

# Prospecção de biossurfactantes de bactérias da Antártica para aplicação no controle de biofilmes patogênicos



Júlio César Elias da Cunha Filho, Janine Treter, Alexandre José Macedo

Laboratório de Biofilmes e Diversidade Microbiana, Centro de Biotecnologia e Faculdade de Farmácia, UFRGS

## Introdução

Biofilmes são comunidades microbianas que se aderem a uma superfície e secretam uma matriz de substâncias extracelulares poliméricas (EPS). Esta confere aos micro-organismos maior resistência a antibióticos e a defesas imunológicas do hospedeiro. Infecções associadas a biofilmes patogênicos constituem a maior parte das infecções hospitalares, o que desencadeia um problema de saúde pública de difícil tratamento, levando à necessidade de se encontrar moléculas capazes de inibir a formação de biofilmes ou de erradicar biofilmes já formados. Biossurfactantes são compostos cuja estrutura apresenta uma porção apolar e uma polar, característica que confere a eles propriedades como a redução das tensões superficial e interfacial e a estabilização de emulsões entre fases imiscíveis. Relatos na literatura indicam o potencial antibiofilme de biossurfactantes, devido à sua capacidade de tornar superfícies antiadesivas. Como as aplicações industriais dos biossurfactantes envolvem exposição a condições extremas, existe a necessidade de encontrar micro-organismos produtores desta classe de moléculas em ambientes extremos. Micro-organismos psicrófilos e psicrotolerantes são capazes de produzir biossurfactantes, o que indica o potencial de ambientes frios (como o Ártico e a Antártica) como fonte de micro-organismos produtores de biossurfactantes.

Neste contexto, o objetivo do presente trabalho é realizar a prospecção de biossurfactantes produzidos por bactérias isoladas do continente Antártico para testar sua atividade antibiofilme.

## Materiais e Métodos

**Isolamento de bactérias extremófilas:** De amostras de água, neve e solo coletadas no continente Antártico foram isoladas bactérias em cinco diferentes meios de cultivo (Ágar LB, TSA, AN, R2A e PCA).

**Fermentação e obtenção dos filtrados:** Os isolados foram cultivados em seus respectivos meios líquidos por 4 dias (25 °C, 150 rpm). Os caldos fermentados foram centrifugados (10.000 rpm, 20 min) e filtrados em membrana de 0,2 µm.

**Atividade antibiofilme e antibiótica dos filtrados frente a *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984:** Testadas pelo método do cristal violeta e pela diferença no crescimento bacteriano (OD600), respectivamente.

**Ensaio de emulsificação:** 4 mL de filtrado e 6 mL de éter de petróleo foram misturados em vórtex por 2 min; após 24 h, mediou-se a altura da camada de emulsão (he) e a altura da camada total (ht), sendo o índice de emulsificação (E24) calculado como a razão entre he e ht multiplicada por 100.

**Otimização do tempo de fermentação:** Os isolados produtores de biossurfactantes foram cultivados por 216 h, sendo coletadas alíquotas de 2 mL de caldo a cada 24 h para realização do ensaio de emulsificação e medida da OD600.

**Identificação por sequenciamento do rDNA 16S:** O DNA dos isolados produtores de biossurfactantes foi extraído com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e realizou-se a amplificação parcial do gene ribossomal 16S por PCR. Os produtos de PCR dos isolados foram purificados e sequenciados.

## Resultados

Foram testadas as atividades antibiofilme e antibiótica de 22 filtrados, dentre os quais 7 apresentaram alto potencial de inibir a formação de biofilme de *Staphylococcus epidermidis* sem uma alta interferência no crescimento (Figura 1). Essa propriedade é interessante em um agente antibiofilme, porque, dessa forma, ele irá exercer uma menor pressão seletiva sobre as bactérias, o que evitaria uma possível aquisição de resistência por parte delas.

