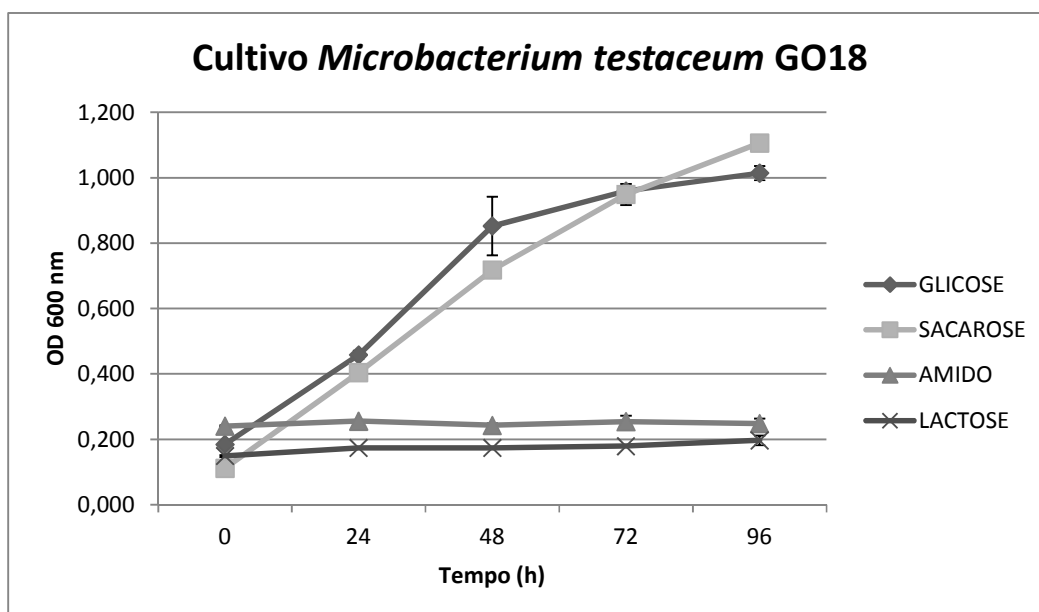


Figura 2 - Crescimento celular (OD 600nm) do cultivo de *Microbacterium testaceum* GO18 em diferentes fontes de carbono. Os valores representam as médias e os desvios padrão dos cultivos conduzidos em duplicata.

