

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR E BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA MOLECULAR

Luiza Fichtner Aydos

**MICRO-ORGANISMOS MARINHOS COMO FONTE DE METABÓLITOS
BIOATIVOS: ATIVIDADE CONTRA BIOFILMES PATOGÊNICOS**

Porto Alegre

2016

Luiza Fichtner Aydos

**MICRO-ORGANISMOS MARINHOS COMO FONTE DE METABÓLITOS
BIOATIVOS: ATIVIDADE CONTRA BIOFILMES PATOGÊNICOS**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia com ênfase em Biotecnologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre José Macedo

Porto Alegre

2016

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biofilmes e Diversidade Microbiana localizado na UFRGS, com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Pró-Reitoria de Pesquisa da UFRGS.

AGRADECIMENTOS

À UFRGS, ao Centro de Biotecnologia e a todos os professores que contribuíram para minha formação; em especial ao professor Alexandre, pela oportunidade, motivação e confiança.

Aos meus colegas do Laboratório de Biofilmes e Diversidade Microbiana, pela parceria e companheirismo.

A minha família.

RESUMO

Biofilmes bacterianos são formados quando bactérias em um ambiente aquoso se aderem à uma superfície, biótica ou abiótica, formando uma comunidade embebida em uma matriz exopolissacarídica. Diferentemente do que ocorre com as células planctônicas, esse estilo de vida proporciona aos micro-organismos em biofilmes vantagens de sobrevivência, conferindo-lhes uma maior resistência a antibióticos, desinfetantes e ao sistema imune do hospedeiro. Isso resulta em uma maior persistência dessas bactérias e, conseqüentemente, no desenvolvimento de infecções. É estimado que 80 % das infecções humanas estejam associadas a biofilmes bacterianos, como, por exemplo, infecções relacionadas a dispositivos médicos. Considerando-se os prejuízos sociais e financeiros gerados por tais infecções, e a baixa disponibilidade de fármacos para inibir ou dispersar biofilmes bacterianos já formados, a busca por compostos capazes de inibir a formação ou erradicar biofilmes patogênicos se faz necessária. Organismos marinhos são conhecidos pela produção de compostos biologicamente ativos com diversas aplicações. Nesse contexto, esse estudo tem como objetivo a exploração do potencial biotecnológico marinho por meio da prospecção de compostos oriundos do metabolismo secundário de bactérias que apresentem atividade contra biofilme de dois micro-organismos de importância médica, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus epidermidis*. O rastreamento de atividade antibiofilme foi realizado com 23 bactérias previamente isoladas de esponjas do ambiente marinho da costa do Estado de Alagoas, Brasil. A metodologia empregada consistiu no cultivo dessas bactérias para a obtenção de filtrados brutos; para a análise de atividade antibiofilme desses filtrados, foram realizados ensaios de quantificação de crescimento bacteriano, de antif formação e de erradicação de biofilme das duas bactérias acima descritas. Dos 23 filtrados originados do cultivo dos isolados marinhos, dois demonstraram atividade contra biofilme de *P. aeruginosa*, com destaque para atividade de antif formação de biofilme. Esses resultados se mostram importantes uma vez que essa bactéria é uma forte formadora de biofilme e está envolvida em diversos processos patológicos.

Palavras-chave: Biofilme, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*

ABSTRACT

Bacterial biofilms are formed when bacteria adhere to a surface (biotic or abiotic) in an aqueous environment, forming a community embedded in an exopolysaccharide matrix. Unlike planktonic cells, this lifestyle provides survival advantages to microorganisms in biofilms, giving them greater resistance to antibiotics, disinfectants, and to the host immune system. This results in a greater persistence of these bacteria and so in the development of chronic infections. It is estimated that 80 % of human infections are associated with bacterial biofilms, such as infections related to medical devices. Considering the social and financial losses generated by such infections and the low availability of drugs to inhibit or disperse already formed bacterial biofilms, the search for compounds capable of inhibiting the formation or eradicate pathogenic biofilms is necessary. Marine organisms are known as producers of biologically active compounds with diverse applications. In this context, the main goal of this study is the exploration of the marine biotechnological potential by prospecting for compounds derived from the secondary metabolism of bacteria that present activity against biofilms of two microorganisms of medical importance, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*. The screening of antibiofilm activity was performed with 23 bacteria that were previously isolated from sponges from the marine environment of Alagoas state coast, Brazil. The method consisted in the cultivation of these bacteria to produce crude filtrates; quantitative analysis of bacterial growth, antibiofilm formation and biofilm eradication of the two bacteria above described were performed with the two crude filtrates. Two out of the 23 filtrates originated from the cultivation of the marine isolates exhibited antibiofilm activity against *P. aeruginosa* biofilm, mostly anti-biofilm formation activity. These are promising results since this bacterium is a strong biofilm former and is involved in several pathological processes.

Keywords: Biofilm, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*.

LISTA DE ABREVIATURAS

PNM	produto natural marinho
EPS	substância extracelular polimérica
QS	<i>quorum sensing</i>
QSI	inibidores do sistema QS
AI	autoindutor
AI-1	autoindutor-1
AI-2	autoindutor-2
AHL	N-acil homoserina lactona
AIP	peptídeo autoindutor
eDNA	DNA extracelular
FC	fibrose cística
UFC	unidade formadora de colônia
TSB	caldo soja tripticaseína
DO	densidade óptica

LISTA DE FIGURAS

Figura I: Estágios do desenvolvimento dos biofilmes	10
Figura II: A heterogeneidade populacional com variada atividade metabólica em uma microcolônia de biofilme	11
Figura III: Distribuição de metabólitos oriundos de bactérias marinhas por grupo taxonômico.....	19
Figura 1: Ensaios de atividade antibiótica e de antif formação de biofilme de <i>Staphylococcus epidermidis</i>	25
Figura 2: Ensaios de atividade de erradicação de biofilme de <i>Staphylococcus epidermidis</i>	26
Figura 3: Ensaios de atividade antibiótica e de antif formação de biofilme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27
Figura 4: Ensaios de atividade de erradicação de biofilme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.2 BIOFILMES MICROBIANOS	9
1.3 BIOFILME DE <i>Staphylococcus epidermidis</i>	12
1.4 BIOFILME DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
1.5 ESTRATÉGIAS ANTIBIOFILME	15
1.5 O AMBIENTE MARINHO	16
2 JUSTIFICATIVA	20
3 OBJETIVOS	21
3.1 OBJETIVO GERAL	21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
4 METODOLOGIA	22
4.1 ISOLADOS BACTERIANOS MARINHOS	22
4.2 PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	22
4.3 CONDIÇÕES DE CULTURA DAS CEPAS BACTERIANAS	22
4.4 ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIBIOFILME E ANTIBIÓTICA	23
4.4.1 ENSAIOS DE ATIVIDADE DE ANTIFORMAÇÃO DE BIOFILME E ANTIBIÓTICA	23
4.4.2 ENSAIOS DE ATIVIDADE DE ERRADICAÇÃO DE BIOFILME	24
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	24
5 RESULTADOS	25
5.1 RASTREAMENTO DE ATIVIDADE ANTIBIOFILME CONTRA BIOFILME DE <i>Staphylococcus epidermidis</i>	25
5.2 RASTREAMENTO DE ATIVIDADE ANTIBIOFILME CONTRA BIOFILME DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26
6 DISCUSSÃO	28
7 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	33
8 BIBLIOGRAFIA	35

1 INTRODUÇÃO

1.1 Biofilmes microbianos

Biofilme microbiano pode ser definido como um estilo de vida onde as células se encontram aderidas a uma superfície, biótica ou abiótica, e embebidas em uma matriz exopolissacarídica que é por elas próprias produzida (Donlan & Costerton, 2002; Høiby et al., 2010). Essa matriz é composta por substâncias conhecidas como substâncias poliméricas extracelulares (EPS), como polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídios. A produção de EPS favorece interações entre as células, mediando a adesão dessas às superfícies, e proporcionando estabilidade mecânica e coesividade ao biofilme, (Flemming & Wingender, 2010). Parte majoritária, cerca de 90 %, da massa seca dos biofilmes corresponde à matriz exopolissacarídica (Flemming et al., 2010; Blackledge et al., 2013).

O desenvolvimento do biofilme começa pelo processo de adesão das células à superfície que consiste num processo dinâmico e bifásico, dividido em adesão reversível e adesão irreversível. A primeira se baseia na interação dos micro-organismos com a superfície a ser colonizada por meio de interações físico-químicas como forças de Van der Waals, Ligações de Hidrogênio e de cargas, portanto, essa fase é dependente das propriedades físico-químicas da superfície (Francolini & Donelli, 2010). O processo de adesão é acionado por meio da expressão de genes que controlam a produção de componentes bacterianos necessários para a adesão e formação de biofilme. (Donlan & Costerton 2002). Em seguida, a etapa de adesão irreversível é caracterizada pela elevada produção de EPS (O'Toole, 2000). A terceira etapa consiste em algumas áreas do biofilme sendo dissolvida, na qual bactérias de vida livre são liberadas para a colonização de novos sítios e assim, novos biofilmes podem ser formados (Høiby et al., 2010). Quando as fontes de nutrientes estão mais escassas, bactérias se desprendem da estrutura biofilme e se tornam planctônicas, o que sugere que a depleção de nutrientes é um gatilho para a procura de um ambiente mais propício para colonização (Jefferson, 2004). Os estágios de desenvolvimento dos biofilmes estão representados na Figura II.

O processo de formação de biofilme está intrinsecamente ligado ao processo de *quorum sensing* (QS) (Blackledge et al., 2013). *Quorum sensing* é um sistema que permite que as células

bacterianas monitorarem a densidade populacional por meio da concentração de pequenas moléculas sinalizadoras. A partir da percepção dessas moléculas, as bactérias coordenam sua expressão gênica, que varia de acordo com as necessidades ambientais (Federle & Bassler, 2003). O QS modula a expressão de genes relacionados com a produção de enzimas, fatores de virulência e de metabólitos, permitindo que os micro-organismos sésseis respondam a mudanças ambientais de maneira mais específica (Jolivet-Gougeon & Bonnaure-Mallet; Francolini & Donelli, 2010). As moléculas sinalizadoras são moléculas difusíveis chamadas de autoindutoras (AI). A AI mais conhecida é o autoindutora-1 (AI-1), que consiste numa N-acil homoserina lactona (AHL). AS AHLs estão presentes apenas em bactérias gram-negativas. Já nas bactérias gram-positivas, as moléculas QS são pequenos peptídeos derivados do processamento pós-traducional de proteínas, conhecidos como peptídeos autoindutores (AIPs) (Macedo & Abraham, 2009). A molécula autoindutora-2 (AI-2) é produzida e detectada por um número diverso de bactérias, o que significa que bactérias têm uma maneira de identificar a densidade celular de outras espécies na comunidade microbiana. (Federle & Bassler, 2003). A comunicação celular é essencial para iniciar a formação e manter o biofilme. Quando uma certa concentração de AI é atingida, as células bacterianas se aderem à superfície, formando o biofilme e produzindo fatores de virulência (Macedo & Abraham, 2009).

