



**Ministério da Educação**  
**Universidade Federal do Rio Grande**  
**Programa de Pós graduação em Ciências da Saúde**



**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DO  
SOBRENADANTE DE *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 EM DIFERENTES  
GÊNEROS BACTERIANOS**

**Mariana Silveira Mello Silva**

Rio Grande, 2023



**Ministério da Educação**  
**Universidade Federal do Rio Grande**  
**Programa de Pós graduação em Ciências da Saúde**



**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DO  
SOBRENADANTE DE *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 EM DIFERENTES  
GÊNEROS BACTERIANOS**

**Mariana Silveira Mello Silva**

Dissertação de mestrado apresentada ao  
Programa de Pós Graduação em Ciências da  
Saúde da Universidade Federal do Rio  
Grande, como requisito parcial à obtenção  
do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof. Dra. Luciana Avila

Co-orientadora: Prof. Dra. Daniela  
Fernandes Ramos

Rio Grande, 2023



**Ministério da Educação**  
**Universidade Federal do Rio Grande**  
**Programa de Pós graduação em Ciências da Saúde**



**Mariana Silveira Mello Silva**

Dissertação de mestrado apresentada ao  
Programa de Pós Graduação em Ciências da  
Saúde da Universidade Federal do Rio  
Grande, como requisito parcial à obtenção  
do título de Mestre em Ciências da Saúde.

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DO  
SOBRENADANTE DE *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 EM DIFERENTES  
GÊNEROS BACTERIANOS**

**Banca examinadora:**

Prof. Dra. Rosmari Horner – Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)  
Prof. Dra. Ivy Bastos Ramis – Universidade Federal do Rio Grande (FURG)  
Dra. Priscila Halicki - University of Central Florida (UCF)  
Prof. Dr. Carlos James Scaini -Universidade Federal do Rio Grande (FURG)

**Orientadora: Prof Dra. Luciana Avila**

**Co-orientadora: Prof Dra. Daniela Ramos**

Rio Grande, 2023

## AGRADECIMENTOS

115  
116  
117  
118  
119  
120  
121  
122  
123  
124  
125  
126  
127  
128  
129  
130  
131  
132  
133  
134  
135  
136  
137  
138  
139  
140  
141  
142  
143  
144  
145  
146  
147  
148  
149  
150  
151  
152  
153  
154  
155  
156  
157  
158  
159

Primeiramente, agradeço a Deus por permitir a realização deste trabalho, guiando meus caminhos para que até aqui chegasse. Agradeço às professoras Luciana e Daniela, por todo o tempo dedicado a me ensinar e orientar, sempre tão receptivas e incentivadoras.

Agradeço aos colegas, que se tornaram amigos: Juliana, Rafaella, Mariana, Livia, Iago, Maíra, Andrezza e Victória, a presença de vocês durante este período foi essencial, tornando todas as etapas mais leves e demonstrando apoio em todas as situações.

Por fim, agradeço a minha família, por ser a base do que sou. Em especial, a minha mãe Elaine, que recentemente foi aprovada para cursar o doutorado nesta mesma instituição. Obrigada por ser minha referência em tantos âmbitos da vida e me incentivar a escolher os melhores caminhos.

160  
161  
162  
163  
164  
165  
166  
167  
168  
169  
170  
171  
172  
173  
174  
175  
176  
177  
178  
179  
180  
181  
182  
183  
184  
185  
186  
187  
188  
189  
190  
191  
192  
193  
194  
195  
196  
197  
198  
199  
200  
201  
202  
203  
204  
205  
206

*“Se as coisas são inatingíveis... ora!  
Não é motivo para não querê-las...  
Que tristes os caminhos, se não fora  
A presença distante das estrelas!”*

*Das Utopias, Mário Quintana.*

## RESUMO

**Introdução:** As bactérias em biofilmes se diferem metabolicamente das demais bactérias em suspensão isoladas em cultura pura, pois apresentam uma maior resistência aos antibióticos e desinfetantes. Estudos mostram que dois diferentes mecanismos são capazes de atuar modulando a formação de biofilmes, sendo estes: inibição da fixação da superfície bacteriana e desestabilização /interrupção de biofilmes maduros irreversivelmente aderidos. Considerando a relevância do tema e a necessidade de terapias inovadoras, uma nova estratégia propõe o uso de probióticos como agentes antimicrobianos. **Objetivo:** Avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme do sobrenadante de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 (CFS) em diferentes gêneros bacterianos formadores de biofilmes. **Metodologia:** Foram realizados ensaios para avaliação da capacidade antimicrobiana e antibiofilme do CFS contra as bactérias *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Acinetobacter baumannii* 301, *Staphylococcus aureus* ATCC 12598 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, sendo o primeiro destes, o ensaio de concentração inibitória mínima de atividade antimicrobiana (CIM), seguido pelos ensaios de inibição da formação de biofilmes e destruição de biofilmes maduros. Os dados foram processados, e os gráficos elaborados utilizando o software GraphPad Prism 7.05. **Resultados:** Todos os ensaios demonstram alto percentual de inibição da atividade bacteriana das cepas testadas, obtendo percentual em torno de 99% de inibição nos ensaios de CIM e inibição da formação de biofilmes, e 88% de capacidade de destruição de biofilmes maduros. **Conclusão:** O CFS apresentou atividade antimicrobiana contra todas cepas testadas, e além de inibir a formação de biofilmes também foi capaz de destruir biofilmes bacterianos previamente formados. Assim, nossos resultados demonstram a importância de maiores estudos com essa substância, visando uma possível alternativa terapêutica para o tratamento de infecções causadas por estes microrganismos.

**Palavras-chave:** Biofilmes; probióticos; *Lactobacillus rhamnosus*; Resistência bacteriana a fármacos.

## ABSTRACT

**Introduction:** Bacteria in biofilms differ metabolically from other bacteria in suspension isolated in pure culture, because they are more resistant to antibiotics and disinfectants. Studies have shown that two different mechanisms can act modulating biofilm formation, namely: inhibition of bacterial surface attachment and destabilization/interruption of irreversibly adhered mature biofilms. Considering the relevance of the theme and the need for innovative therapies, a new strategy proposes the use of probiotics as antimicrobial agents. **Objective:** To evaluate the antimicrobial and antibiofilm activity of the supernatant of *L. rhamnosus* ATCC 7469 (CFS) on different strains of bacterial genera. **Methodology:** Assays were performed to evaluate the antimicrobial and antibiofilm capacity of the CFS against *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Acinetobacter baumannii* 301, *Staphylococcus aureus* ATCC 12598 and *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, being the first of these, the minimum inhibitory concentration of antimicrobial activity (MIC) assay, followed by the inhibition assays of the formation of biofilms and destruction of mature biofilms. The data were processed, and graphs prepared using GraphPad Prism 7.05 software. **Results:** All tests demonstrate a high percentage of inhibition of bacterial activity of strains tested, obtaining percentage around 99% of inhibition in the MIC and biofilm formation inhibition tests, and 88% of ability to destroy mature biofilms. **Conclusion:** CFS showed antimicrobial activity against all strains tested, and besides inhibiting biofilm formation it was also able to destroy previously formed bacterial biofilms. Thus, our results demonstrate the importance of further studies with this substance, aiming at a possible therapeutic alternative for the treatment of infections caused by these microorganisms.

**Keywords:** Biofilms; probiotics; *Lactobacillus rhamnosus*; Drug resistance, Bacterial.

270  
271  
272  
273  
274  
275  
276  
277  
278  
279  
280  
281  
282  
283  
284  
285  
286  
287  
288  
289  
290  
291  
292  
293  
294  
295  
296  
297  
298  
299  
300  
301  
302  
303

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 - Parâmetros ecológicos e evolutivos que operam em comunidades de biofilmes. Efeitos de grupo: aumentam a aptidão bacteriana em comparação com a vida solitária. .... | 12 |
| Figura 2 - Atividade antimicrobiana do sobrenadante de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7649 sobre bactérias formadoras de biofilme.....                                    | 35 |
| <b>Manuscrito</b>                                                                                                                                                              |    |
| Figura 1 - Atividade antimicrobiana do sobrenadante de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7649 sobre bactérias formadoras de biofilme.....                                    | 23 |
| Figura 2- Inibição da formação de biofilme pelo sobrenadante de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7649.....                                                                  | 25 |
| Figura 3 - Destruição de biofilme pelo sobrenadante de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7649 .....                                                                          | 26 |

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

CIM – Concentração inibitória mínima

OMS – Organização mundial da saúde

ESKAPE - *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter species*.