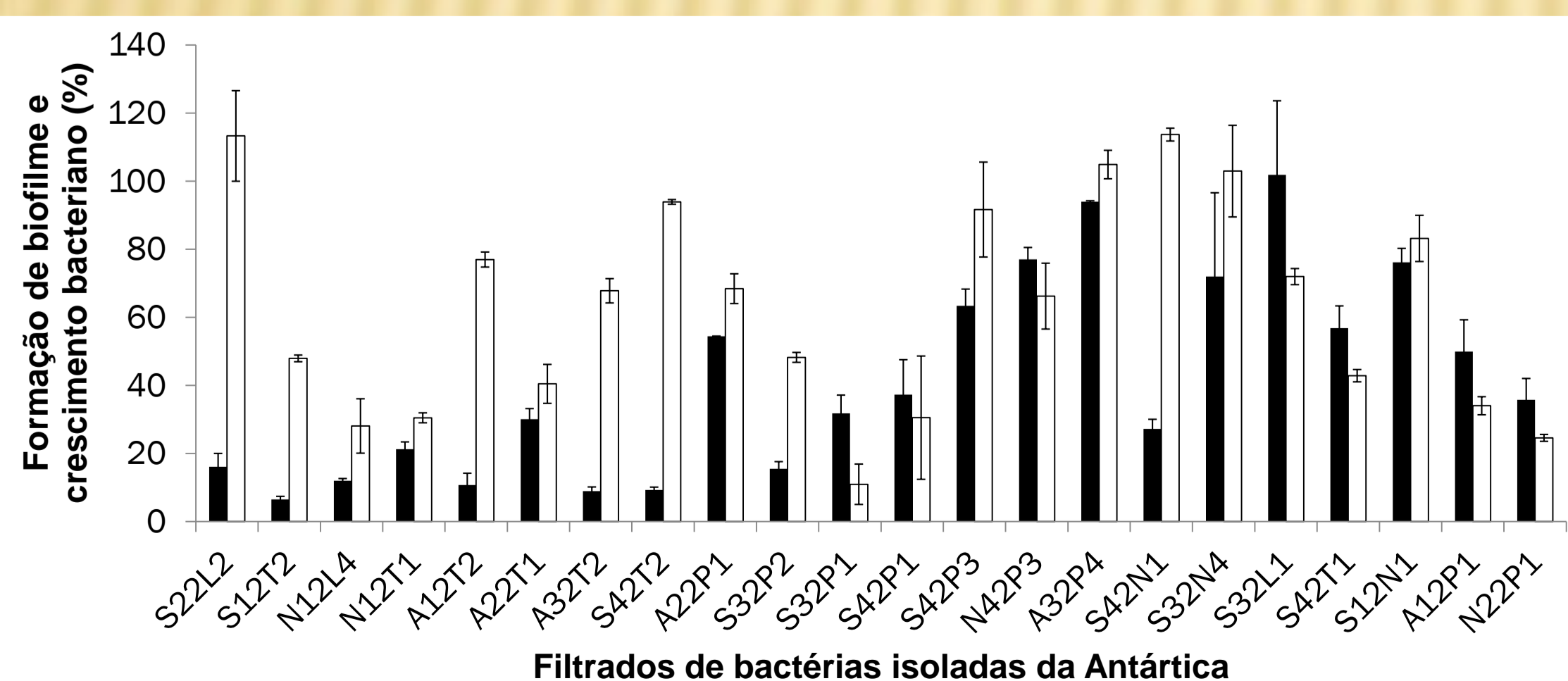


Figura 1: Formação de biofilme (barras pretas) e crescimento bacteriano (barras brancas) de *S. epidermidis* ATCC 35984 frente a filtrados de bactérias isoladas da Antártica.

Os filtrados dos 7 isolados promissores foram submetidos ao ensaio de emulsificação. 3 isolados apresentaram filtrados com alta atividade emulsificante: S22L2, S32P2 e S42N1 (Tabela 1).

Filtrado	S22L2	S12T2	A12T2	A32T2	S42T2	S32P2	S42N1
E <sub>24</sub> (%)	59,5	50,0	48,9	15,2	40,4	63,0	66,7

Tabela 1: Índice de emulsificação de filtrados de bactérias isoladas da Antártica com potencial antibiofilme.

Os tempos ótimos de produção de biossurfactantes pelos isolados S22L2, S32P2 e S42N1 foram determinados como sendo: 120 h para S22L2, 168 h para S32P2 e 72 h para S42N1 (Figura 2).