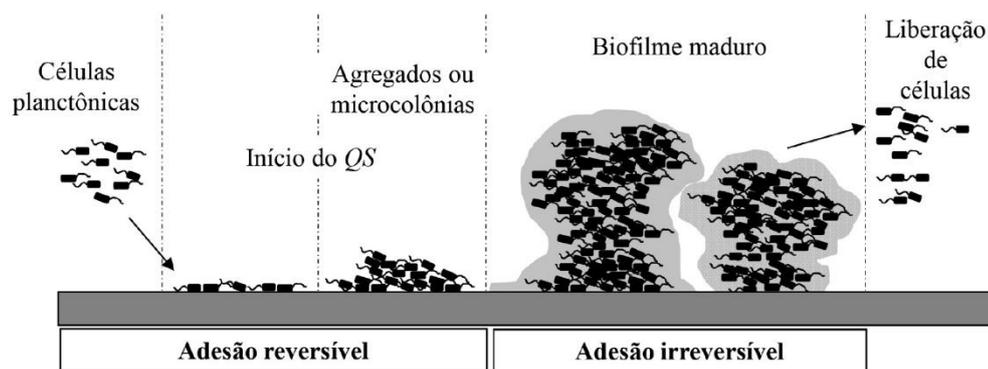


Figura I: Estágios do desenvolvimento dos biofilmes. Adesão reversível com a formação de microcolônias, a adesão irreversível com a produção de EPS e formação de estruturas com formato típico de cogumelos e por fim a ruptura dos biofilmes. Trentin et al., 2013.

As células em biofilme também apresentam diferenças fenotípicas em relação à transcrição gênica e à taxa de crescimento quando comparadas às células de vida livre (Donlan & Costerton, 2002). Em biofilmes, mais de 20 % dos genes estão diferencialmente expressos,

inclusive genes de proteção contra fatores de estresses ambientais (Estrela et al., 2009). Diferentemente do que ocorre com as células planctônicas, esse estilo de vida oferece aos micro-organismos em biofilmes vantagens de sobrevivência, conferindo-lhes uma maior resistência a antibióticos, a desinfetantes e ao sistema imune do hospedeiro. Isso resulta em uma maior persistência dessas bactérias e, conseqüentemente, no desenvolvimento de infecções crônicas (Høiby et al., 2010). Devido a uma combinação de fatores, os biofilmes apresentam tolerância a agentes antimicrobianos de 10 a 1000 vezes maior quando comparado à de células de vida livre (Jefferson, 2004; Pletzer, 2016). Primeiramente, há uma dificuldade de penetração e difusão do agente antimicrobiano devido a barreira física imposta pela existência da EPS (Donlan & Costerton 2002). Além disso, no biofilme, há a formação das chamadas células dormentes, ou *persisters* (Figura III). Tendo em vista que essas células se encontram na base do biofilme, onde há uma baixa disponibilidade de oxigênio e conseqüentemente uma taxa de crescimento alterada devido ao metabolismo reduzido, elas possuem elevada resistência a agentes antimicrobianos, já que esses normalmente agem no crescimento bacteriano. (Jolivet-Gougeon & Bonnaure-Mallet, 2014). Outro fato que corrobora para explicar a facilidade das bactérias em biofilmes se tornarem resistentes a fármacos é que a frequência de mutação entre esses micro-organismos é mais elevada quando comparada à frequência de mutação de micro-organismos de vida livre, devido a maior transmissão horizontal de genes por meio da troca de plasmídios (Jefferson, 2004).

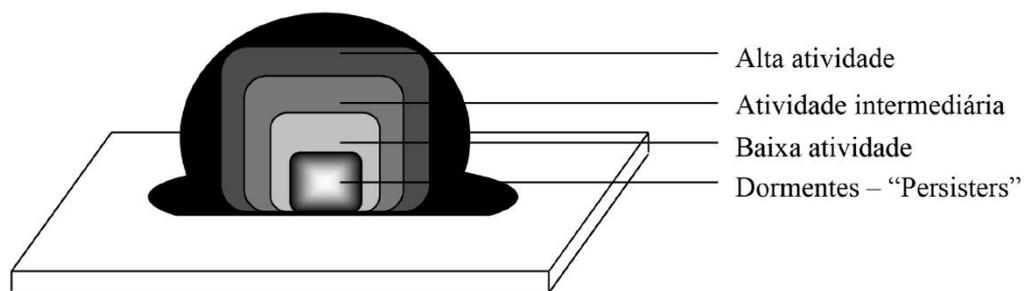


Figura II: A heterogeneidade populacional com variada atividade metabólica em uma microcolônia de biofilme. No interior, a presença de células em estado de latência metabólica; no topo do biofilme, as células que apresentam alta atividade metabólica. Trentin et al., 2013.

Biofilmes podem ser multiespécie ou serem formados por uma única espécie. Biofilmes de espécie única predominam numa variedade de condições infecciosas e na superfície de

dispositivos médicos. *Staphylococcus epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa* são exemplos de bactérias formadoras de biofilme que estão relacionadas a infecções humanas (O'Toole, 2000). É estimado que 80 % das infecções humanas estejam associadas a biofilmes bacterianos (Department of Health and Human Services, 2007). Dentre essas infecções, estão as relacionadas a dispositivos médicos, como cateteres intravasculares e urinários e implantes, e a condições como a Fibrose Cística (Francolini & Donelli, 2010; Donlan & Costerton, 2002). De acordo com o Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças (ECDC), estima-se que anualmente 4.100.00 de pacientes adquirem infecções hospitalares e que o número de mortes relacionadas diretamente a essas infecções seja de pelo menos 37.000 pessoas (ECDC, 2008). As infecções relacionadas a biofilmes podem persistir por um longo período, prolongando a estadia dos pacientes em hospitais. Se a infecção for relacionada a algum dispositivo médico, pode ser necessário a remoção ou a troca desse; portanto, biofilmes patogênicos não são apenas prejudiciais à saúde, mas também causam um considerável aumento de custos sanitários (Wu et al., 2015).

1.2 Biofilme de *Staphylococcus epidermidis*

Staphylococcus é um gênero de bactérias gram-positivas. A bactéria *S. epidermidis* pertence ao grupo de *Staphylococcus* coagulase-negativa (CoNS), sendo caracterizada como uma bactéria comensal, encontrada normalmente na pele e mucosas humanas, e como um patógeno oportunista (Mack et al., 2006; Otto, 2008; Becker et al., 2014). Devido a sua habilidade de formar biofilme, ela facilmente coloniza o ambiente hospitalar, sendo considerada como uma das maiores causas de infecções hospitalares (Gutiérrez et al., 2012; Riool et al., 2014). Além disso, há indícios de que quando essa bactéria é exposta a concentrações subinibitórias de antibióticos, fato recorrente na clínica, a formação de biofilme é induzida (Doroshenko, 2014). A formação de biofilme de *S. epidermidis* também está relacionada à maioria das infecções persistentes em implantes ortopédicos (Gallo et al., 2014).

No processo de adesão, a interação entre as células bacterianas e a superfície é mediada por diversos fatores, incluindo proteínas de superfície, proteínas extracelulares, adesinas, e autolisina, proteína localizada na superfície celular. Na fase acumulativa de formação de biofilme, o operon *ica* tem as adesinas como produto gênico, sendo sua expressão regulada por

fatores ambientais (O'tolle *et al.*, 2000; Otto, 2012). A adesina intracelular polissacarídica (PIA) ou poli-N-acetil glicosamina (PNAG) é o componente mais abundante da matriz EPS (Doroshenko *et al.*, 2014). *Staphylococcus epidermidis* também pode estabelecer a formação de biofilme por meio de um mecanismo PIA-independente, que consiste no uso da proteína de ligação da matriz extracelular (Embp) e na liberação de DNA extracelular (eDNA). A produção do eDNA em *S. epidermidis* é controlada principalmente pela autolisina AtlE (Otto, 2014; Doroshenko *et al.*, 2014). Além disso, *S. epidermidis* contém proteínas chamadas de MSCRAMMs (moléculas adesivas da matriz reconhecedoras de componentes da superfície microbiana) que são importantes para a adesão das células bacterianas a superfícies abióticas, como cateteres, e a superfícies bióticas, como fibrogênio ou fibronectina humanos (Otto, 2008).

O processo de dispersão de biofilme de *S. epidermidis* ainda não está bem elucidado, sabe-se que o QS está envolvido no controle, por meio do sistema *agr* (Otto, 2009). O Sistema *agr* é capaz de reconhecer a concentração de um peptídeo regulatório específico, e, quando esse sistema é ativado, a síntese de proteínas associadas a parede celular e de proteínas da matriz é inibida, enquanto a síntese de toxinas é induzida, portanto, a expressão do locus *agr* implica na inibição da formação de biofilme (Mack *et al.*, 2006).

1.3 Biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria gram-negativa que é considerada um patógeno oportunista. Essa bactéria é capaz de causar tanto infecções agudas quanto crônicas, *P. aeruginosa* possui alta resistência a antibióticos e forte habilidade de formar biofilmes (Mai-Prochnow *et al.*, 2015) sendo, juntamente com *S. epidermidis*, uma das principais causas de infecções hospitalares (Taylor, 2014; Allen *et al.*, 2014). *Pseudomonas aeruginosa* é notoriamente conhecida por causar infecções crônicas nos pulmões de pessoas acometidas com fibrose cística (FC) (Rybtke *et al.*, 2015).