CDC – Centro para controle e prevenção de doenças

pH - Hydrogenion potential

PMB – Biofilmes polimicrobianos

NUDEFA – Núcleo de desenvolvimento de novos fármacos

MH – Mueller Hinton

CFS – Sobrenadante livre de células de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7649

nm – Nanômetros

DO/OD – Densidade ótica

μL - Microlitro

UFC – Unidades formadoras de colônia

PBS – Tampão fosfato-salino

mL – mililitros

*E.coli* – *Escherichia coli* ATCC 25922

*P.a* – *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442

*A.b* 19606 – *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606

*A.b* 301 – *Acinetobacter baumannii* 301

*S.a* 12598 – *Staphylococcus aureus* ATCC 12598

*S.a* 29213 – *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

335

336

## SUMÁRIO

337

|     |                                                                                    |    |
|-----|------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 338 | 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA .....                                        | 11 |
| 339 | 1.1 Biofilmes .....                                                                | 11 |
| 340 | 1.2 Uso de probióticos no combate a biofilmes .....                                | 13 |
| 341 | 2. OBJETIVOS.....                                                                  | 16 |
| 342 | 2.1 Objetivo geral: .....                                                          | 16 |
| 343 | 2.2 Objetivos específicos:.....                                                    | 16 |
| 344 | 3. MANUSCRITO .....                                                                | 17 |
| 345 | 1. INTRODUÇÃO .....                                                                | 19 |
| 346 | 2. METODOLOGIA .....                                                               | 20 |
| 347 | 2.1 Cultivo de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469 e obtenção do sobrenadante |    |
| 348 | 20                                                                                 |    |
| 349 | 2.2 Bactérias produtoras de biofilmes.....                                         | 20 |
| 350 | 2.3 Ensaio de atividade antimicrobiana - Determinação da concentração inibitória   |    |
| 351 | mínima (CIM).....                                                                  | 21 |
| 352 | 2.4 Ensaio de atividade antibiofilme: inibição da formação de biofilme .....       | 21 |
| 353 | 2.5 Ensaio de atividade antibiofilme: destruição de biofilmes.....                 | 22 |
| 354 | 2.6 Processamento de dados .....                                                   | 22 |
| 355 | 3. RESULTADOS.....                                                                 | 23 |
| 356 | 3.1 Ensaio de atividade antimicrobiana (CIM).....                                  | 23 |
| 357 | 3.2 Ensaio de atividade antibiofilme: inibição da formação de biofilme .....       | 24 |
| 358 | 3.3 Ensaio de atividade antibiofilme: destruição de biofilmes.....                 | 25 |
| 359 | 4. DISCUSSÃO.....                                                                  | 26 |
| 360 | 5. CONCLUSÕES.....                                                                 | 29 |
| 361 | 6. AGRADECIMENTOS .....                                                            | 29 |
| 362 | 7. DECLARAÇÃO DE CONFIRMAÇÃO/CONTRIBUIÇÃO DE AUTORIA .....                         | 29 |
| 363 | 8. DECLARAÇÃO DE DIVULGAÇÃO.....                                                   | 29 |
| 364 | 9. INFORMAÇÃO DE FINANCIAMENTO.....                                                | 30 |
| 365 | 4. RESULTADOS COMPLEMENTARES .....                                                 | 33 |
| 366 | 5. CONCLUSÕES GERAIS .....                                                         | 34 |
| 367 | 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....                                                 | 35 |

368

## 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 Biofilmes

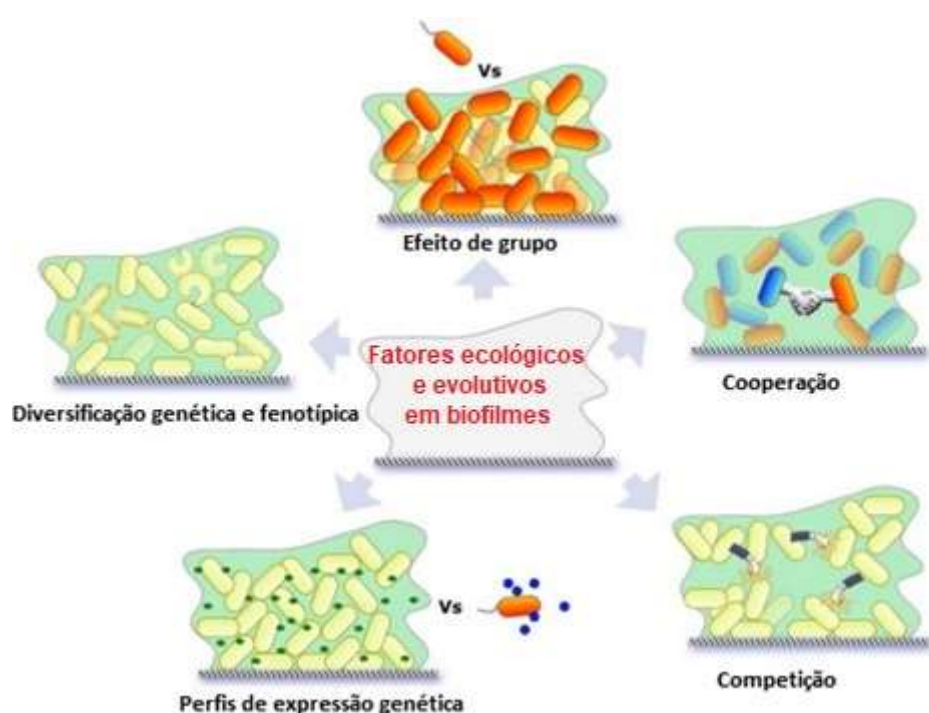
Biofilmes são comunidades microbianas caracterizadas pela produção de substâncias poliméricas extracelulares que favorecem a adesão às superfícies bióticas e abióticas (MIQUEL, S et al., 2016). Sabe-se que interações intra e interespecies de bactérias geram competição entre os microrganismos, podendo afetar o desenvolvimento de biofilmes. As bactérias formadoras de biofilmes se diferem metabolicamente das demais bactérias em suspensão isoladas em cultura pura, pois apresentam uma maior resistência aos antibióticos e desinfetantes (RENDUELES, O., 2015; FRIERI M. et al, 2017).

Em 2012, uma pesquisa realizada pela associação francesa “Réseau d’alerte, d’investigation et de vigilância de infecções nosocomiales” (RAISIN), avaliou a prevalência de infecções nosocomiais em 1938 instalações hospitalares e 300.330 pacientes, identificando que os microrganismos frequentemente associados às infecções foram: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* (38,1% resistente a meticilina, MRSA), *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*, sendo todas estas cepas produtoras de biofilme (RAISIN, 2015). Em 2017 a Organização Mundial da Saúde (OMS) também evidenciou algumas bactérias que se destacaram devido à sua ampla resistência a antibióticos, destacando que estas devem ter prioridade na investigação de novos fármacos. Nesta lista, os patógenos do grupo ESKAPE estão classificados como criticamente prioritários (*Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter spp.*) e altamente prioritários (*Enterococcus faecium* e *Staphylococcus aureus*) para pesquisas e descobertas de antimicrobianos que minimizem a morbimortalidade por esses agentes infecciosos (WHO, 2017).

Devido ao surgimento e ampla disseminação de bactérias multirresistentes aos antibióticos, houve um notório aumento do número de mortes por infecções, configurando-se hoje um dos principais desafios globais de saúde pública, prejudicando progressos nos cuidados de saúde, produção de alimentos e expectativa de vida. Segundo o Centro de controle e prevenção de doenças, do inglês *CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, UNITED STATES* - CDC, o investimento no

desenvolvimento e acesso a vacinas, terapêuticos e diagnósticos são fundamentais para melhor prevenção, tratamento e detecção deste problema (CDC, 2019).

Tendo em vista o grave problema de saúde pública configurado pela resistência a antibióticos, as estratégias antibiofilme tornam-se de vital importância e interesse para a biotecnologia médica, fato que podemos evidenciar através do grande número de publicações recentes sobre o tema (SARIKHANI et al., 2018; ISHIKAWA et al., 2020; CARVALHO et al., 2021). Os biofilmes exibem particularidades que irão modificar a resistência bacteriana a fatores externos e interferir em suas capacidades de propagação e fatores de virulência, conforme demonstra a figura 1.



Fonte: RENDUELES et al., 2015. Doi:10.1128/microbiolspec.MB-0009-2014.f1.