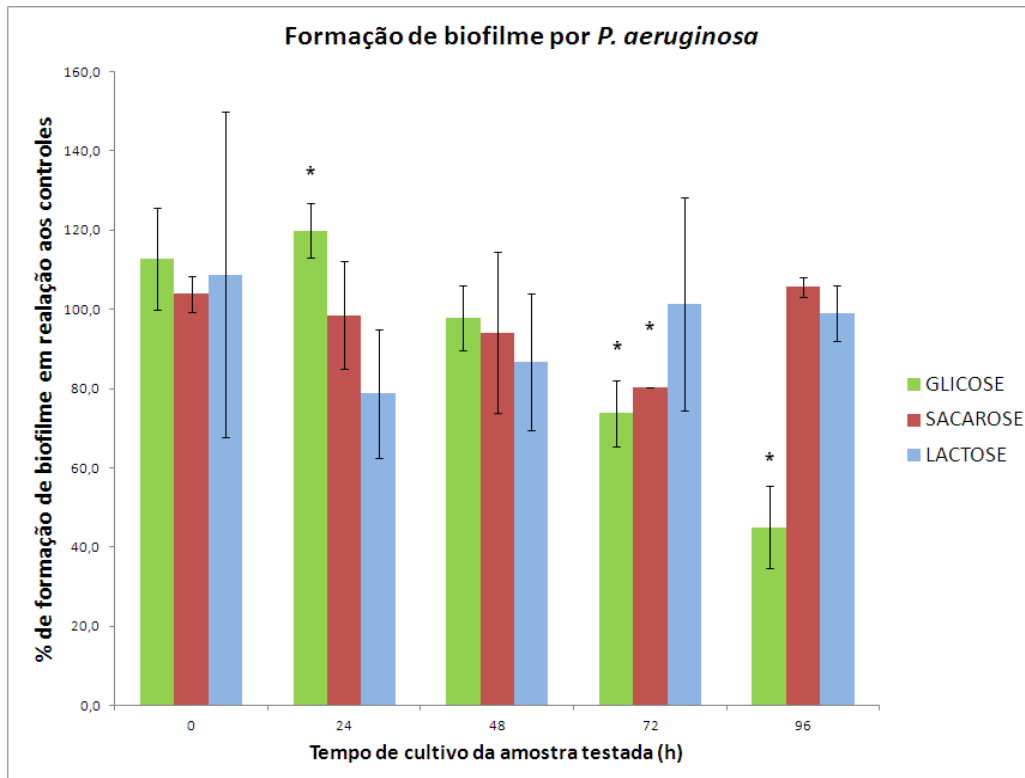


Figura 3 – Formação de biofilme (%) por *P. aeruginosa* (eixo Y) frente aos filtrados brutos do cultivo de *Bacillus amyloliquefaciens* OV12 obtidos em diferentes tempos de cultivo (eixo X) e distintas fontes de carbono. Os valores representam a média e o desvio padrão de 03 ensaios independentes. * indica diferença significativa em relação aos controles de formação de biofilme (*teste-t* de Student, $p \leq 0,05$).