Fibrose cística é uma condição genética autossômica recessiva que tem como algumas das consequências fenotípicas, a hiperinsuflação pulmonar e a redução da eficiência da função mucociliar. Como resultado, a colonização bacteriana é favorecida, com destaque para colonização de *P. aeruginosa* e a consequente formação de biofilme. FC é a condição genética

mais letal em caucasianos (Tolker-Nielsen, 2014). Mesmo com tratamento agressivo com antibióticos, a *P. aeruginosa* prevalece nos pulmões dos pacientes devido à habilidade de formar biofilmes, gerando infecções persistentes que podem levar os acometidos a óbito. (Taylor, 2014 Tolker-Nielsen, 2014; Rybtke et al., 2015). De acordo com a *Cystic Fibrosis Foundation* (Estados Unidos), cerca de 80 % dos pacientes com mais de 18 anos de idade são reinfectados por *P. aeruginosa*.

O principal mecanismo de aderência de *P. aeruginosa* consiste na ação do pili do tipo IV e de fímbrias. Ambos são componentes bacterianos que fazem parte da matriz, exercendo papel na adesão das células bacterianas, tanto para adesão inicial por meio das interações célula-superfície quanto para a formação de microcolônias (Taylor 2014; Rasamiravaka et al., 2015; Tolker-Nielsen, 2014). A *P. aeruginosa* produz ao menos três polissacarídeos que são importantes para a estabilidade da estrutura do biofilme e conferem diferentes propriedades fisiológicas à matriz. São eles, alginato, Pel e Psl. Os polissacarídeos Pel e Psl funcionam como um esqueleto para a formação do biofilme e estão envolvidos nos estágios iniciais da formação, já o alginato, contribui para a estabilidade estrutural, para a proteção e para a retenção de água e nutrientes (Rasamiravaka et al., 2015; Cutruzzolà & Frankenberg-Dinkel 2016).

Dentre os sistemas envolvidos na formação de biofilme de *P. aeruginosa* estão o sistema QS e o sistema de dois componentes GacS/GacA e RetS/LadS, além da produção e regulação de moléculas mensageiras secundárias (Rasamiravaka et al., 2015). O sistema de dois componentes está relacionado com a regulação da produção de componentes da matriz, o GacA/GacS é o sistema mais estudado e uma de suas funções é regular a expressão de Pel e Psl (Rybtke et al., 2015). *Pseudomonas aeruginosa* exhibe três sistemas interconectados de QS (Tolker-Nielsen, 2014). Os dois principais sistemas de QS em *P. aeruginosa* são o *las* e *rhl*. Esses sistemas estão envolvidos com a produção e a percepção de moléculas autoindutoras, as AHLs. Portanto, a ativação desses sistemas é importante para a formação do biofilme microbiano. Um terceiro sistema de QS, o PQS, é baseado no sinal de quinolona de pseudomonas (PQS), esses sinais interagem de forma complexa com AHLs. A ativação do sistema PQS está ligada à liberação de eDNA durante o desenvolvimento do biofilme (Rasamiravaka et al., 2015). A mudança do estilo de vida livre para o sésil é controlado por níveis intracelulares do mensageiro secundário c-di-GMP. Os níveis de c-di-GMP podem mediar tanto a dispersão quanto a formação de biofilme; níveis elevados desse mensageiro

promove a formação, e baixos níveis levam a dispersão (Cutruzzolà & Frankenberg-Dinkel 2016).

1.4 Estratégias antibiofilme

Uma vez que os micro-organismos organizados em biofilmes apresentam menor susceptibilidade a agentes antimicrobianos, essas infecções tornam-se difíceis de se tratar com a antibioticoterapia atualmente disponível (O'Toole et al., 2010). Portanto, a persistência de biofilmes patogênicos possui, além de implicações clínicas, implicações sociais e financeiras, havendo a necessidade de desenvolvimento de novas estratégias de combate a essas infecções. De maneira geral, as estratégias de tratamento antibiofilme devem focar nas três principais etapas de formação desses, portanto, na inibição da adesão bacteriana na superfície a ser colonizada, na interferência de moléculas sinalizadoras que modulam o desenvolvimento do biofilme e na erradicação do biofilme já formado (Francolini & Donelli, 2010).

Visando a antifirmação de biofilme, o desenvolvimento de superfícies anti-infectivas, principalmente em dispositivos médicos e implantes, se mostra como uma alternativa. Essas superfícies consistem em superfícies recobertas com moléculas ativas (Estrela et al., 2009). Ou, por exemplo, o recobrimento da superfície com polímeros hidrofóbicos, para evitar a colonização de micro-organismos ou o crescimento de organismos já aderidos (Francolini & Donelli, 2010). Outra maneira de controlar a adesão bacteriana seria por meio da utilização de pilicidas, que causariam a inibição da formação do pili, estrutura responsável pela adesão das células bacterianas que é encontrada tanto em bactérias gram-positivas quanto em bactérias gram-negativas (Macedo & Abraham, 2009).

A identificação de compostos naturais ou desenvolvimento de compostos sintéticos que interfiram no processo de comunicação celular intra e interespecie é uma alternativa promissora para combater biofilmes (Federle & Bassler, 2003). Ao se combinar moléculas que atuam por meio da interferência do sistema QS, como compostos inibidores do sistema QS (QSI), com agentes antimicrobianos, haveria, possivelmente, uma maior eficiência nos tratamentos e, conseqüentemente, uma redução de custos totais (Jolivet-Gougeon & Bonnaure-Mallet, 2014). Peptídeos antibiofilme têm se mostrado como uma abordagem para tratar infecções

relacionadas a biofilmes, pois além de possuírem um amplo espectro de atividade, eles mostram ter efeitos sinérgicos com alguns antibióticos. O mecanismo de ação desses se baseia na interferência da ação de moléculas mensageiras secundárias, moléculas que controlam vias de sinalização tanto em bactérias gram-positivas quanto em bactérias gram-negativas (Pletzer, 2016).

Já para o processo de erradicação de biofilme, se busca destruir a integridade da matriz, a barreira protetiva dos biofilmes, tipicamente por degradação enzimática de seus componentes. A erradicação acarretaria num desprendimento das bactérias do biofilme, levando ao processo de dispersão. Desse modo, a estrutura tridimensional do biofilme seria danificada e as células microbianas ficariam expostas a antibióticos (Blackledge et al., 2013).

Por fim, compostos que inibam a virulência e que não afetem o crescimento microbiano são os mais atrativos, essa estratégia visa evitar uma pressão seletiva para o desenvolvimento de mutações relacionadas à resistência de antibióticos (Macedo & Abraham, 2009; Papa et al., 2013). Sugere-se que o para um tratamento eficiente contra biofilmes uma abordagem multidisciplinar seja aplicada, como a administração combinada de agentes antimicrobianos e de QSI, além de agentes que inibiam a adesão celular bacteriana ou estimulem a dispersão de biofilme (Macedo & Abraham, 2009; Wu et al., 2015).

1.5 O ambiente marinho

Os oceanos possuem uma enorme biodiversidade, eles abrangem 24 dos 26 filos da vida, com cerca de 300 mil espécies descritas. É estimado que esse número seja apenas uma pequena fração do número total de espécies que ainda não foram descobertas (Pomponi, 1999; National Research Council, 2002). Os micro-organismos marinhos compõe a maior fração da diversidade dos oceanos, correspondendo a mais de 90 % da biomassa marinha (Hill et al., 2010). Como parte de um processo de adaptação para a sobrevivência, os espaços internos de animais e plantas, além das superfícies, servem como um ambiente de colonização para os micro-organismos. Dentre os micro-organismos marinhos mais encontrados, estão as bactérias e os fungos (Fenical, 2002), sendo ambos considerados como uma extensa reserva de diversidade genética e funcional devido a produção de compostos bioativos. (Dionisi et al., 2012).

Tendo em vista que ainda há muitas espécies a serem descobertas, uma vez que menos de 1 % do total de espécies microbianas marinhas podem ser cultivadas em condições de laboratório, cerca de 99 % dos micro-organismos do oceano ainda não foram estudados (Li et al., 2006). Do baixo número de organismos marinhos, principalmente de micro-organismos, que foram explorados visando aplicações comerciais, já foram produzidos mais de 12 mil compostos químicos (Faulkner, 2001). Muitos desses compostos possuem estruturas que não tinham sido reconhecidas por químicos como tendo potencial farmacológico (Jordan & Wilson, 2002). Esses compostos demonstram um amplo espectro de aplicações, desde aplicações ambientais a biomédicas. Como, por exemplo, utilização desses como fármacos, suplementos nutricionais, cosméticos, agroquímicos, sondas moleculares e enzimas (Pomponi, 1999; Schweder et al., 2005).

No contexto biomédico, a biotecnologia marinha se mostra uma alternativa muito interessante por meio da bioprospecção, termo definido como a coleta de pequenas amostras de material biológico visando o rastreamento de compostos biologicamente ativos com potencial de exploração econômica ou atributos como informação genética (Radjasa, 2013). Há uma constante necessidade de descoberta de novos compostos bioativos que possuam diversas atividades. Dentre elas, anticâncer, anti-HIV, anti-inflamatória, antiparasítica, antimicrobiana e antibiofilme, já que atualmente não há fármacos disponíveis que possuam determinadas propriedades, e que há a ocorrência de doenças causadas por micro-organismos resistentes a múltiplos fármacos (Amarendra et al., 2013). As características ambientais do ecossistema marinho, como alta concentração salina, alta pressão, baixa disponibilidade de nutrientes e temperatura e pH extremos, além de esse ser um ambiente extremamente competitivo, fazem dele um ambiente propício para a bioprospecção (Himaya & Kim, 2013). Dessa forma, os micro-organismos que nele habitam desenvolveram vias metabólicas únicas para a adaptação nesse ambiente, sendo considerados como potenciais fontes de metabólitos secundários bioativos (Kennedy et al., 2011; Pramanik et al., 2013). Além disso, o fato de que micro-organismos são os organismos mais abundantes nos oceanos, dado que eles podem alcançar densidades de mais de 10 mil células por cm^3 de água, corrobora com a exploração e descoberta de fármacos (Fenical, 2002).