Modificado pela autora.

Figura 1 - Parâmetros ecológicos e evolutivos que operam em comunidades de biofilmes. Efeitos de grupo: aumentam a aptidão bacteriana em comparação com a vida solitária.

Dois diferentes mecanismos são caracterizados como responsáveis por atuar modulando a formação de biofilmes, sendo estes: inibição da fixação da superfície bacteriana e desestabilização /interrupção de biofilmes maduros irreversivelmente

aderidos (MIQUEL et al., 2016). Neste estudo, ambas hipóteses foram testadas através de ensaios de inibição da formação de biofilmes e destruição de biofilmes maduros.

Com relação as cepas utilizadas neste estudo, com exceção do isolado clínico *Acinetobacter baumannii* 301, todas são caracterizadas como padrão de referência *American Type Culture Collection* – abreviadas do inglês por ATCC, sendo o critério de inclusão destas a produção de biofilmes. Quanto a sensibilidade aos antibióticos, a cepa *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 é suscetível a uma ampla variedade de antibióticos, incluindo ácido nalidíxico, ciprofloxacina e muitos antibióticos das famílias  $\beta$ -lactama e aminoglicosídeo e resistente à ampicilina, estreptomicina, espectinomicina, cloranfenicol, sulfametoxazol e ceftazidima. Já as cepas de *Staphylococcus aureus*, (ATCC 12598 e ATCC 29213) demonstram sensibilidade à metilina (MSSA), (HAMIDIAN M. Et al., 2020; SONI I. Et al., 2015; MUSSO N. Et al., 2021). O isolado clínico *Acinetobacter baumannii* 301, apresenta resistência aos antibióticos ciprofloxacina e ceftazidima e sensibilidade à amicacina (HALICKI et al., 2019).

## 1.2 Uso de probióticos no combate a biofilmes

Probióticos são microrganismos vivos que, quando consumidos em quantidades adequadas, são capazes de conferir benefícios à saúde do hospedeiro (WHO, 2005). A literatura indica que a introdução de probióticos pela alimentação é recomendada como agente benéfico que pode equilibrar e promover benefícios a composição da microbiota, proteger contra inflamação intestinal e agir na modulação do sistema imune (SHI, L. H. et al., 2016).

Alguns mecanismos são sugeridos como responsáveis pela saúde do hospedeiro proporcionada pelos probióticos, sendo estes: otimização da função da barreira intestinal através de efeitos no epitélio e revestimento de muco, produção de substâncias antimicrobianas, regulação de acidez luminal e competição com bactérias patogênicas. Esta competição pode ocorrer através da disputa por sítios de adesão, nutrientes, ou devido à própria produção de substâncias antimicrobianas (GERRITSEN J et al., 2011; RIJKERS GT et al., 2010;). Através de determinadas estratégias de alto rendimento, incluindo transcriptômica, metabolômica, proteômica e metagenômica, foi identificado que os probióticos foram capazes de modular a mucosa intestinal e as respostas imunes

450 sistêmicas, sendo capaz de conferir proteção ao hospedeiro no combate à patógenos como  
451 *Helicobacter pylori*, reduzindo seu potencial patogênico (IANNITTI T, PALMIERI B.,  
452 2010).

453       Devido ao aumento da resistência dos patógenos ao tratamento com antibióticos  
454 e a inovação limitada de novos medicamentos se faz necessária a descoberta de novas  
455 alternativas que possam proporcionar segurança e eficácia no combate aos  
456 microrganismos patogênicos formadores de biofilmes. Estudos recentes têm demonstrado  
457 que os probióticos podem ser uma alternativa interessante para esta questão  
458 (FRICKMANN et al., 2018; ISHIKAWA et al., 2020; CARVALHO et al., 2021).  
459 Evidências científicas demonstram que os probióticos podem ser efetivos no combate aos  
460 biofilmes de patógenos atuando através da modificação do ambiente circundante,  
461 tornando-o desfavorável para os patógenos através da diminuição do pH, dificultando a  
462 atividade e adesão a superfícies através da liberação de compostos inibidores de  
463 crescimento (PRABHURAJESHWAR C et al., 2017; DE MELO PEREIRA GV., 2018;  
464 KHALIGHI A, BEHDANI R, KOUHESTANI S (2016); MALDONADO NC et al.,  
465 2017).

466       Estudo que teve por objetivo avaliar a eficácia de atividades antimicrobianas e  
467 antibiofilmes de *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus sporogenes*, *Lactobacillus sp* e  
468 *Lactobacillus casei* Shirota (microrganismo probiótico exclusivo da multinacional  
469 japonesa Yakult) contra *Cronobacter sakazakii*, demonstrou um potencial de inibição de  
470 biofilme maior que 80%, após 12 horas de incubação inicial, seguidas por atividades mais  
471 fracas após 24 e 48h de incubação (50-60%) para todas as cepas testadas (JAMWAL et  
472 al.,2019). HAGER e colaboradores, concluíram que os biofilmes polimicrobianos  
473 formados por *Candida tropicalis*, *Escherichia coli* e *Serratia marcescens* foram inibidos  
474 e desestruturados pelo composto probiótico formado por *Lactobacillus acidophilus*,  
475 *Lactobacillus rhamnosus*, e *Bifidobacterium breve* acrescidos de amilase (HAGER et al.,  
476 2019). Uma revisão sistemática recente, que teve por objetivo resumir evidências atuais  
477 que sustentem os efeitos das células probióticas no controle e prevenção de doenças  
478 associadas a biofilmes, identificou que as cepas probióticas que foram mais promissoras  
479 contra diferentes grupos de patógenos foram: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus*  
480 *casei* e *Lactobacillus rhamnosus* para bactérias Gram-negativas; *Lactobacillus*

481 *fermentum* e *Lactobacillus paracasei* para bactérias Gram-positivas, e *Lactobacillus casei*  
482 e *Lactobacillus rhamnosus* para leveduras (CARVALHO et al., 2021).

483 Os mecanismos utilizados pelos lactobacilos no combate a biofilmes são diversos,  
484 sendo os principais agentes antimicrobianos relatados segundo a literatura: bacteriocinas,  
485 biosurfactantes, peróxido de hidrogênio e ácido láctico (MALDONADO NC et al., 2007;  
486 KANG MS et al., 2011; WU CC et al., 2015). Lactobacilos também demonstram bons  
487 resultados no tratamento de infecções orais, vaginais e de feridas em estudos *in vitro* e  
488 também em ensaios clínicos (VUOTTO et al., 2014). Algumas cepas de *Lactobacillus*,  
489 como *Lactobacillus casei shirota* e *Lactobacillus rhamnosus* HN001 foram capazes de  
490 inibir o crescimento e formação de biofilme de *Streptococcus mutans* através da produção  
491 de um ambiente ácido e polipeptídeos semelhantes à bacteriocina, sugerindo uma  
492 cooperação destes dois mecanismos de ação (DAWGUL, M ET AL., 2014).

493 Considerando a relevância do tema e a necessidade de terapias inovadoras, uma  
494 nova estratégia propõe o uso de probióticos como agentes antimicrobianos. Tendo em  
495 vista a importância de oferecer uma alternativa natural, acrescida do fato de que os  
496 mesmos já demonstraram importantes propriedades promotoras da saúde e são, em geral,  
497 considerados seguros para os seres humanos e meio ambiente; testar esta possibilidade se  
498 torna de extrema importância no desenvolvimento de medidas terapêuticas  
499 (CARVALHO et al., 2021). Após as evidências citadas, se torna importante avaliar a  
500 capacidade do sobrenadante de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 de atuar contra a  
501 formação de biofilmes por gêneros bacterianos de interesse para o desenvolvimento de  
502 novos métodos terapêuticos.

503

504

505

506

507

508

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral:

Avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme do sobrenadante de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 em diferentes gêneros bacterianos.

### 2.2 Objetivos específicos:

Avaliar a atividade antimicrobiana (CIM) do sobrenadante de cultivo de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 em diferentes gêneros bacterianos.

Avaliar a atividade do sobrenadante de cultivo de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 na inibição da formação de biofilmes formados por *Acinetobacter baumannii* e *Staphylococcus aureus*.

Avaliar a atividade do sobrenadante de cultivo de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 na destruição de biofilmes formados por *Acinetobacter baumannii* e *Staphylococcus aureus*.

### 3. MANUSCRITO

Manuscrito a ser submetido na revista Biofouling, ISSN: 1029-2454.