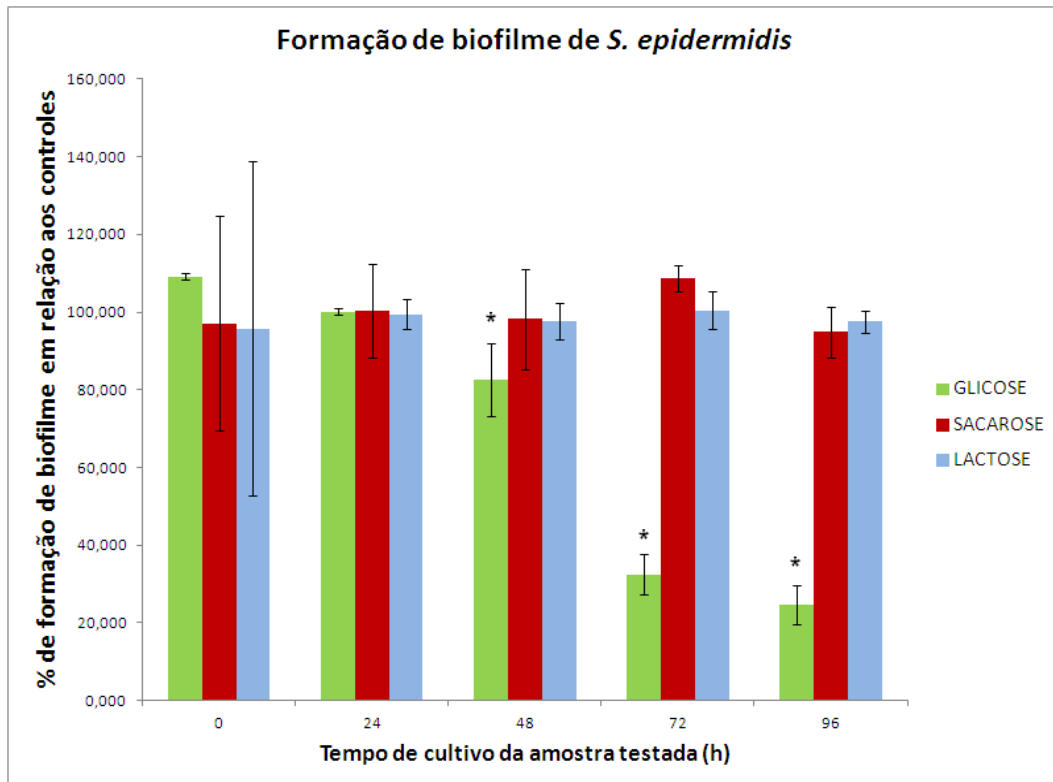


Figura 4 – Formação de biofilme (%) por *S. epidermidis* (eixo Y) frente aos filtrados brutos do cultivo de *Microbacterium testaceum* GO18 obtidos em diferentes tempos de cultivo (eixo X) e distintas fontes de carbono. Os valores representam a média e o desvio padrão de 03 ensaios independentes. * indica diferença significativa em relação aos controles de formação de biofilme (*teste-t* de Student, $p \leq 0,05$).

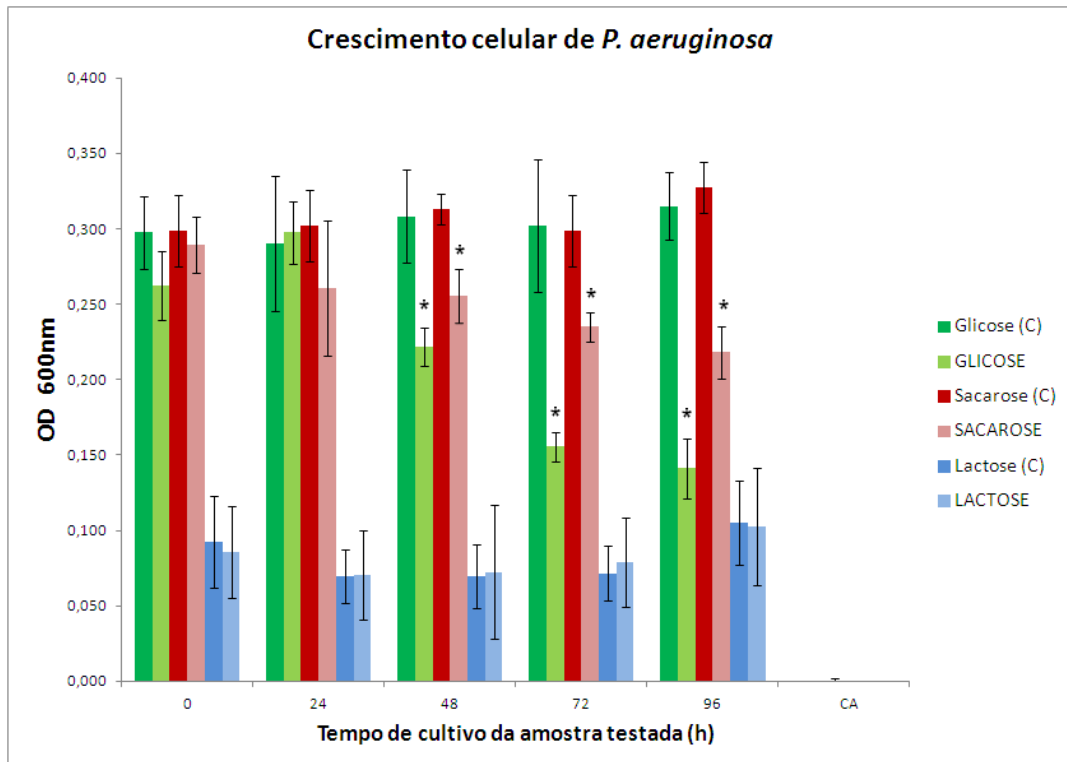


Figura 5 – Efeito dos filtrados do cultivo de *Bacillus amyloliquefaciens* OV12, obtidos em diferentes tempos e fontes de carbono, sobre o crescimento celular (OD 600nm) de *P.aeruginosa*. (C) = indica o controle para cada tratamento. CA = gentamicina (8 µg ml). Os valores representam a média e o desvio padrão de 03 ensaios independentes. * indica diferença significativa em relação aos controles (C) (*teste-t* de Student, $p \leq 0,05$).