De modo geral, os produtos naturais marinhos (PNMs) (Sims et al., 1971) isolados são na sua maioria metabólitos secundários, compostos que englobam uma série de moléculas que são geradas em certas condições do crescimento microbiano. Essas moléculas não são

diretamente necessárias para o crescimento e desenvolvimento do micro-organismo produtor, contudo, estão envolvidas com a defesa e a sobrevivência desse organismo, e com fenômenos de comunicação interespecie (Banaigs et al, 2014). Esses metabólitos podem exercer importantes papéis na nossa sociedade devido a potencial a atividade farmacológica (Demain, 1998, Gandelman et al., 2014). Um número considerável de moléculas isoladas de diferentes organismos marinhos (bactérias, fungos, algas, invertebrados e vertebrados) estão sob fase de estudo ou de testes clínicos, e, inclusive, no mercado como fármacos (Bourguet-Kondracki & Kornprobst, 2005). Na década de 50, as primeiras moléculas sintéticas de origem marinha entraram no mercado, o agente antiviral ara-A e o agente antitumoral ara-C (Pomponi 1999; Schweder et al., 2005; Bourguet-Kondracki & Kornprobst, 2005). Como exemplo mais atual, está o agente antitumoral Yondelis, no qual o composto ativo descoberto, trabectedina, foi isolado de um animal invertebrado. Porém, estudos posteriores indicam que esse composto é provavelmente produzido por um micro-organismo simbiote desse animal. (Egan et al., 2008; Rath et al., 2011).

Esponjas marinhas são organismos sésseis que apresentam uma variedade de micro-organismos a elas associados, estima-se que de 40 a 60 % da biomassa desse organismo corresponda a comunidades microbianas (Hill et al., 2010). As esponjas são animais invertebrados que se alimentam por meio de filtração e, ao bombearem grandes volumes de água para seu interior, por meio do sistema aquífero, elas captam também bactérias da água ao redor, e, conseqüentemente, essas bactérias podem passar a fazer parte da microbiota desse organismo. As esponjas estão constantemente expostas a situações potencialmente nocivas, desse modo, os micro-organismos a elas associados exercem um papel de defesa química contra a predação por meio da produção de metabólitos e toxinas (Li et al., 2006; Sipkema et al., 2005; Amarendra et al., 2013). Portanto, é sugerido que esse processo seja uma característica da biologia das esponjas e que elas evoluíram juntamente com os simbioses microbianos (Kennedy et al., 2007). Essa relação prove vantagens para ambos, visto que os micro-organismos satisfazem suas necessidades energéticas (Hill et al., 2010).

Grande parte dos compostos marinhos que foram rastreados e elucidados com sucesso são, na sua maioria, originados de micro-organismos, com destaque para compostos de origem bacteriana (Schweder et al., 2005). Inclusive, os PNMs isolados de invertebrados marinhos, como esponjas, são frequentemente produzidos pelos micro-organismos a elas associados, principalmente, por bactérias (Gulder & Moore, 2009; Radjasa, 2013).

Bactérias marinhas produtoras de metabólitos com atividade antimicrobiana pertencem a diferentes grupos taxonômicos, a distribuição desses está representada na Figura I. Actinobactérias são consideradas como o grupo produtor de metabólitos secundários mais relevante do ponto de vista da indústria farmacêutica (Manivasagan et al., 2015). Por fim, fica evidenciado o grande potencial biotecnológico do ambiente marinho e dos micro-organismos que nele habitam.

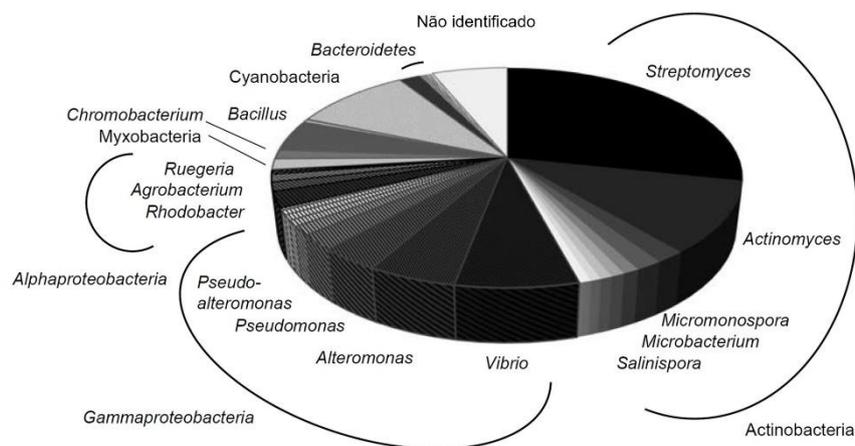


Figura III: Distribuição de metabólitos oriundos de bactérias marinhas por grupo taxonômico. Bactérias marinhas produtoras de antibióticos são encontradas em diversos grupos taxonômicos, com destaque para antibióticos originados de actinomicetos, em particular *Streptomyces* spp. (Adaptado de Wietz et al., 2013).

1 JUSTIFICATIVA

Considerando a grande prevalência de infecções relacionadas a biofilmes e a crescente resistência a agentes antimicrobianos dos micro-organismos com elas envolvidos, há uma necessidade de caráter emergencial para o desenvolvimento de novas abordagens de combate a micro-organismos patogênicos. Além disso, com o avanço da ciência, com destaque para as áreas biomédicas, cada vez mais dispositivos médicos, como implantes, são utilizados e necessários. Como consequência, as infecções de biofilmes bacterianos nesses materiais se tornam mais frequentes.

Portanto, devido às implicações sociais e financeiras geradas por infecções relacionadas a biofilmes bacterianos, e a baixa disponibilidade de fármacos para inibir ou dispersar esses, a busca por compostos capazes de inibir a formação ou erradicar biofilmes patogênicos é imprescindível. Nesse contexto, tendo em vista o potencial biotecnológico dos oceanos, os micro-organismos marinhos associados a esponjas se mostram como fontes promissoras de metabólitos secundários que apresentem atividade antibiofilme.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo consiste em realizar a prospecção de moléculas provenientes do metabolismo secundário de bactérias previamente isoladas do ambiente marinho que demonstrem atividade contra biofilmes patogênicos.

3.2 Objetivos específicos

- I. Rastreamento de atividades de antiformação e de erradicação de biofilme em coleção de micro-organismos provenientes do ambiente marinho contra dois micro-organismos de importância médica, *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 35984);
- II. Avaliação da atividade antibiótica dos metabólitos produzidos.

4 METODOLOGIA

4.1 Isolados bacterianos marinhos

Neste trabalho foi estudada uma coleção de 23 bactérias previamente isoladas de esponjas do ambiente marinho da costa do Estado de Alagoas, Brasil. O Alagoas localiza-se na região nordeste brasileira e possui uma costa com cerca de 230 km de extensão (Correia, 2011).

4.2 Produção de metabólitos secundários

A produção de metabólitos secundários foi realizada em meio marinho líquido (Difco, EUA) em agitador orbital sob temperatura controlada. Para tal, os isolados a serem avaliados foram semeados em meio marinho sólido e incubados durante a noite a 30 °C. Após o período de incubação, foi feita uma suspensão bacteriana em solução salina estéril a 0,9 % (DO₆₀₀ = 0,500), da qual 1 mL foi adicionado a 100 mL do meio de cultivo líquido em frascos de 250 mL. Os frascos foram incubados por 96 h a 25 °C e 180 rpm. Ao final da incubação, os cultivos microbianos foram centrifugados por 50 minutos a 10.000 rpm e os sobrenadantes foram esterilizados por filtração utilizando-se membrana de 0,2 µm (Sartorius, Alemanha). O rastreamento de atividade antibiofilme foi realizado avaliando-se os filtrados gerados nesta última etapa.

4.3 Condições de cultura das cepas bacterianas

Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 35984) foram cultivadas em meio sólido Mueller Hinton (MH) (Oxoid Ltd., Inglaterra) durante a noite, a 37 °C. Para a realização dos ensaios foi usada uma suspensão bacteriana em solução salina estéril a 0,9 %, o que corresponde a 1 escala de McFarland (3×10^8 UFC/mL).

4.4 Ensaios de atividade antibiofilme e antibiótica

Para avaliação de atividade antibiofilme dos filtrados, foram realizados ensaios de antiformação e de erradicação de biofilme das duas bactérias alvo, *S. epidermidis* e *P. aeruginosa*. Esses ensaios foram realizados conforme descrito por Stepanovic *et al.* (2007), com algumas modificações.

4.4.1 Ensaios de atividade de antiformação de biofilme e antibiótica

Em placas de 96 poços (Costar clear, Corning Inc., EUA) foram adicionados 40 µL de meio de TSB, 80 µL do filtrado produzido a partir do cultivo de isolado marinho a ser avaliado e 80 µL da suspensão bacteriana (*S. epidermidis* ou *P. aeruginosa*). Para a realização desses ensaios, as bactérias alvo foram semeadas conforme descrito no item 4.3. Juntamente com os tratamentos, foram analisados controle do meio de cultivo utilizado na produção, controle de crescimento e controle antibiótico (rifampicina ou gentamicina 20 µL/mL). O crescimento bacteriano foi avaliado pela diferença entre a leitura da densidade óptica (DO) a 600 nm após 24 horas de incubação a 37 °C e a DO₆₀₀ após o preparo da placa (t = 0). Já para a avaliação da atividade de antiformação de antibiofilme, foi utilizado a técnica de coloração com cristal violeta. Para tal, as placas foram lavadas com solução salina 0,9 % e essas foram incubadas por 1 hora a 60 °C visando a fixação do biofilme. Após a incubação, as placas foram coradas com cristal violeta, lavadas em água e o corante aderido solubilizado com etanol absoluto. As leituras das placas foram realizadas a 570 nm, mensurando-se a formação de biofilme. Valores obtidos por meio da medição da densidade óptica superiores a 100 % representam um estímulo do crescimento bacteriano ou de formação de biofilme, quando comparado às amostras controle. As amostras controle (sem suspensão bacteriana) foram submetidas ao mesmo procedimento descrito no item 4.2. Para os poços de controle de esterilidade do experimento, a suspensão bacteriana foi substituída por apenas salina.