Fator de impacto: 3.797 (2021)

As normas de submissão podem ser consultadas em:  
<<https://www.tandfonline.com/action/authorSubmission?show=instructions&journalCode=gbif20>>.

**Evaluation of antimicrobial and antibiofilm activity of the supernatant of  
*Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 against *Acinetobacter baumannii* and  
*Staphylococcus aureus***

**ABSTRACT**

**Introduction:** Studies have shown that two different mechanisms can act modulating biofilm formation, namely: inhibition of bacterial surface attachment and destabilization/interruption of irreversibly adhered mature biofilms. Considering the relevance of the theme and the need for innovative therapies, a new strategy proposes the use of probiotics as antimicrobial agents. **Objective:** To evaluate the antimicrobial and antibiofilm activity of cell free supernatant (CFS) of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 on different strains of biofilm-forming bacteria. **Methodology:** Three assays were performed to evaluate the antibiofilm capacity of the CFS against *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Acinetobacter baumannii* 301, *Staphylococcus aureus* 12598 and *Staphylococcus aureus* 29213, the first of these being the minimum inhibitory concentration (MIC) assay for antimicrobial activity, followed by the inhibition assays for the formation and destruction of mature biofilms. The data were processed, and graphs prepared using GraphPad Prism 7.05 software. **Results:** All assays demonstrate a high percentage of inhibition of the bacterial activity of the pathogenic strains tested, obtaining percentage around 99% of inhibition in MIC and biofilm formation inhibition assays, and 88% mature biofilm destruction capacity, especially for *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, where we obtained the highest percentages of antibiofilm activity. **Conclusion:** *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 showed antimicrobial activity against all strains tested, and besides inhibiting biofilm formation it was also able to destroy previously formed bacterial biofilms.

**Keywords:** Biofilms; probiotics; supernatant; Drug resistance, bacterial.

## 1. INTRODUÇÃO

Biofilmes são comunidades microbianas caracterizadas pela produção de substâncias poliméricas extracelulares que favorecem a adesão às superfícies bióticas e abióticas<sup>1</sup>. Sabe-se que interações intra e interespécies de bactérias geram competição entre os microrganismos, podendo afetar o desenvolvimento de biofilmes. As bactérias em biofilmes se diferem metabolicamente das demais bactérias em suspensão isoladas em cultura pura, pois apresentam uma maior resistência aos antibióticos e desinfetantes<sup>2,3</sup>.

Em 2017 a Organização Mundial da Saúde (OMS) evidenciou algumas bactérias que se destacaram devido à sua ampla resistência a antibióticos, destacando que estas devem ter prioridade na investigação de novos fármacos. Nesta lista, os patógenos ESKAPE estão classificados como criticamente prioritários (*Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter spp.*) e altamente prioritários (*Enterococcus faecium* e *Staphylococcus aureus*) para pesquisas e descobertas que minimizem a morbimortalidade por esses agentes infecciosos<sup>4</sup>. Dois diferentes mecanismos são caracterizados como responsáveis por atuar modulando a formação de biofilmes, sendo estes: inibição da fixação da superfície bacteriana e desestabilização /interrupção de biofilmes maduros irreversivelmente aderidos. Neste estudo, ambas hipóteses foram testadas<sup>1</sup>.

Evidências científicas demonstram que os probióticos podem ser efetivos no combate a biofilmes de patógenos atuando através da modificação do ambiente circundante<sup>5,6,7,8</sup>. Uma revisão sistemática recente, que teve por objetivo resumir evidências atuais que sustentem os efeitos das células probióticas no controle e prevenção de doenças associadas a biofilmes, identificou que as cepas probióticas que foram mais promissoras contra diferentes grupos de patógenos foram: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus rhamnosus* para bactérias Gram-negativas; *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus paracasei* para bactérias Gram-positivas, e *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus rhamnosus* para leveduras<sup>9</sup>. Os mecanismos utilizados por *Lactobacillus* no combate a biofilmes são diversos, sendo os principais agentes antimicrobianos relatados segundo a literatura: bacteriocinas, biosurfactantes, peróxido de hidrogênio e ácido láctico<sup>8,10-11</sup>.

Considerando a relevância do tema e a necessidade de terapias inovadoras, uma nova estratégia propõe o uso de probióticos como agentes antimicrobianos. Tendo em vista a importância de oferecer uma alternativa natural, acrescida do fato de que os mesmos já demonstraram importantes propriedades promotoras da saúde e são, em geral, considerados seguros para os seres humanos e meio ambiente, testar esta possibilidade se torna de extrema importância no desenvolvimento de medidas terapêuticas<sup>9</sup>. Sendo assim, este trabalho tem por objetivo avaliar a capacidade de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 de atuar contra a atividade bacteriana e formação/destruição de biofilmes por gêneros bacterianos de interesse para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1 Cultivo de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 e obtenção do sobrenadante

O probiótico *L. rhamnosus* ATCC 7649, obtido através da Fundação Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro (FIOCRUZ), foi cultivado em 250ml de meio Man Rogosa and Sharpe (MRS - ACUMEDIA) e incubado por 24h em incubadora com agitação orbital Tecnal 420, à 37°C. Em seguida o produto foi centrifugado à 4000 rpm, por 15 minutos. Após, foi feita a separação do sobrenadante (CFS – Cell free supernatant), e o mesmo foi filtrado com membrana 0,22µm (Millipore®) para que se encontrasse livre de células. Foi então obtido o produto pronto para ser testado.

### 2.2 Bactérias produtoras de biofilmes

As bactérias utilizadas no estudo foram: *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Acinetobacter baumannii* 301, *Staphylococcus aureus* ATCC 12598 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, obtidas do Banco de Cepas do Núcleo de Desenvolvimento de Novos Fármacos (NUDEFA) da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande – FURG. As bactérias foram repicadas em placas de Mueller Hinton ágar e incubadas a 37°C por 24 horas. Após esta etapa, preparou-se o inóculo para os ensaios de

atividade antimicrobiana, e posteriormente através do mesmo método, foram preparados inóculos para cada ensaio de atividade antibiofilme.

### **2.3 Ensaio de atividade antimicrobiana - Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)**

O procedimento foi realizado segundo os critérios do Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI)<sup>12</sup>. Resumidamente, os inóculos foram preparados diluindo cada suspensão bacteriana (ajustada à escala 0,5 de McFarland) em meio Mueller Hinton na proporção 1:100, resultando em uma concentração final de aproximadamente  $5 \times 10^5$  UFC/mL em cada poço. A concentração inibitória mínima (CIM), do CFS foi determinada em placas de microtitulação de fundo plano de poliestireno com 96 poços (CRAL<sup>®</sup>), por ensaio de microdiluição seriada de base 2, entre 1:2 e 1:16 usando a faixa de 50 a 6,25 µL do probiótico, em um volume total de 100 µL (semelhante a Jamwal et al. 2019).

Como controles negativos foram usados meio Mueller Hinton puro, e meio Mueller Hinton acrescido de CFS, enquanto meios de cultura Mueller Hinton com 50 µL de inóculo de cada uma das bactérias formadoras de biofilmes foram usados como controles positivos. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e a absorbância foi medida à 620 nm usando o leitor de placas (Thermo plate TP-reader BioTek Elx800<sup>®</sup>).

### **2.4 Ensaio de atividade antibiofilme: inibição da formação de biofilme**

Neste ensaio, as cepas foram expostas a diferentes concentrações de CFS antes da indução da formação de biofilme, para determinar se o probiótico seria capaz de inibir a formação do biofilme. Para este ensaio, foram selecionadas as seguintes cepas: *Acinetobacter baumannii* 301, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Staphylococcus aureus* ATCC 12598 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

A partir do crescimento em Mueller Hinton (MH), foi preparada uma suspensão bacteriana de cada cepa enriquecida com 0,2% de glicose, com concentração final de  $1 \times 10^6$  UFC/mL (CLSI, 2015). Cem microlitros de suspensão foram transferidos para uma microplaca de fundo plano de poliestireno de 96 poços (CRAL<sup>®</sup>), onde foram expostos

693 às concentrações de probióticos, previamente determinados no ensaio de atividade  
694 antimicrobiana.

695 As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C, para determinar se haveria  
696 formação de biofilme. Em seguida, foram realizadas as etapas de lavagem, fixação e  
697 coloração do biofilme, e as placas foram deixadas para secar. Após secagem, acrescentou-  
698 se 100 µL de etanol 100% em cada poço, e a quantificação do biofilme foi realizada  
699 através da medição da densidade óptica em 620nm (HALICKI et al., 2019).