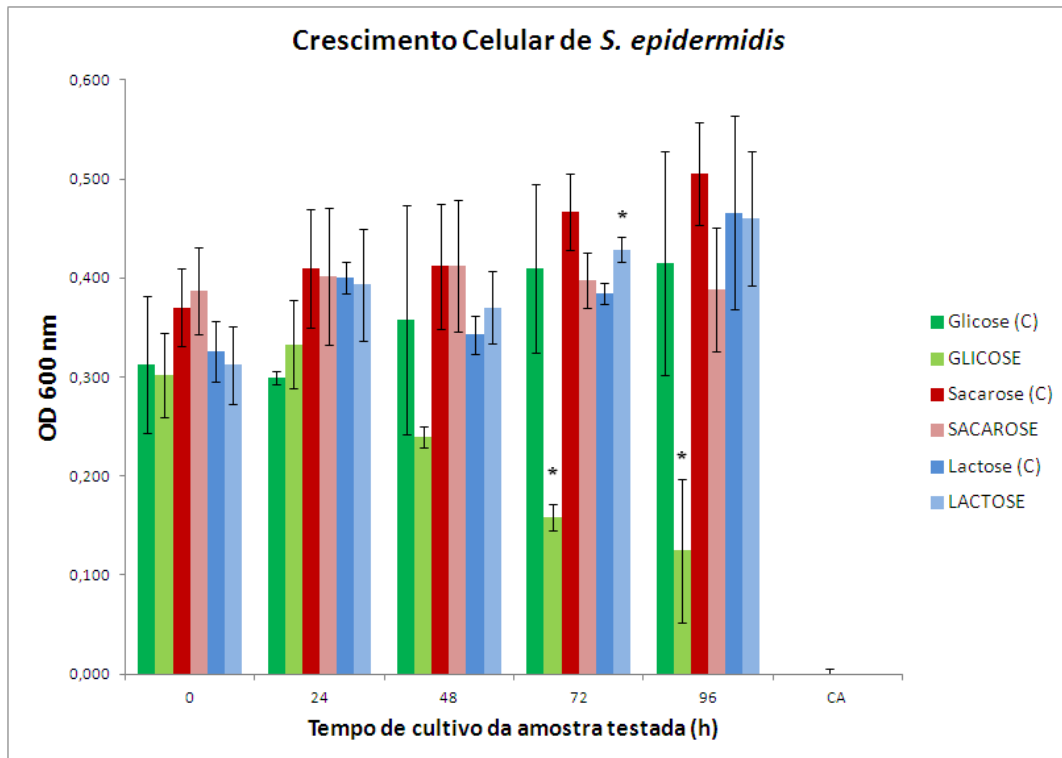


Figura 6 – Efeito dos filtrados do cultivo de *Microbacterium testaceum* GO18, obtidos em diferentes tempos e fontes de carbono, sobre o crescimento celular (OD 600nm) de *S. epidermidis*. (C) = indica o controle para cada tratamento. CA = rifampicina (8 µg ml). Os valores representam a média e o desvio padrão de 03 ensaios independentes. * indica diferença significativa em relação aos controles (C) (*teste-t* de Student, $p \leq 0,05$).

ANEXO 2

Instruções para autores do periódico Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

Disponível em: <http://memorias.ioc.fiocruz.br/instructions-to-authors> Acesso em: 26 de novembro de 2013

INTRUCTIONS TO AUTHORS

The manuscript should be prepared using standard word processing software and should be printed (font size 12) double-spaced throughout the text, figure captions, and references, with margins of at least 3 cm. The figures should come in the extension tiff, with a minimum resolution of 300 dpi. Tables and legends to figures must be submitted all together in a single file. Figures, must be uploaded separately as supplementary file.

The manuscript should be arranged in the following order:

Running title: with up to 40 characters (letters and spaces)

Title: with up to 250 characters

Author's names: without titles or graduations

Institutional affiliations: full address of the corresponding author only

Summary: up to 200 words (100 words in case of short communications). It should emphasize new and important aspects of the study or observations.