4.4.2 Ensaios de atividade de erradicação de biofilme

Em placas de 96 poços, foram adicionados 40 µL de TSB, 80 µL da suspensão bacteriana (item 4.3) e 80 µL de água Milli-Q estéril. As placas foram incubadas por 24 h a 37 °C visando a formação de biofilme. Após a incubação, o conteúdo dos poços foi retirado e ao biofilme aderido foram adicionados 40 µL de TSB, 80 µL do filtrado a ser avaliado e 80 µL de água Milli-Q. Da mesma maneira que na realização do ensaio de antiformação de biofilme, além dos tratamentos com os filtrados, foram avaliados, o controle do meio de cultivo utilizado na produção, controle de crescimento, e controle antibiótico. A atividade de erradicação foi avaliada pela técnica de coloração com cristal violeta, onde o biofilme remanescente após o tratamento foi mensurado a 570 nm. Valores obtidos por meio da medição da densidade óptica superiores a 100 % representam um estímulo para a formação de biofilme, quando comparado às amostras controle.

4.5 Análise estatística

Os ensaios de atividade antibiofilme foram realizados ao menos em duplicata, os dados estão representados como percentagem média \pm desvio padrão. As diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste t de Student ($p \leq 0,05$ foi considerado significativo).

5 RESULTADOS

5.1 Rastreamento de atividade antibiofilme contra biofilme de *Staphylococcus epidermidis*

A habilidade dos filtrados obtidos a partir do cultivo dos isolados marinhos de inibir o crescimento de *Staphylococcus epidermidis* e de inibir a formação de biofilme desse micro-organismo está representado na Figura 1. Nenhum dos 23 filtrados avaliados mostrou atividade de antiformação de biofilme contra biofilme de *S. epidermidis*, nem capacidade de inibir o crescimento desta bactéria de maneira significativa. A capacidade de erradicar o biofilme de *S. epidermidis* já formado também foi avaliada, não foi encontrada atividade de erradicação dentre os filtrados testados (Figura 2).

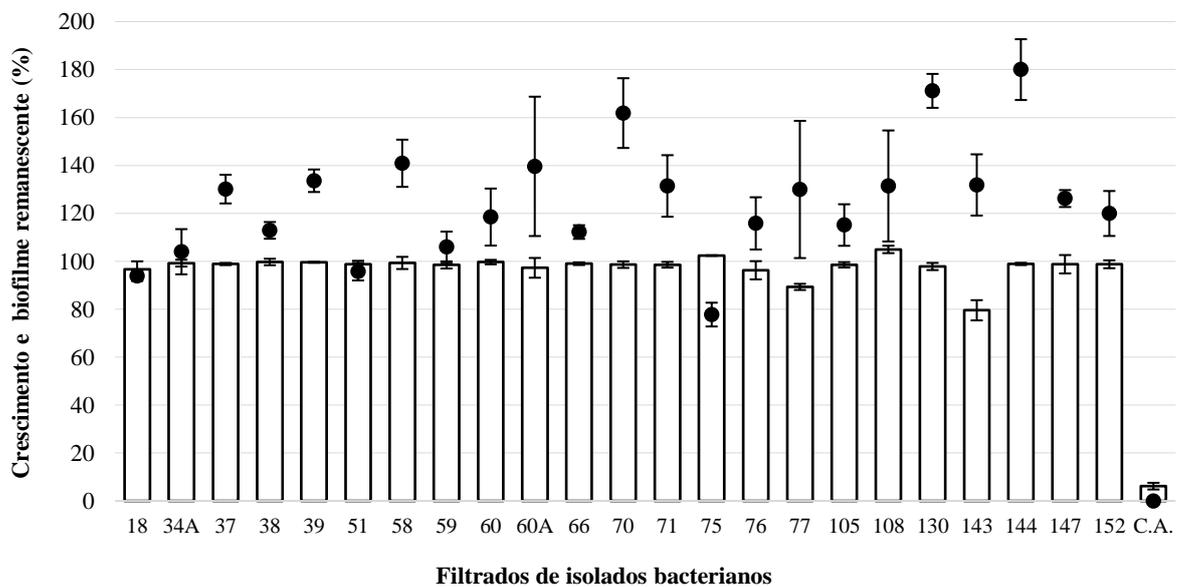


Figura 1: Ensaio de atividade antibiótica e de antiformação de biofilme de *Staphylococcus epidermidis*. Suspensão bacteriana foi incubada com filtrado de isolado bacteriano por 24 h; DO600 foi determinada afim de avaliar o crescimento microbiano (•). DO 570 foi determinada após coloração com cristal violeta para a quantificação de biofilme formado (□). O controle negativo equivale a 100 % de formação biofilme. Os resultados representam a média \pm desvio padrão.

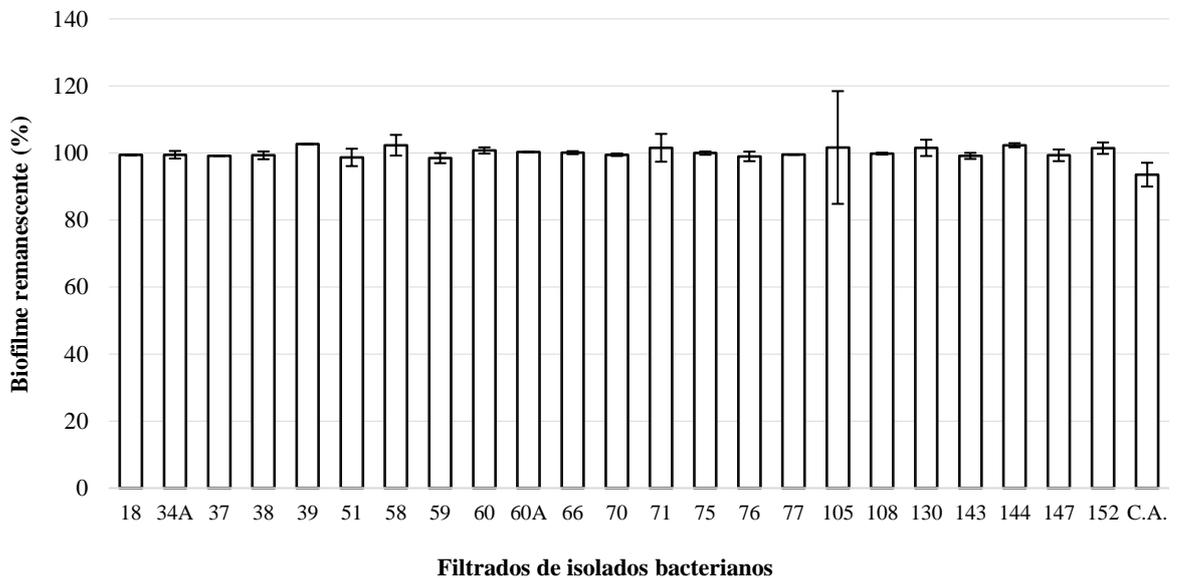


Figura 2: Ensaio de atividade de erradicação de biofilme de *Staphylococcus epidermidis*. Suspensão bacteriana foi incubada por 24 h para formação de biofilme. O filtrado de isolado bacteriano foi adicionado após esse período e incubado por mais 24 h. DO570 foi determinada após coloração com cristal violeta para a quantificação de biofilme remanescente (□). O controle negativo equivale a 100 % de biofilme remanescente. Os resultados representam a média \pm desvio padrão.

5.2 Rastreamento de atividade antibiofilme contra biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*

A habilidade dos filtrados obtidos a partir do cultivo dos isolados marinhos de inibir o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* e de inibir a formação de biofilme desse micro-organismo está representado na Figura 3. Dos 23 filtrados avaliados, dois filtrados, 130 e 144, demonstraram atividade de antiformação de biofilme contra biofilme de *P. aeruginosa* de 32 % e 49 %, respectivamente. Essas percentagens equivalem ao quanto menos de biofilme foi formado ao se comparar com o tratamento controle. Além disso, eles não interferiram no crescimento desta bactéria, portanto não apresentaram atividade antibiótica. A capacidade de erradicar o biofilme de *P. aeruginosa* já formado também foi avaliada, com destaque para atividade de erradicação do filtrado 144, com 34 % de biofilme erradicado (Figura 4).

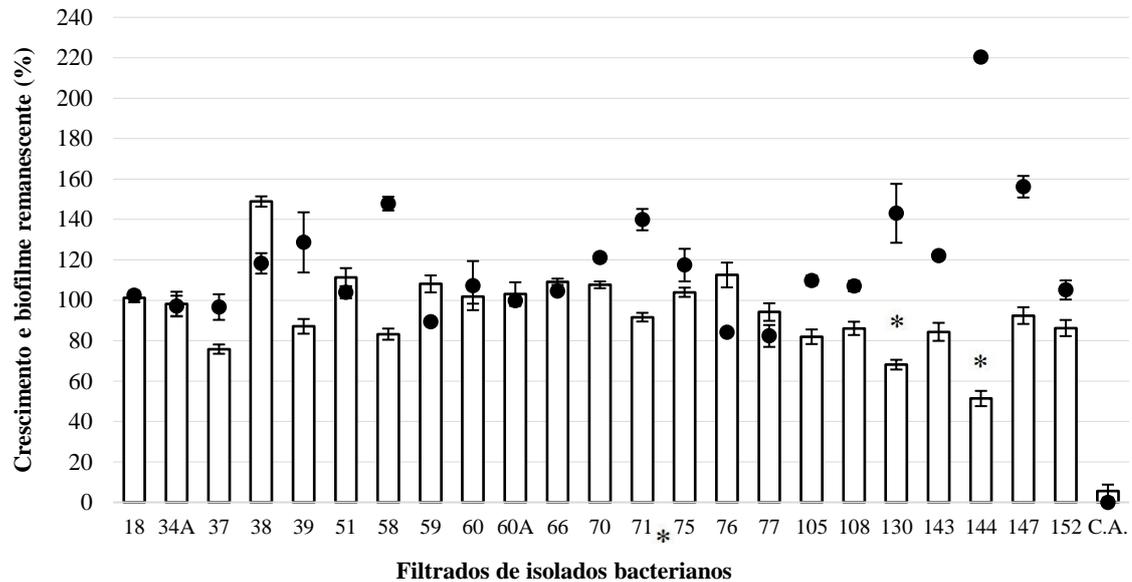


Figura 3: Ensaio de atividade antibiótica e de antifirmação de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*. Suspensão bacteriana foi incubada com filtrado de isolado bacteriano por 24 h; DO600 foi determinada afim de avaliar o crescimento microbiano (●). DO 570 foi determinada após coloração com cristal violeta para a quantificação de biofilme formado (□). O controle negativo equivale a 100 % de formação biofilme. Os resultados representam a média \pm desvio padrão. * indicam filtrados com atividade antibiofilme.