700

## 701 **2.5 Ensaio de atividade antibiofilme: destruição de biofilmes**

702

703 Neste ensaio, a etapa de formação do biofilme bacteriano foi realizada  
704 previamente e as células aderidas foram expostas a diferentes concentrações do CFS a  
705 fim de avaliar sua capacidade de destruição dos biofilmes formados. Após realização das  
706 etapas para preparo dos inóculos, conforme metodologia descrita no ensaio anterior, as  
707 placas foram incubadas por 24 horas a 37°C, para a formação de biofilmes. A seguir, o  
708 conteúdo dos poços foi removido e feita lavagem com PBS 1x para eliminar as células  
709 não aderidas. Em seguida, adicionou-se 100 µL de MH enriquecido com 0,2% de glicose  
710 contendo as concentrações 1:2, 1:4 e 1:8 de CFS. As placas foram então incubadas por  
711 mais 24 horas a 37°C, e as etapas de lavagem, fixação e coloração do biofilme realizadas  
712 na sequência. A quantificação da formação de biofilme foi realizada medindo a DO em  
713 620nm, conforme metodologia descrita anteriormente.

714

## 715 **2.6 Processamento de dados**

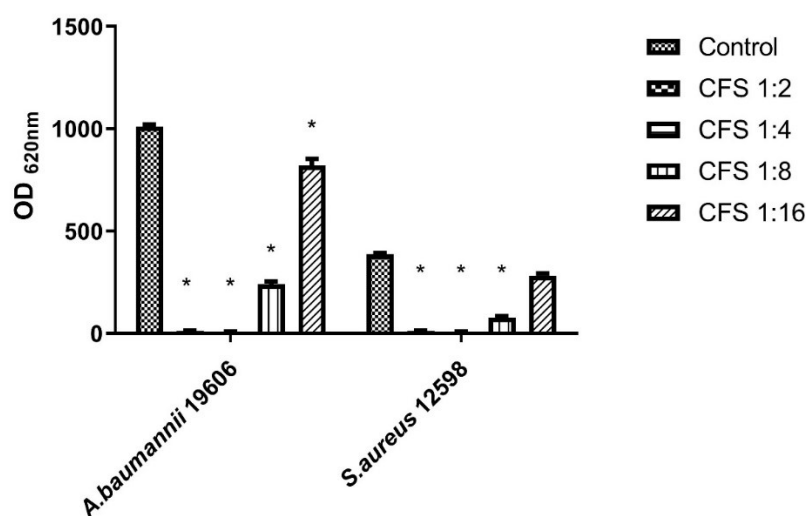
716 Os experimentos foram realizados em quadruplicatas, e os dados foram  
717 processados segundo valores médios e desvio padrão. Para análise estatística, ANOVA  
718 de uma via foi usado, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Valores  
719 de  $p \leq 0.05$  foram considerados estatisticamente significativos. Os gráficos foram  
720 construídos com o software GraphPad Prism 7.05.

721

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Ensaio de atividade antimicrobiana (CIM)

Os resultados do ensaio de atividade antimicrobiana demonstram alto percentual de inibição das cepas formadoras de biofilmes quando cultivadas com o sobrenadante de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469, conforme figura 1.



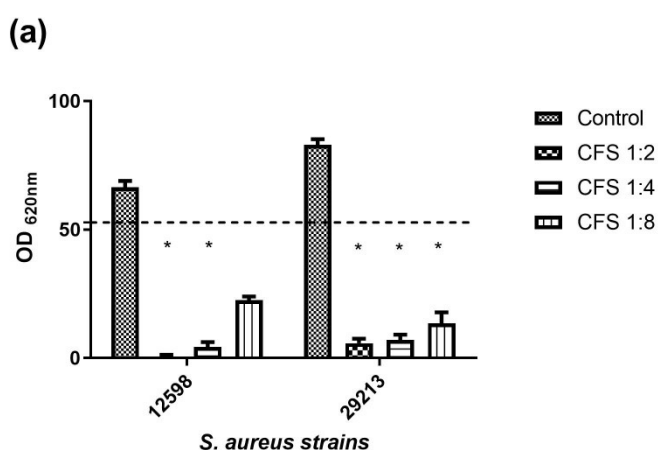
**Figura 1:** Atividade antimicrobiana do sobrenadante de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7649, sobre bactérias formadoras de biofilme. Os dados representam a densidade óptica média de crescimento de *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, e *Staphylococcus aureus* ATCC 12598. A sigla (CFS) significa sobrenadante. Asteriscos (\*) significam diferença estatística significativa ( $p \leq 0.05$ ) em relação ao grupo controle.

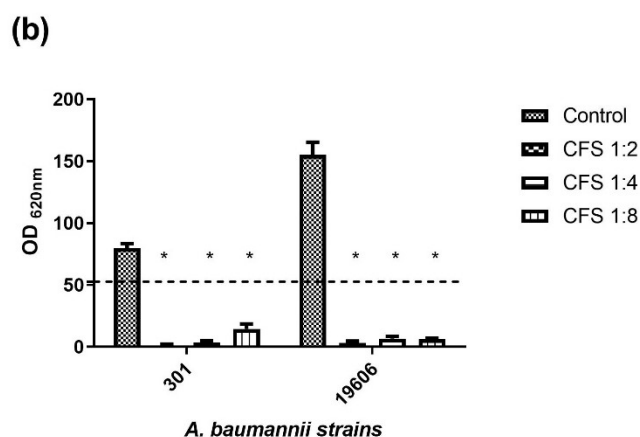
Podemos observar neste ensaio, um elevado percentual de inibição de crescimento para as bactérias quanto utilizadas as concentrações 1:2 e 1:4 de CFS ambas apresentando resultados semelhantes, atingindo em torno de 99% de inibição de atividade bacteriana. Na concentração 1:8 também houve resultados importantes, variando de 76 (*Acinetobacter baumannii* ATCC 19606) a 79% (*Staphylococcus aureus* 12598). As concentrações 1:2, 1:4 e 1:8 demonstraram diferença estatística significativa em relação ao controle das bactérias testadas ( $p \leq 0.001$ ). Na concentração 1:16 encontramos os menores percentuais de inibição, encontrando diferença estatística significativa em

relação ao controle apenas para a bactéria *Acinetobacter baumannii* 19606 ( $P \leq 0.05$ ). A concentração 1:16 não foi selecionada para os testes posteriores de atividade antibiofilme. Para os ensaios de inibição e destruição de biofilmes acrescentou-se duas cepas, sendo estas: o isolado clínico *Acinetobacter baumannii* 301, e a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Todas as cepas utilizadas foram identificadas neste estudo como produtoras de biofilmes.

### 3.2 Ensaio de atividade antibiofilme: inibição da formação de biofilme

Os resultados do ensaio de inibição da formação de biofilme demonstram alto percentual de inibição da formação de biofilme pelas cepas: *Acinetobacter baumannii* 301, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Staphylococcus aureus* ATCC 12598 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Neste ensaio, encontramos os maiores percentuais de inibição, em geral, nas concentrações 1:2 e 1:4. Na concentração 1:8, os resultados variaram de 66,17% para *Staphylococcus aureus* 12598 a 96,94% para *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606. Foi encontrada diferença estatística significativa entre as concentrações 1:2, 1:4 e 1:8 em relação aos controles para todas as bactérias testadas ( $p \leq 0.001$ ) conforme figura 2.