Key words: 3-6 items must be provided. Terms from the Medical Subject Headings (Mesh) list of Index Medicus should be used.

Sponsorships: indicating the sources of financial support and change of address.

Introduction: should set the purpose of the study, give a brief summary (not a review) of previous relevant works, and state what new advance has been made in the investigation. It should not include data or conclusions from the work being reported.

Materials and Methods: should briefly give clear and sufficient information to permit the study to be repeated by others. Standard techniques need only be referenced.

Ethics: when reporting experiments on human subjects, indicate whether the procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional or regional) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 1983. When reporting experiments on animals, indicate whether the institution's or a national research council's guide for, or any national law on the care and use of laboratory animals was followed.

Results: should be a concise account of the new information discovered, with the least personal judgement. Do not repeat in text all the data in the tables and illustrations.

In case of describing New Species, should follow:

Name of the new species, authors (when it is the case), sp. nov., (Figs x-y)
[Ex: *An. (Nyssorhynchus) atacamensis* González and Sallum, sp. nov. (Figs 1-4)]

Previous reference to the new species (when it is the case)
[Ex: *An. pictipennis* of Rueda et al. (2008): 448.]

Diagnosis (or Description; all stages are described);

Type host (when it is the case);

Site of Infection (when it is the case);

Type-locality;

Type data and depository;

Other material examined (when it is the case);

Distribution;

Host-parasite data (such prevalence and other important data, when it is the same case);

Bionomics;

Etymology;

Taxonomic discussion (or simply DISCUSSION as internal title).

Discussion: should be limited to the significance of the new information and relate the new findings to existing knowledge. Only unavoidable citations should be included.

Acknowledgements: should be short and concise, and restricted to those absolutely necessary.

References

Must be accurate. Only citations that appear in the text should be referenced. Unpublished papers, unless accepted for publication, should not be cited. Work accepted for publication should be referred to as "in press" and a letter of acceptance of the journal must be provided. Unpublished data should only be cited in the text as "unpublished observations", and a letter of permission from the author must be provided. The references at the end of the paper should be arranged in alphabetic order according to the surname of the first author. CLICK HERE [+]

THE TITLE OF JOURNALS

Should be abbreviated according to the style used in the Index Medicus. Consult: <http://www2.bg.am.poznan.pl/czasopisma/medicus.php?lang=eng>

In the text use authors' surname and date

Lutz (1910) or (Lutz 1910)

With two authors it is

(Lutz & Neiva 1912) or Lutz and Neiva (1912)

When there are more than two authors, only the first is mentioned

Lutz et al. (1910) or (Lutz et al. 1910).

AT THE END OF THE PAPER USE THE FOLLOWING STYLES**Journal article**

Chagas C, Villela E 1922. Forma cardiaca da tripanosomíase americana. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 14: 15-61.

Book and Thesis

Forattini OP 1973. *Entomologia Médica. Psychodidae, Phlebotominae, Leishmaniose, Bartonelose*, Vol. IV, Edgard Blucher, São Paulo, 658 pp.

Morel CM 1983. *Genes and Antigens of Parasites. A Laboratory Manual*, 2nd ed., Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, xxii + 580 pp.

Mello-Silva CC 2005. *Controle alternativo e alterações fisiológicas em Biomphalaria glabrata (Say, 1818), hospedeiro intermediário de Schistosoma mansoni Sambom, 1907 pela ação do látex de Euphorbia splendens var. hislopii N.E.B (Euphorbiaceae)*, PhD Thesis, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 85 pp.

Chapter in book

Cruz OG 1911. The prophylaxis of malaria in central and southern Brasil. In R Ross, *The Prevention of Malaria*, John Murray, London, p. 390-398.

Journal article on the Internet

Aboud S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. *Am J Nurs* [serial on the Internet]. 2002 Jun [cited 2002 Aug 12];102(6):[about 3 p.]. Available from:
<http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htm>

Monograph on the Internet

Foley KM, Gelband H, editors. Improving palliative care for cancer [monograph on the Internet]. Washington: National Academy Press; 2001 [cited 2002 Jul 9]. Available from:
<http://www.nap.edu/books/0309074029/html/>.