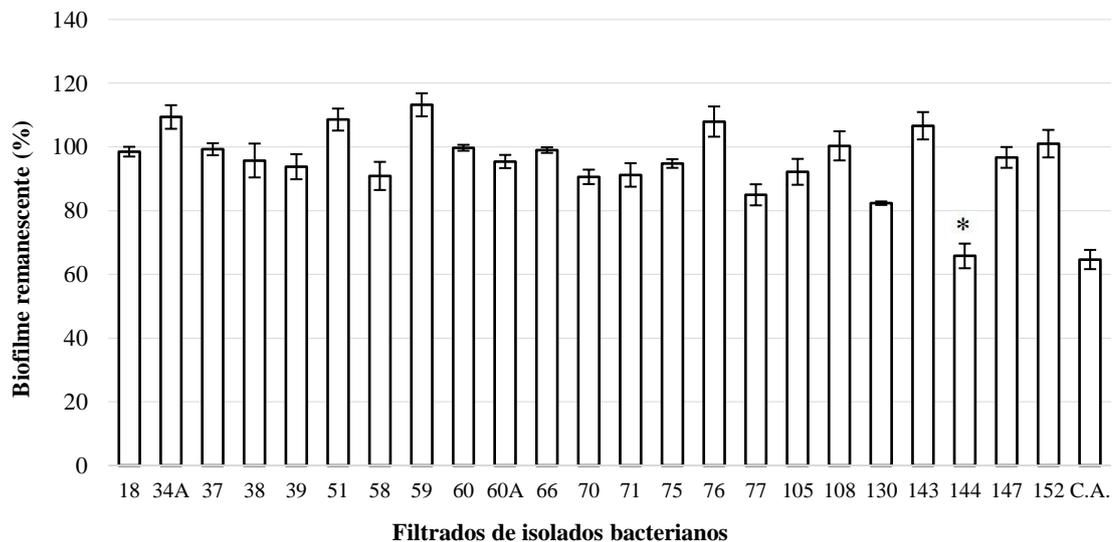


Figura 4: Ensaio de atividade de erradicação de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*. Suspensão bacteriana foi incubada por 24 h para formação de biofilme. O filtrado de isolado bacteriano foi adicionado após esse período e incubado por mais 24 h. DO570 foi determinada após coloração com cristal violeta para a quantificação de biofilme remanescente (□). O controle negativo equivale a 100 % de biofilme remanescente. Os resultados representam a média \pm desvio padrão. * indica o filtrado com atividade antibiofilme.

6 DISCUSSÃO

Foi realizado o cultivo das 23 bactérias isoladas de esponjas marinhas da costa do Estado de Alagoas visando a produção de metabólitos secundários. O local de amostragem é uma escolha interessante, uma vez que oceanos tropicais são áreas de alta diversidade biológica e, por conseguinte, de diversidade química (National Research Council, 2002). O rastreamento de compostos bioativos é interessante de ser realizado principalmente em sistemas simbiotes, como foi o caso deste estudo, já que probabilidade de existência metabólitos microbianos bioativos é alta. Utilizando-se o filtrado obtido do cultivo desses isolados se avaliou a habilidade desses de inibir a formação de biofilme, e de erradicar o biofilme já formado de duas bactérias de importância médica, *S. epidermidis* e *P.aeruginosa*. Além dessas duas atividades, foi avaliada a capacidade desses filtrados inibirem o crescimento desses dois micro-organismos alvo. Como está representado na Figura 1, quando avaliados para atividade antibiofilme de *S. epidermidis*, nenhum dos filtrados apresentou atividade de antiformação ou de erradicação. Eles também não apresentaram atividade antibiótica contra essa bactéria. O fato de que nenhuma atividade antibiofilme foi encontrada pode ser explicado pela limitação de que micro-organismos simbiotes, ao serem cultivados em laboratório, podem não produzir determinados metabólitos que produziram *in natura* (Wijffels, 2008). Além disso, outra limitação poderia ser a produção de uma quantidade insuficiente de potencial molécula bioativa, devido às condições que os micro-organismos foram fermentados (Kennedy et al., 2007).

A fim de contornar isso, outros parâmetros de cultivos poderiam ser avaliados, como a composição do meio de cultura, a aeração e a adição de enzimas. Esse processo busca uma alteração no perfil da expressão gênica e a consequente produção de diferentes metabólitos secundários (Bode et al, 2002). Outra maneira de otimizar o processo de prospecção seria por meio da utilização de ferramentas moleculares, por meio de genômica funcional (Schweder et al., 2005), assim, seria possível adquirir um melhor conhecimento da estrutura populacional em comunidades microbianas do ambiente marinho e de compostos produzidos por elas nessas condições (Li et al., 2006). A busca por compostos que apresentam atividade contra biofilme de *S. epidermidis* é necessária, principalmente por esse micro-organismo ser um dos principais responsáveis por infecções hospitalares, especialmente àquelas relacionadas a implantes ortopédicos. A colocação desses

dispositivos tende a aumentar, uma vez que essa tecnologia está disponível e que há uma maior expectativa de vida da população, um maior número de pacientes desabilitados tenderá a realizar essa intervenção cirúrgica (Francolini e Donelli, 2010). O processo de formação de biofilme de *S. epidermidis* é multifatorial, fármacos que exerçam efeitos antibiofilme podem ter como alvo fatores, ou a síntese desses, que estejam associados com a formação de biofilme, como por exemplo, a PIA (item 1.3). Há relatos na literatura que mostram a existência de enzimas degradadoras de PIA (Otto, 2008).

O mesmo procedimento anterior foi realizado para biofilme de *P. aeruginosa*. Como mostra a Figura 2, dois filtrados de isolados marinhos apresentaram atividade de antif formação, filtrados 130 e 140, com capacidade de inibir a formação de biofilme dessa bactéria em cerca de 30 e 50 %, respectivamente. Esses resultados são interessantes pois, como representado na mesma figura, eles não interferiram negativamente no crescimento microbiano, portanto, não possuem atividade antibiótica, o que é importante para evitar o surgimento de novas resistências bacterianas. Além de atividade de antif formação, o filtrado 144 apresentou atividade de cerca de 35% de erradicação de biofilme. Os demais filtrados não apresentaram atividades antibiofilme significativas.

Pseudomonas aeruginosa é um patógeno que lidera as causas de infecções hospitalares severas e não há fármacos disponíveis contra biofilme desse micro-organismo (Allen et al., 2014). A busca por compostos antibiofilme dessa bactéria se torna mais interessante pelo fato da *P. aeruginosa* apresentar, além de resistências adquiridas, resistência intrínseca a antibióticos (Taylor, 2014). Além disso, outro fato preocupante é que biofilmes de *P. aeruginosa* predominam em infecções pulmonares de pessoas com FC. De acordo com a *Cystic Fibrosis Foundation* (EUA), no mundo, mais de 70 mil pessoas possuem essa condição e, aproximadamente, 1000 casos são diagnosticados anualmente. E, de acordo com o Instituto Nacional de Saúde dos Americano (NIH), a média atual de expectativa de vida para os portadores de fibrose cística, que passam da fase da infância, é de cerca de 37 anos. Portanto, o conjunto dos resultados encontrados nesse estudo se mostra importante e indica a necessidade de continuidade de investigação.

É possível que nos filtrados ativos esteja contida mais de uma molécula ativa, inclusive, pelo fato de que um dos filtrados apresentou tanto atividade de antif formação quanto de erradicação. Também, os compostos ativos podem estar agindo em diferentes etapas do processo de formação do biofilme de *P. aeruginosa* (discutidos no item 1.4). Para

a atividade de antiformação, a primeira hipótese é que a molécula poderia estar agindo como um surfactante, e assim, modificando as características físicas das células bacterianas e da superfície e, conseqüentemente, a capacidade de adesão microbiana. Surfactantes de origem microbiana pertencem a um grupo heterogêneo de moléculas anfipáticas que englobam, glicolípídeos, lipopetídeos lipoproteínas e ácidos graxos. A utilização desses compostos em uma abordagem terapêutica se mostra como uma interessante alternativa uma vez que biosurfactantes possuem baixa toxicidade, são biodegradáveis e assim, sustentáveis (Cameotra & Makkar, 2004; Rivardo et al., 2009). O exemplo mais conhecido de molécula bacteriana com elevada atividade surfactante é o lipopeptídeo cíclico surfactina, molécula produzida pela bactéria *Bacillus subtilis* (Peypoux et al., 1999). Porém, há outros diversos relatos na literatura de bactérias produtoras de biosurfactantes que apresentam atividade antimicrobiana, inclusive de antiformação de biofilme de diversas bactérias causadoras de infecções. Por exemplo, a bactéria marinha *Bacillus circulans* é conhecida por produzir biosurfactante lipopeptídeo (Das et al., 2008), já a bactéria *Brevibacterium casei* é conhecida por produzir biosurfactante glicolípídeo (Kiran, 2010); biosurfactante lipopeptídeo foi produzido por bactéria marinha associada a esponjas, *Nocardiosis alba* (Gandhimathi et al., 2009); além desses, biosurfactantes foram produzidos por *Bacillus* spp. e apresentaram elevada atividade de antiformação de biofilme de *Escherichia coli* e de *Staphylococcus aureus* (Rivardo et al, 2009).

Existe a possibilidade de a molécula ativa estar manifestando sua atividade por meio de ação pilicida, a qual consiste na inibição da síntese do pili bacteriano, e assim, a adesão das células bacterianas é comprometida (Macedo & Abraham, 2009). Como exemplos de compostos pilicidas estão as 2-piridonas bicíclicas, compostos reportados na literatura pela capacidade de evitar adesão de bactérias como *E. coli* e *Vibrio cholerae* a sistemas bióticos (Hung et al., 2005; Pinkner et al., 2006; Berg et al., 2008;). Por último, esse composto ativo poderia estar influenciando a expressão gênica por meio de uma função sinalizadora, portanto, afetando o sistema QS ou comunicação bacteriana dessas células. Como por exemplo, afetando negativamente os sistemas *las* e *rhl* (Adonizio et al., 2008; Rasamiravaka et al., 2015). Dentre os possíveis compostos com atividade de QSI em *P. aeruginosa* estão as furanonas halogenadas, moléculas específicas com capacidade de atenuar a virulência dessa bactéria (Manefield et al., 2002; Hentzer et al., 2003). A hipótese de o composto ativo estar influenciando no sistema QS também poderia explicar a existência da atividade de

erradicação de biofilme, uma vez que a molécula sinalizadora poderia estar estimulando o mecanismo intrínseco de dispersão de biofilmes. A procura por metabólitos para essa atividade busca principalmente um processo de erradicação que ocorra por meio de ação enzimática, na qual enzimas como proteases, teriam como alvos os compostos estruturadores da matriz exopolissacarídica do biofilme (Papa et al., 2014; Rasamiravaka et al., 2015; Tolker-Nielsen, 2014, Rybtke et al., 2015). Considerando que a matriz exopolissacarídica formada em biofilme de *P. aeruginosa* é caracterizada pela presença de alginato, enzimas com capacidade de degradação desse polímero são alternativas interessantes, a enzima alginato liase mostra atividade considerável de erradicação de biofilme de *P. aeruginosa* (Alkawash et al., 2006).