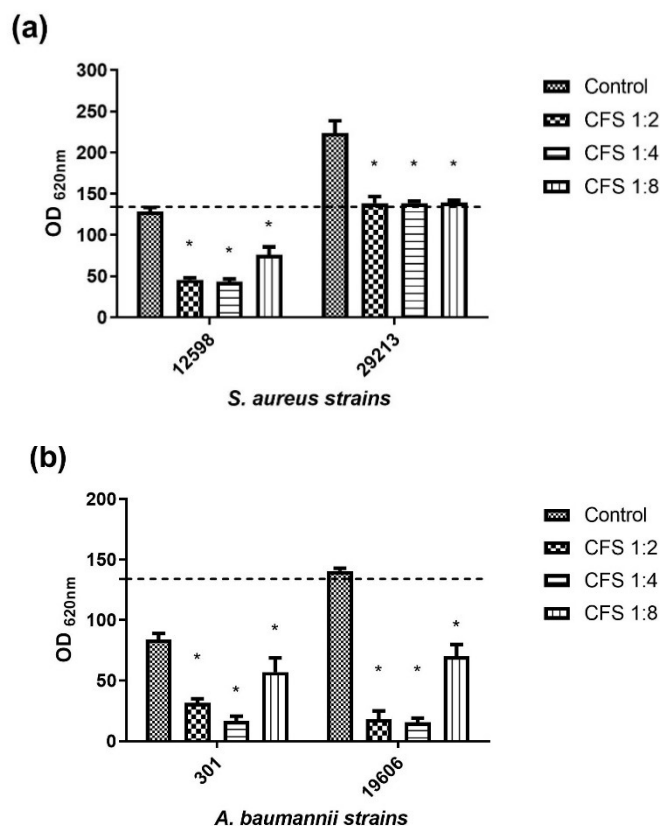




**Figura 2:** Inibição da formação de biofilme pelo sobrenadante de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7649. Os dados representam a densidade óptica média de biofilme de *Staphylococcus aureus* ATCC 12598, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Acinetobacter baumannii* 301 e *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606. **(a)** resultado de inibição para as cepas de *Staphylococcus aureus*, com uma linha de marcação demonstrando o ponto de corte da produção de biofilme; **(b)** resultado de inibição para as cepas de *Acinetobacter baumannii* com uma linha de marcação demonstrando o ponto de corte da produção de biofilme. Asteriscos (\*) significam diferença estatística significativa ( $p \leq 0.05$ ) em relação ao grupo controle.

### 3.3 Ensaio de atividade antibiofilme: destruição de biofilmes

Foram observados resultados de destruição de biofilme que variaram de 24,75 a 88,11%, sendo os maiores resultados observados nas concentrações 1:2 e 1:4. Encontrou-se diferença estatística significativa entre as concentrações 1:2, 1:4 e 1:8 em relação ao controle para todas as bactérias testadas ( $p < 0.001$  até a concentração 1:4), conforme figura 3.



**Figura 3:** Destruição de biofilme pelo sobrenadante de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7649. Os dados representam a densidade óptica média do biofilme de *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Acinetobacter baumannii* 301, *Staphylococcus aureus* ATCC 12598 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. **(a)** resultado de destruição das cepas de *Staphylococcus aureus*, com uma linha de marcação demonstrando o ponto de corte da forte produção de biofilme; **(b)** resultado de destruição das cepas de *Acinetobacter baumannii*, com uma linha de marcação demonstrando o ponto de corte da forte produção de biofilme; Asteriscos (\*) significam diferença estatística significativa ( $p \leq 0.05$ ) em relação ao grupo controle.

#### 4. DISCUSSÃO

Foi observado um importante desempenho do sobrenadante do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 sobre a atividade bacteriana e formação de biofilmes de todas as cepas testadas. No primeiro ensaio realizado, testou-se a atividade antibacteriana do probiótico quando cultivado em conjunto com as demais bactérias,

tendo sido observado um percentual de inibição gerado pelo probiótico acima de 97% para todas as cepas, quando em concentração 1:2. Na literatura, encontramos resultados semelhantes, os quais observaram que *Lactobacillus casei* NA-2, através da produção de um exopolissacarídeo (EPS-cn2), promoveu elevada atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* O157:H7, ocasionando morte de mais de 99% após 24h<sup>13</sup>.

Após o elevado efeito observado no ensaio de atividade antibacteriana, concretizando a hipótese de que o CFS possui importante atividade como inibidor do crescimento de cepas patogênicas, partimos para os testes de atividade antibiofilme. Nos ensaios de inibição da formação de biofilmes, novamente podemos observar resultados importantes contra todas as cepas testadas, com valores acima de 90% para todas as bactérias. Em estudo que avaliou a ação de CFS de *L. rhamnosus* SHA113 sobre *S. aureus* sensível à drogas (ATCC 29213) e *S. aureus* multirresistente (ZBQ006), foi observada *in vitro* uma inibição de 79%, sendo que a ação sobre a cepa multirresistente foi significativamente maior quando comparada à cepa sensível à drogas, demonstrando que o probiótico pode ser ainda mais eficiente nesta questão<sup>14</sup>. No presente estudo, encontramos resultados similares, tendo os maiores percentuais de inibição sobre a cepa de *A. baumannii* ATCC 19606, caracterizada como forte produtora de biofilme, em comparação com a cepa *A. baumannii* 301, fraca produtora.

Os mecanismos atribuídos aos probióticos para seu efeito antibiofilme são diversos e característicos de cada cepa. No caso de *L. casei* NA-2, os autores evidenciam que parte de sua atividade antibacteriana se deve à presença de um exopolissacarídeo (EPS) produzido por cepas mesófilas de *Lactobacillus* como (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *L. rhamnosus* and *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. sakei*, *L. casei*, etc.) e termófilas (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. helveticus* and *Streptococcus*)<sup>13</sup>. Estudo realizado com *L. rhamnosus* SHA113 com objetivo de inibir o crescimento de diferentes cepas de *S. aureus*, foram observadas substâncias ativas no sobrenadante com propriedades insolúveis e de alta aderência às placas de cultivo, sugerindo a presença de polissacarídeos, entretanto, são necessários mais estudos para tal comprovação<sup>14</sup>.

No nosso estudo podemos observar altos percentuais de inibição nos ensaios de atividade antibacteriana e inibição de biofilme, demonstrando a possibilidade de o mecanismo de ação do CFS possa estar vinculado a inibição do fator *quorum-sensing*. O *quorum-sensing* é definido como um mecanismo de comunicação celular dependente de

densidade capaz de regular a produção de biofilme bem como fatores de virulência bacterianos<sup>15</sup>. Uma ação anti-*quorum sensing* já foi observada quando o sobrenadante de *L. plantarum* foi testado sobre espécie de bactéria Gram-negativa, tendo sido identificados oito grupos de moléculas: ésteres, ácidos graxos, álcoois, ácidos, surfactantes, barbitúricos, compostos fenólicos, autoindutores tipo 2 e derivados, os quais estariam relacionados ao efeito pró-cicatrizante e antipatogênico<sup>16</sup>.

O autoindutor-2 (AI-2) é um sinalizador universal para *quorum-sensing*, utilizado tanto por bactérias Gram-negativas quanto por bactérias Gram-positivas, capaz de desempenhar um papel essencial na comunicação bacteriana<sup>17</sup>. Evidências científicas demonstram que a atividade AI-2 foi altamente inibida em *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) O157:H7 na presença de extrato de célula de *Lactobacillus acidophilus* 30SC<sup>18</sup>. ONBAS et al., em estudo que também utilizou a espécie *L. plantarum*, identificou a capacidade do probiótico em inibir a atividade de microrganismos patogênicos associados à infecções de feridas através da inibição de Quorum-sensing e fatores de virulência<sup>19</sup> corroborando com os achados deste estudo e demonstrando um importante mecanismo de ação utilizado por cepas de *Lactobacillus* no combate à biofilmes.

Quanto à espécie *L. rhamnosus*, sabe-se pouco sobre os mecanismos relacionados a sua atividade antibacteriana. Em estudo que avaliou o potencial de inibição de *quorum-sensing* de *E.coli* K12MG165 ATCC 47076 por microcápsulas de *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 (LGG), foi observado efeito importante na inibição da formação, bem como na destruição de biofilmes maduros, atribuindo este efeito à uma inibição de fatores transcricionais do circuito de detecção de quórum em *E.coli*, (LuxS, IsrK, e IsrR). Os autores sugerem que este resultado possa ser devido a excreção de um composto pelo LGG capaz de atuar contra *E.coli*, causando alterações em seu nível de transcrição, sugerindo que este composto possa ser uma molécula de sinalização de AI-2<sup>20</sup>. Em suma, nosso trabalho identificou importante atividade antibiofilme de CFS de *L. rhamnosus* ATCC 7469, reforçando a importância de maiores estudos com esta espécie visando identificar os mecanismos de ação atribuídos a este efeito.

## 5. CONCLUSÕES

Podemos concluir que o CFS de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469, possui potencial efeito como agente antimicrobiano contra os gêneros bacterianos produtores de biofilmes testados neste estudo, evidenciando uma possível alternativa capaz de atuar isoladamente ou em conjunto com antibióticos no tratamento das patologias ocasionadas por estes microrganismos.

## 6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos laboratórios de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal do Rio Grande-FURG, pela disponibilização do espaço físico e materiais necessários para realização dos experimentos, bem como ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde da FURG, por garantir os meios necessários para que este trabalho fosse executado.