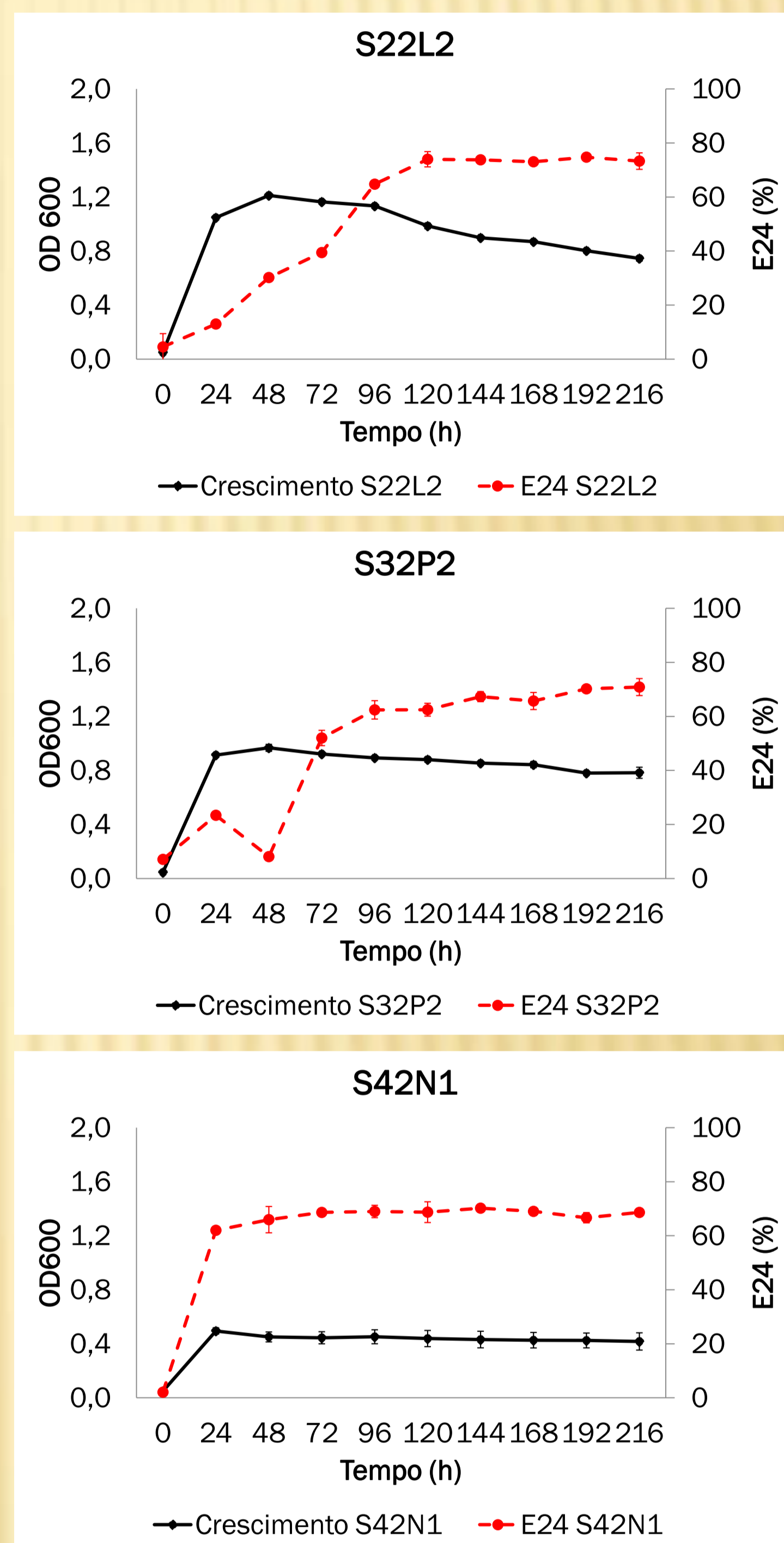


Figura 2: Curvas de crescimento bacteriano e de índice de emulsificação de filtrados de bactérias isoladas da Antártica produtoras de biossurfactantes.

O sequenciamento do rDNA 16S identificou S22L2 como *Pseudomonas sp.*, S32P2 como *Pseudomonas sp.* e S42N1 como *Psychrobacter maritimus*. O gênero *Pseudomonas* é amplamente descrito como produtor de biossurfactantes; para o gênero *Psychrobacter*, a produção de biossurfactantes ainda não foi relatada na literatura.

## Conclusões

Os resultados confirmam o potencial da Antártica como fonte de micro-organismos produtores de biossurfactantes, destacando-se a bactéria *Psychrobacter maritimus* visto que esta é uma atividade inédita relatada para o gênero.

## Perspectivas

Os próximos passos incluem a purificação dos biossurfactantes, a elucidação estrutural e a determinação do potencial antibiofilme das moléculas puras. Ainda, está em andamento a determinação das atividades antibiofilme e antibiótica de outros filtrados e o rastreamento, nos promissores, da presença de biossurfactantes.