O fato de que os dois filtrados de isolados bacterianos ativos demonstraram atividade contra biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* e não foram ativos contra biofilme de *Staphylococcus epidermidis* pode ser explicado considerando a condição do ambiente no qual essas bactérias foram isoladas. Uma vez que o ambiente marinho é um ambiente de elevada competição, essas duas bactérias podem apresentar mecanismos de defesa específicos contra bactérias gram-negativas. Portanto, seria de interesse a avaliação da atividade antibiofilme de ambos os filtrados ativos contra outras bactérias gram-negativas, como por exemplo, contra a bactéria *Escherichia coli*.

Acredita-se que os micro-organismos marinhos apresentam fisiologia e características genéticas diferente dos micro-organismos terrestres, fato que também os torna objetos para o rastreamento de novos metabólitos secundários. Ademais, a fermentação desses micro-organismos visando a produção de metabólitos é uma abordagem apropriada e sustentável para explorar a diversidade marinha e para produção de PNMs (Hill, 2010; Radjasa, 2013). Cabe ressaltar que a maioria dos compostos marinhos que foram rastreados com sucesso até então são de origem bacteriana (Schweder et al., 2005). Há diversos relatos de compostos isolados do ambiente marinho, principalmente de esponjas, que demonstram atividade antimicrobiana (Gandhimathi et al., 2008; Selvin et al., 2009; Schneepoch et al., 2010). Também, de estudos que mostram a habilidade de moléculas marinhas de interromper o processo de QS de micro-organismos (Givskov et al., 1996; Hentzer et al., 2001; You et al., 2007; Dobrestsov et al., 2010).

Posto isso, juntamente com os resultados obtidos no estudo em questão, essas evidências reafirmam o grande potencial do ambiente marinho para a prospecção de

compostos antibiofilme. Por fim, encontrar um composto marinho bioativo que seja fácil de sintetizar, além de ter um rendimento suficiente de produção para possibilitar o desenvolvimento de fármacos sem nenhuma modificação química é o ideal (Bourguet-Kondracki & Kornprobst, 2005).

7 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Biofilmes patogênicos causam diversas implicações na saúde humana. Tendo em vista a complexidade desse estilo de vida e a consequente persistência de micro-organismos organizados em biofilmes, o desenvolvimento de novas estratégias de combate é necessário; dentre essas estratégias está o desenvolvimento de fármacos antibiofilme. Nesse contexto, a exploração do ambiente marinho para a prospecção de moléculas com atividade antibiofilme se mostra uma abordagem promissora.

Neste trabalho, foi realizado o rastreamento de atividade antibiofilme de compostos oriundos do metabolismo secundário de bactérias provenientes do ambiente marinho. Foi avaliado a capacidade desses metabólitos de afetarem a formação de biofilme de duas bactérias de importância médica, *P. aeruginosa* e *S. epidermidis*, além de avaliar a capacidade desses de erradicar o biofilme, e de influenciar no crescimento de ambas as bactérias. Do total de isolados avaliados, dois apresentaram atividade antibiofilme relevante, evidenciando o potencial biotecnológico da biodiversidade marinha. Os filtrados mais ativos foram os filtrados 130 e 144, ambos contra biofilme de *P. aeruginosa*. Esses filtrados apresentaram tanto atividade de antif formação quanto atividade de erradicação, contudo, a atividade de antif formação foi a mais proeminente, com destaque para a do filtrado 144, com cerca de 50 % de atividade.

As perspectivas desse trabalho consistem, primeiramente, na determinação da massa seca dos filtrados ativos a fim de obter uma estimativa da concentração utilizada nos ensaios de rastreamento de atividade antibiofilme, além da verificação da natureza proteica do(s) composto(s) presente(s) nos dois filtrados brutos ativos. Para tal, seria de interesse submetê-los aos seguintes processos:

- (1) Autoclavagem;
- (2) Ensaio enzimático (proteínase K);
- (3) Ultrafiltração.

Concomitantemente, pretende-se realizar a caracterização morfológica dos dois isolados bacterianos ativos, além da identificação desses por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA.

Considerando a dificuldade de se encontrar compostos que apresentem atividade contra biofilme de *P. aeruginosa* e o fato de que o rastreamento deste estudo foi realizado em filtrados brutos, espera-se que ao fracionar esse material, uma maior atividade antibiofilme seja obtida.

Portanto, dentre as perspectivas deste estudo está o fracionamento de ambos os filtrados e a avaliação da atividade nas frações geradas; esse procedimento também possibilitaria uma maior elucidação da natureza de seus componentes. Para esse fim, métodos cromatográficos serão empregados. Metodologias mais avançadas seriam necessárias para o isolamento, purificação e caracterização química das moléculas ativas e, por conseguinte, elucidação do mecanismo de ação dessas. Por fim, é de interesse a avaliação da atividade antibiofilme dos 23 filtrados produzidos contra biofilme de *Escherichia coli* e de *Staphylococcus aureus*, uma vez que esses dois micro-organismos também são bactérias de importância médica e objetos de estudo do Laboratório de Biofilmes e Diversidade Microbiana.

8 BIBLIOGRAFIA

Adonizio, A.; Kong, K.; Mathee, K. Inhibition of Quorum Sensing-Controlled Virulence Factor Production in *Pseudomonas aeruginosa* by South Florida Plant Extracts. *Antimicrob Agents Chemother.* 52, 198–203, 2008.

Alkawash, M. A.; Soothill J. S.; Schiller, N. L. Alginate lyase enhances antibiotic killing of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *APMIS*, 114, 131-138, 2006.

Allen, J. P.; Ozer, E. A.; Hauser, A. R. Different Paths to Pathogenesis. *Trends Microbiol.* 22, 168-169, 2014.

Amarendra, V., Santhosh, R. S. and Dhevendaran, K. Sponges: A Reservoir for Microorganism-Derived Bioactive Metabolites. In *Marine Microbiology: Bioactive Compounds and Biotechnological Applications*; Kim, S-K. Weinheim. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2013.

Banaigs, B. et al. Marine Peptide Secondary Metabolites. In *Oustanding Marine Molecules: Chemistry, Biology, Analysis*; La Barre, S. Kornprobst, J-M. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2014.

Becker, K.; Heilmann, C.; Peters, Georg. Coagulase-Negative Staphylococci. *Clin Microbiol.* 27, 870-926, 2014.

Berg, V. et al. Carboxylic acid isosteres improve the activity of ring-fused 2-pyridones that inhibit pilus biogenesis in *E. coli*. *Bioorg Med Chem Lett.* 18, 3536-3540, 2008.

Blackledge, M. S.; Worthington, R. J.; Melander, C. Biologically-Inspired Strategies for Combating Bacterial Biofilms. *Curr Opin Pharmacol.* 5, 699-706, 2013.

Bode, H. B. et al. Big Effects from Small Changes: Possible Ways to Explore Nature's Chemical Diversity. *Chembiochem.* 7, 619-627, 2002.

Bourguet-Kondracki, M. L.; Kornprobst, J. M. Promising Marine Molecules in Pharmacology. In *Oustanding Marine Molecules: Chemistry, Biology, Analysis*. La Barre and J.-M. Kornprobst, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany. 2014.

Bourguet-Kondracki, M. L.; Kornprobst J. M. Marine pharmacology: potentialities in the treatment of infectious diseases, osteoporosis and Alzheimer's disease. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 97, 105-131, 2005.

- Büttner, H.; Mack, D.; Rohde, H. Structural basis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation: mechanisms and molecular interactions. *Front Cell Infect Microbiol.* 5, 14, 2015.
- Cameotra, S. S.; Makkar, R. S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. *Current Opinion in Microbiology.* 7, 262-266, 2004.
- Correia, M. D. Scleractinian corals (Cnidaria: Anthozoa) from reef ecosystems on the Alagoas coast, Brazil. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 91, 659–668, 2011.
- Cutruzzolà, F.; Frankenberg-Dinkel, N. Origin and Impact of Nitric Oxide in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *J. Bacteriol.* 198, 55-65, 2016.
- Das, P.; Mucheriee, S.; Sen, R. Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. *J Appl Microbiol.* 104, 1675-1684, 2008.
- Debnath, M.; Paul, A. K.; Bisen, P. S. Natural Bioactive Compounds and Biotechnological Potential of Marine Bacteria. *Curr Pharm Biotechnol.* 8, 253-260, 2007.
- Defoirdt, T. et al. The natural furanone (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone disrupts quorum sensing-regulated gene expression in *Vibrio harveyi* by decreasing the DNA-binding activity of the transcriptional regulator protein luxR. *Environ Microbiol.* 10, 2486-2495, 2007.
- Demain, A. L. Induction of microbial secondary metabolism. *Int Microbiol.* 1, 259-264, 1998.
- Department of Health and Human Services. Immunology of biofilms. Disponível em: <<http://grants.nih.gov/grants/guide/pa-files/PA-07-288.html>>. Acesso em: Ago. 2016.
- Dionisi, H. M.; Lozada, M.; Olivera, N. L. Bioprospection of marine microorganisms: biotechnological applications and methods. *Rev Argent Microbiol.* 44, 49-60, 2012.
- Dobrestsov, S. et al. Malyngolide from the cyanobacterium *Lyngbya majuscula* interferes with quorum sensing circuitry. *Environ. Microbiol.* 6, 739-744, 2010.
- Donlan, R. M.; Costerton, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 15, 167-193, 2002.