## 7. DECLARAÇÃO DE CONFIRMAÇÃO/CONTRIBUIÇÃO DE AUTORIA

Mariana Silveira Mello Silva: redação- rascunho original, elaboração do manuscrito, discussão dos resultados, conceitualização, curadoria de dados, investigação.

Daniela Fernandes Ramos: metodologia, redação – revisão e edição, conceitualização, discussão dos resultados, análise formal, investigação.

Luciana Farias Costa de Ávila: redação – revisão e edição, conceitualização, elaboração do manuscrito, discussão dos resultados, investigação.

## 8. DECLARAÇÃO DE DIVULGAÇÃO

Esta pesquisa foi realizada na ausência de qualquer relação comercial ou financeira. Os autores declaram não existirem conflitos de interesse.

## 9. INFORMAÇÃO DE FINANCIAMENTO

Os autores não receberam nenhum apoio financeiro para a pesquisa, autoria e/ou publicação deste artigo.

## Bibliografia

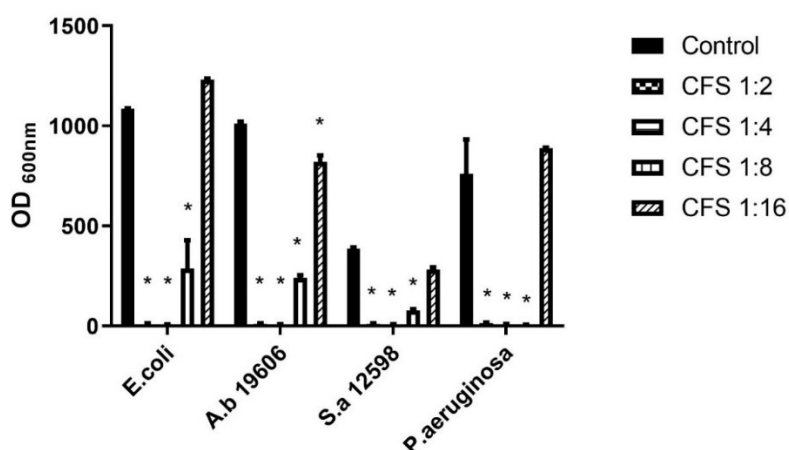
- 1- Miquel, S., Lagrèfeuille, R., Souweine, B., Forestier, C. Anti-biofilm activity as a health issue. *Front. Microbiol.* 7, 592 (2016).  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00592>.
- 2- Frieri M, Kumar K, Boutin A. Antibiotic resistance. *J Infect Public Health.* 2017 Jul-Aug;10(4):369-378. doi: 10.1016/j.jiph.2016.08.007. Epub 2016 Sep 6. PMID: 27616769.
- 3- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999 May 21;284(5418):1318-22. doi: 10.1126/science.284.5418.1318. PMID: 10334980.
- 4- World Health Organization/cdc/icbdsr. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. Geneva: World Health Organization; 2017. Available from: <http://www.who.int/medicines/publications/global-prioritylist-antibiotic-resistant-bacteria/en/>. Last accessed: 01/03/2022.
- 5- Prabhurajeshwar C, Chandrakanth RK. Probiotic potential of Lactobacilli with antagonistic activity against pathogenic strains: An in vitro validation for the production of inhibitory substances. *Biomed J.* 2017 Oct;40(5):270-283. doi: 10.1016/j.bj.2017.06.008. Epub 2017 Nov 10. PMID: 29179882; PMCID: PMC6138816.
- 6- de Melo Pereira GV, de Oliveira Coelho B, Magalhães Júnior AI, Thomaz-Soccol V, Soccol CR. How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. *Biotechnol Adv.* 2018 Dec;36(8):2060-2076. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.09.003. Epub 2018 Sep 26. PMID: 30266342.
- 7- Khalighi A, Behdani R, Kouhestani S. Probiotics: A Comprehensive Review of Their Classification, Mode of Action and Role in Human Nutrition. *Probiotics and*

- Prebiotics in Human Nutrition and Health [Internet]. 2016 Jul 13; Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/63646>. Last accessed: 01/03/2022.
- 8- Maldonado NC, Silva de ruiz C, Cecilia M, et al. (2007).A simple technique to detect *Klebsiella* biofilm-forming-strains. Inhibitory potential of *Lactobacillus fermentum* CRL 1058 whole cells and products, In: Méndez-Vilas A, Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology, Formatex, 52–59.
  - 9- Carvalho F.M.,Teixeira-santos, R., Mergulhão F.J.M., Gomes L.C. Targeting biofilms in medical devices using probiotic cells: a systematic. *AIMS Materials Science*, 8(4): 501–523. DOI: 10.3934/maternal.2021031
  - 10- Kang MS, Oh JS, Lee HC, et al. Inhibitory effect of *Lactobacillus reuteri* on periodontopathic and cariogenic bacteria. *J Microbiol*. 2011 Apr;49(2):193-9. doi: 10.1007/s12275-011-0252-9. Epub 2011 May 3. PMID: 21538238.
  - 11- Wu CC, Lin CT, Wu CY, et al. Inhibitory effect of *Lactobacillus salivarius* on *Streptococcus mutans* biofilm formation. *Mol Oral Microbiol*. 2015 Feb;30(1):16-26. doi: 10.1111/omi.12063. Epub 2014 Sep 8. PMID: 24961744.
  - 12- Clinical laboratory standards institute (CLSI). 2015. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. CLSI, Wayne, PA
  - 13- Xu x, Peng Q, Zhang Y, et al. A novel exopolysaccharide produced by *Lactobacillus coryniformis* NA-3 exhibits antioxidant and biofilm-inhibiting properties in vitro. *Food Nutr Res*. 2020 Apr 3;64. doi: 10.29219/fnr.v64.3744. PMID: 32425737; PMCID: PMC7217292
  - 14- G. liu, B. Pang, N. Li, et al. Therapeutic effect of *Lactobacillus rhamnosus* SHA113 on intestinal infection by multi-drug-resistant *Staphylococcus aureus* and its underlying mechanisms. *Food Funct.*, 2020, DOI: 10.1039/D0FO00969E
  - 15- Eickhoff MJ, Bassler BL. SnapShot: Bacterial Quorum Sensing. *Cell*. 2018 Aug 23;174(5):1328-1328.e1. doi: 10.1016/j.cell.2018.08.003. PMID: 30142348.
  - 16- Ramos AN, Sesto cabral ME, Arena ME, et al. Compounds from *Lactobacillus plantarum* culture supernatants with potential pro-healing and anti-pathogenic properties in skin chronic wounds. *Pharm Biol*. 2015 Mar;53(3):350-8. doi: 10.3109/13880209.2014.920037. Epub 2014 Oct 27. PMID: 25347359.

- 17- Whiteley M, Diggle SP, Greenberg EP. Progress in and promise of bacterial quorum sensing research. *Nature*. 2017 Nov 15;551(7680):313-320. doi: 10.1038/nature24624. Erratum in: *Nature*. 2018 Feb 28;555(7694):126. PMID: 29144467; PMCID: PMC5870893.
- 18- Kim J, Kim J, Kim Y, Oh S, Song M, Choe JH, Whang KY, Kim KH, Oh S. Influences of quorum-quenching probiotic bacteria on the gut microbial community and immune function in weaning pigs. *Anim Sci J*. 2018 Feb;89(2):412-422. doi: 10.1111/asj.12954. Epub 2017 Nov 20. PMID: 29154473.
- 19- Onbas, T., Osmanagaoglu, O.,Kiran, F. (2019). Potential Properties of *Lactobacillus plantarum* F-10 as a Bio-control Strategy for Wound Infections. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 11. 10.1007/s12602-018-9486-8.
- 20- Song H, Zhang J, Qu J,et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG microcapsules inhibit *Escherichia coli* biofilm formation in coculture. *Biotechnol Lett*. 2019 Sep;41(8-9):1007-1014. doi: 10.1007/s10529-019-02694-2. Epub 2019 May 30. PMID: 31147809.

#### 4. RESULTADOS COMPLEMENTARES

Os resultados do ensaio de atividade antimicrobiana demonstram alto percentual de inibição da formação das cepas patogênicas quando cultivadas em conjunto com o sobrenadante de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469, conforme figura 2.



**Figura 2:** Atividade antimicrobiana do sobrenadante de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7649, sobre bactérias patogênicas formadoras de biofilme. Os dados representam a densidade óptica média de crescimento de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Staphylococcus aureus* ATCC 12598 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442. A sigla (CFS) significa sobrenadante. Asteriscos (\*) significam diferença estatística significativa ( $p \leq 0.05$ ) em relação ao grupo controle.