Homepage/Web site

Cancer-Pain.org [homepage on the Internet]. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc.; c2000-01 [updated 2002 May 16; cited 2002 Jul 9]. Available from:
<http://www.cancer-pain.org/>.

Part of a homepage/Web site

American Medical Association [homepage on the Internet]. Chicago: The Association; c1995-2002 [updated 2001 Aug 23; cited 2002 Aug 12]. AMA Office of Group Practice Liaison; [about 2 screens]. Available from: <http://www.ama-assn.org/ama/pub/category/1736.html>

DATABASE ON THE INTERNET

Open database

Who's Certified [database on the Internet]. Evanston (IL): The American Board of Medical Specialists. c2000 - [cited 2001 Mar 8]. Available from: <http://www.abms.org/newsearch.asp>

Closed database

Jablonski S. Online Multiple Congenital Anomaly/Mental Retardation (MCA/MR) Syndromes [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). c1999 [updated 2001 Nov 20; cited 2002 Aug 12]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/mesh/jablonski/syndrome_title.html

Part of a database on the Internet

MeSH Browser [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); 2002 - [cited 2003 Jun 10]. Meta-analysis; unique ID: D015201; [about 3 p.]. Available from: <http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html> Files updated weekly. Updated June 15, 2005

Figures and tables must be understandable without reference to the text

Figures: presented in tiff format with a minimum of 300 dpi and photographs must be sharply focused, well contrasted, and if mounted onto a plate, the figures should be numbered consecutively with Arabic numbers. Magnification must be indicated by a line or bar in the figure, and referenced, if necessary in the caption (e.g., bar = 1 mm). Plates and line figures should either fit one column (8 cm) or the full width (16.5 cm) of the page and should be shorter than the page length to allow inclusion of the legend. Letters and numbers on figures should be of a legible size upon reduction or printing. A colour photograph illustrates the cover of each issue of the Journal and authors are invited to submit illustrations with legends from their manuscript for consideration for the cover.

Tables: should supplement, not duplicate, the text and should be numbered with Roman numerals. A short descriptive title should appear above each table, with any explanations or footnotes (identified with a, b, c, etc.) below.

Technical Notes: Technical Notes should communicate rapidly single novel techniques or original technical advances. The entire note should occupy no more than three printed pages including figures and/or tables (it means around 10 double-spaced typed Word file maximum). The text must not be not divided into sections. Therefore, the state of art must be very briefly presented; results must be rapidly presented and discussed at a time. Complementary tables and figures may be published as supplementary data. References must be limited to few essential ones and cited at the end of the note, using the same format as in full papers. A brief summary and three key words must be provided.

Short communications: should communicate rapidly single results or techniques. They should occupy no more than three printed pages including figures and/or tables. They should not contain excessive references. References should be cited at the end of the paper using the same format as in full papers. A brief summary and three key words must be provided.

Alternative format: manuscripts may be submitted following the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" produced by the International Committee of Medical Journal Editors also known as the Vancouver Style. In this case, authors should follow the guidelines in the fifth edition (Annals of Internal Medicine 1997; 126: 36-47, or at the website <http://www.acponline.org/journals/resource/unifreqr/htm>) and will be responsible for

modifying the manuscript where it differs from the instructions given here, if the manuscript is accepted for publication.

Authors should also follow the Uniform Requirements for any guidelines that are omitted in these Instructions.

In case of clinical trials it's mandatory to inform the registration number of the REBEC platform.

A statement that the data/results of the manuscript are not plagiarism and have not been published elsewhere.

Once a paper is accepted for publication, the authors must provide:

Page charges: there will be no page charges.

Proofs: one set of page proofs will be supplied for the author to check for typesetting accuracy, to be returned by the stipulated date. No changes to the original manuscript will be allowed at this stage.