Doroshenko, N. et al. Extracellular DNA impedes the transport of vancomycin in *Staphylococcus epidermidis* biofilms preexposed to subinhibitory concentrations of vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother.* 12, 7273-7282, 2014.

Egan, S.; Thomas, T.; Kjelleberg, S. Unlocking the diversity and biotechnological potential of marine surface associated microbial communities. *Curr opin Microbiol.* 11, 219-25, 2008.

Estrela, A. B.; Heck, M. G.; Abraham W. Novel Approaches to Control Biofilm Infections. *Current Medicinal Chemistry.* 15, 1512-1530, 2009.

Faulkner, D. J. Marine Natural products. *The Royal Society of Chemistry.* 18, 1-49, 2001.

Federle, M. J.; Bassler, B. L. Interspecies communication in bacteria. *J Clin Invest.* 9, 1291-1299, 2003.

Fenical, W. Accessing Marine Biodiversity for drug discovery. In *Marine Biotechnology in the Twenty-First Century: Problems, Promise, and Products*. National Research Council. Washington, DC: The National Academies Press, 2002.

Flemming, H. C.; Wingender, J. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* 8, 623-633, 2010.

Francolini, I.; Donelli, G. Prevention and control of biofilm-based medical-device-related infections. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 59, 227-238, 2010.

Gallo, J.; Holinka, M.; Moucha, C. S. Antibacterial Surface for Orthopaedic Implants. *Int. J. Mol. Sci.* 8, 13849-13880, 2014.

Gandelman, J. S. et al. Biotechnological potential of sponge-associated bacteria. *Curr Pharm Biotechnol.* 15, 143-55, 2014.

Gandhimati, R. et al. Production and characterization of lipopeptide biosurfactant by a sponge-associated marine actinomycetes *Nocardiopsis alba* MSA10. *Bioprocess Biosyst Eng.* 32, 825-835, 2009.

Givskov, M. et al. Eukaryotic interference with homoserine lactone-mediated prokaryotic signaling. *J Bacteriol.* 178, 6618-6622, 1996.

Gulder, T. A. M.; Moore, B. S. Chasing the treasures of the sea – bacterial marine natural products. *Curr Opin Microbiol.* 12, 252-260, 2009.

- Gutiérrez, D. et al. Genomic characterization of two *Staphylococcus epidermidis* bacteriophages with anti-biofilm potential. *BMC Genomics*. 13, 228, 2012.
- Hentzer, M. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *EMBO J*. 22, 3761-4026, 2003.
- Hentzer, M. et al. Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiology*. 148, 87-102, 2002.
- Hill, R.T. Microbes from marine sponges: A treasure trove of biodiversity for natural products discovery. In *Microbial Diversity and Bioprospecting*; Bull, A.T. ASM Press: Washington, DC, USA, 2004; pp. 177–190.
- Himaya, S.W.A.; Kim, S.-K. Marine Symbiotic Microorganisms: A New Dimension in Natural Product Research. In *Marine Microbiology: Bioactive Compounds and Biotechnological Applications*; S.-K. Kim. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGa., Weinheim, Germany, 2013.
- Høiby, N. et al. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 35, 322-332, 2010.
- Hung, D. T. et al. Small-molecule inhibitor of *Vibrio cholerae* virulence and intestinal colonization. *Science*. 310, 670-674, 2005.
- Jefferson K. K. What drives bacteria to produce biofilm? *FEMS Microbiology Letters*. 236, 163-173, 2004.
- Jolivet-Gougeon, A.; Bonnaure-Mallet, M. Biofilm as a mechanism of bacterial resistance. *Drug Discovery Today: Technologies*. 11, 49-56, 2014.
- Jonathan, P. et al. Different paths to pathogenesis. *Trends Microbiol*. 22, 168-169, 2014.
- Jordan, M. A.; Wilson, L. Mining the ocean's pharmacological riches: a lesson from taxol and the vinca alkaloids. In *Marine Biotechnology in the Twenty-First Century: Problems, Promise, and Products*. National Research Council. Washington, DC: The National Academies Press, 2002.
- Kennedy, J. et al. Functional metagenomic strategies for the discovery of novel enzymes and biosurfactants with biotechnological applications from marine ecosystems. *J Appl Microbiol*. 111, 787-799, 2011.
- Kennedy, J.; Marchesi, J. R.; Dobson, A. D. Metagenomic approaches to exploit the biotechnological potential of the microbial consortia of marine sponges. *Appl Microbiol Biotechnol*. 75, 11-20, 2007.

- Kiran, G. S.; Sabarathnam, B.; Selvin, J. Biofilm disruption potential of a glycolipid biosurfactant from marine *Brevibacterium casei*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 59, 432-438, 2010.
- Li, Z-Y.; He, L-M.; Wu, J.; Jiang, Q. Bacterial community diversity associated with four marine sponges from the South China Sea based on 16S rDNA-DGGE fingerprinting. *J Exp Mar Biol Ecol*. 329, 75-85, 2006.
- Macedo, A. J.; Abraham, W. R. Can infectious biofilm be controlled by blocking bacterial communication? *Med Chem*. 5, 517-528, 2009.
- Mack, D. et al. Chapter 7: Coagulase-Negative Staphylococci. *Biofilms, Infection and Antimicrobial Therapy*. Boca Raton: CRC Press, 2006.
- Mai-Prochnow, A. et al. Pseudomonas aeruginosa Biofilm Response and Resistance to Cold Atmospheric Pressure Plasma Is Linked to the Redox-Active Molecule Phenazine. *PLoS One*. 10, 2015.
- Manefield, M. et al. Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover. Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover. *Microbiology*. 148, 1119-27, 2002.
- Manivasagan, P. et al. Marine actinobacterial metabolites and their Pharmaceutical Potential. In *Marine Biotechnology*. Kim, S-K. Springer, 2015.
- National Research Council. *Marine Biotechnology in the Twenty-First Century: Problems, Promise, and Products*. Washington, DC: The National Academies Press, 2002.
- O'Toole, G.; Kaplan, H. B.; Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol*. 54, 49-79, 2000.
- Otto, M. Biofilms in disease. *Antibiofilm Agents*. 8, 3-13, 2014.
- Otto, M. Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections. *Semin Immunopathol*. 2, 201-214, 2012.
- Otto, M. *Staphylococcus epidermidis* – the “accidental” pathogen. *Nat Rev Microbiol*. 8, 555-567, 2009.
- Papa R. et al. Anti-biofilm activity of the Antarctic marine bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *Res Microbiol*. 5, 450-456, 2013.

- Peypoux, F.; Bonmatin, J.; Wallach, J. Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl Microbiol Biotechnol.* 51, 553-563, 1999.
- Pinkner J. S. et al. Rationally designed small compounds inhibit pilus biogenesis in uropathogenic bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103, 17897-17902, 2006.
- Pletzer, D.; Coleman, S. R., Hancock, R. E. Anti-biofilm peptides as a new weapon in antimicrobial warfare. *Curr Opin Microbiol.* 33, 35-40, 2016.
- Pomponi, S. A. The bioprocess-technological potential of the sea. *J Biotechnol.* 70, 5-13, 1999.
- Pramanik, A.; Saha, M.; Sana, B. Antimicrobial Agents from Marine Cyanobacteria and Actinomycetes. In *Marine Microbiology: Bioactive Compounds and Biotechnological Applications*. Kim, S-K. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2013.
- Radjasa, O. K. Bioprospecting of Marine Microbial Symbionts: Exploitation. In *Marine Microbiology: Bioactive Compounds and Biotechnological Applications*. Kim, S-K. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2013.
- Rasamiravaka, T. et al. The formation of Biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms. *Biomed Res Int.* 2015.
- Rath, C, M. et al. Meta-omic characterization of the marine invertebrate microbial consortium that produces the chemotherapeutic natural product ET-743. *ACS Chem Biol.* 6, 1244-56, 2011.
- Riool M. et al. *Staphylococcus epidermidis* originating from titanium implants infects surrounding tissue and immune cells. *Acta Biomater.* 12, 5202-5012, 2014.
- Rivardo, F. et al. Anti-adhesion activity of two biosurfactants produced by *Bacillus* spp. Prevents biofilm formation of human bacterial pathogens. *Appl Microbiol Biotechnol.* 83, 542-553, 2009.
- Rybtke, M. et al. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Infections: Community Structure, Antimicrobial Tolerance and Immune Response. *J Mol Biol.* 427, 3628-3645, 2015.
- Schweder, T.; Lindequist U.; Lalk M. Screening for new metabolites from marine microorganisms. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 96, 1-48, 2005.
- Schneemann, I. et al. Mayamycin, a cytotoxic polyketide from a *Streptomyces* strain isolated from the marine sponge *Halichondria panicea*. *J Nat Prod.* 73, 1309-1312, 2010.
- Sims, J.; Fenical, W.; Wing, R. M.; Radlick, P. Marine natural products .1. Pacifenol, a rare sesquiterpene containing bromine and chlorine from red alga, *Laurencia pacifica*. *J. Am. Chem. Soc.* 93, 3774-3775, 1971.

Sipkema, D. et al. Marine sponges as pharmacy. *Mar Biotechnol.* 7, 142-162, 2005.

Stepanovic, S. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *staphylococci*. *APMIS* 8, 891-899, 2007.

Taylor, P. K.; Yeung, A. T.; Hancock, R.E. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: towards the development of novel anti-biofilm therapies. *J. Biotechnol.* 191, 121-130, 2014.

Tolker-Nielsen, T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections: From molecular biofilm biology to new treatment possibilities. *APMIS Suppl.* 138, 1-51, 2014.

Trentin, D. S.; Giordani, R. B.; Macedo, A. J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. *Revista Liberato*, 14, 113-238, 2013.

Wietz, M. et al. Small-Molecule Antibiotics from Marine Bacteria and Strategies to Prevent Rediscovery of Known Compounds. In *Marine Microbiology: Bioactive compounds and Biotechnological Applications*. Kim, S-K. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGa: Weinheim, Germany, 2013.

Wijffels, R. H. Potential of sponges and microalgae for marine biotechnology. *Trends in biotechnol.* 26, 26-31, 2008.

Wu H. et al. Strategies for combating bacterial biofilms infections. *Int J Oral Sci.* 1, 1-7, 2015.

You, J. L.; Inhibition of *Vibrio* biofilm formation by a marine actinomycete strain A66. *Appl Microbiol Biotechnol.* 75, 1137-1144, 2017.