## 5. CONCLUSÕES GERAIS

Conclui-se que o probiótico *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 possui importante atividade antibacteriana contra as cepas *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 e antibiofilme contra as cepas *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Acinetobacter baumannii* 301, *Staphylococcus aureus* ATCC 12598 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Nossos resultados demonstram a importância de maiores estudos com essa substância, visando uma possível alternativa terapêutica para o tratamento de infecções causadas por estes microrganismos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANUBHAV JAMWAL, KAVITA SHARMA, RAJNI CHAUHAN, SAURABH BANSAL, GUNJAN GOEL. Evaluation of commercial probiotic lactic cultures against biofilm formation by *Cronobacter sakazakii*. <https://doi.org/10.5217/ir.2018.00106> Intest Res 2019;17(2):192-201
- BE NA, ALLEN JE, BROWN TS, GARDNER SN, MCLOUGHLIN KS, FORSBERG JA, KIRKUP BC, CHROMY BA, LUCIW PA, ELSTER EA, JAING CJ (2014) Microbial profiling of combat wound infection through detection microarray and next-generation sequencing. J Clin Microbiol 52(7):2583–2594. <https://doi.org/10.1128/JCM.00556-14>
- CARVALHO F.M., TEIXEIRA-SANTOS, R., MERGULHÃO F.J.M., AND GOMES L.C. Targeting biofilms in medical devices using probiotic cells: a systematic. AIMS Materials Science, 8(4): 501–523. DOI: 10.3934/materci.2021031
- CDC. ANTIBIOTIC RESISTANCE THREATS IN THE UNITED STATES, 2019. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC; 2019. Available online: The full 2019 AR Threats Report, including methods and appendices, is available online at [www.cdc.gov/DrugResistance/Biggest-Threats.html](http://www.cdc.gov/DrugResistance/Biggest-Threats.html). DOI: <http://dx.doi.org/10.15620/cdc:82532>.
- CHRISTOPHER L. HAGER, A NANCY ISHAM, A KORY P. SCHROM, B JYOTSNA CHANDRA, A THOMAS MCCORMICK, A MASARU MIYAGI, C MAHMOUD A. GHANNOUM. Effects of a Novel Probiotic Combination on Pathogenic Bacterial-Fungal Polymicrobial Biofilms. *mbio.asm.org*. March/April 2019 Volume 10 Issue 2 e00338-19
- CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). 2015. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. CLSI, Wayne, PA
- COSTERTON, J. W. ET AL. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science, 284, pp. 1318-1322

- 1080 DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. Nat Rev Drug  
1081 Discov, v. 2, n. 2, p. 114-22, 2003.
- 1082 DAWGUL, M., MACIEJEWSKA, M., JASKIEWICZ, M., KARAFOVA, A., AND  
1083 KAMYSZ, W. (2014). Antimicrobial peptides as potential tool to fight bacterial biofilm.  
1084 Acta Pol. Pharm. 71, 39–47
- 1085 DE MELO PEREIRA GV, DE OLIVEIRA COELHO B, MAGALHÃES JÚNIOR AI, et  
1086 al. (2018) How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria.  
1087 Biotechnol Adv 36: 2060–2076
- 1088 EICKHOFF MJ, BASSLER BL. 2018. SnapShot: bacterial quorum sensing. Cell.  
1089 174:1328–1328e1. doi:10.1016/j.cell.2018.08. 003
- 1090 FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS,  
1091 WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Evaluation of health and nutritional properties*  
1092 *of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria*. Córdoba, 2001.  
1093 34p. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probioreport\_en.pdf>. Acesso em: 03  
1094 fev. 2005.
- 1095 FRICKMANN H., KLENK C., WARNKE1 P., REDANZI S.,PODBIELSKI A.  
1096 Influence of Probiotic Culture Supernatants on In Vitro Biofilm Formation of  
1097 Staphylococci. European Journal of Microbiology and Immunology 8(2018)4, pp. 119–  
1098 127 First published online: 28 September 2018.
- 1099 FRIERI M, KUMAR K, BOUTIN A. Antibiotic resistance. J Infect Public Health. 2017  
1100 Jul-Aug;10(4):369-378. doi: 10.1016/j.jiph.2016.08.007. Epub 2016 Sep 6. PMID:  
1101 27616769.
- 1102 G. LIU, B. PANG, N. LI, H. JIN, J. LI, W. WU, C. AI, C. Jiang and J. Shi, Food Funct.,  
1103 2020, DOI: 10.1039/D0FO00969E
- 1104 GERRITSEN J, SMIDT H, RIJKERS GT, DE VOS WM. Intestinal microbiota in human  
1105 health and disease: the impact of probiotics. Genes Nutr. 2011;6(3):209–40.
- 1106 HALICKI PCB, RADIN V, VON GROLL A, NORA MV, PINHEIRO AC, DA SILVA  
1107 PEA, RAMOS DF. Antibiofilm Potential of Arenecarbaldehyde 2-Pyridinylhydrazone  
1108 Derivatives Against Acinetobacter baumannii. Microb Drug Resist. 2020

- 1109 Dec;26(12):1429-1436. doi: 10.1089/mdr.2019.0185. Epub 2019 Nov 26. PMID:  
1110 31770073.
- 1111 HAMIDIAN M, BLASCO L, TILLMAN LN, TO J, TOMAS M, MYERS GSA. Analysis  
1112 of complete Genome Sequence Of *Acinetobacter baumannii* Strain ATCC 19606 Reveals  
1113 Novel Mobile Genetic Elements and Novel Prophage. *Microorganisms*. 2020 Nov  
1114 24;8(12):1851. Doi: 10.3390/microorganisms8121851. PMID: 33255319;  
1115 PMCID:PMC7760358.
- 1116 IANNITTI T, PALMIERI B. Therapeutical use of probiotic formulations in clinical  
1117 practice. *Clin Nutr*. 2010;29(6):701–725. doi:10.1016/j.clnu.2010.05.004
- 1118 ISHIKAWA K. I, MITA, D., KAWAMOTO, D., NICOLI, J.R., ALBUQUERQUE-  
1119 SOUZA, E., SIMIONATO M.R.L., & MAYER M.P.A (2020) Probiotics alter biofilm  
1120 formation and the transcription of *Porphyromonas gingivalis* virulence-associated genes,  
1121 *Journal of Oral Microbiology*, 12:1, 1805553, DOI: 10.1080/20002297.2020.1805553
- 1122 KANG MS, OH JS, LEE HC, et al. (2011) Inhibitory effect of *Lactobacillus reuteri* on  
1123 periodontopathic and cariogenic bacteria. *J Microbiol* 49: 193–199.
- 1124 KHALIGHI A, BEHDANI R, KOUHESTANI S (2016) Probiotics: A comprehensive  
1125 review of their classification, mode of action and role in human nutrition, In: Rao V, Rao  
1126 L, *Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health*, Croatia: InTech, 10: 63646
- 1127 KIM J, KIM J, KIM Y, OH S, SONG M, CHOE JH, WHANG KY, KIM KH, OH S.  
1128 Influences of quorum-quenching probiotic bacteria on the gut microbial community and  
1129 immune function in weaning pigs. *Anim Sci J*. 2018 Feb;89(2):412-422. doi:  
1130 10.1111/asj.12954. Epub 2017 Nov 20. PMID: 29154473.
- 1131 LAN MA, XIAOQING XU, QING PENG, SHUO YANG, YUWEI ZHANG, DANDAN  
1132 TIAN, LINBO SHI, YU QIAO, BO SHI, Exopolysaccharide from *Lactobacillus casei*  
1133 NA-2 attenuates *Escherichia coli* O157:H7 surface adhesion via modulation of membrane  
1134 surface properties and adhesion-related gene expression, *Microbial Pathogenesis*,  
1135 Volume 173, Part A, 2022, 105863, ISSN 0882-4010,  
1136 <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105863>.
- 1137 MALDONADO NC, SILVA DE RUIZ C, CECILIA M, ET AL. (2007) A simple  
1138 technique to detect *Klebsiella* biofilm-forming-strains. Inhibitory potential of

- 1139 *Lactobacillus fermentum* CRL 1058 whole cells and products, In: Méndez-Vilas A,  
1140 Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied  
1141 Microbiology, Formatex, 52–59.
- 1142 MIQUEL S, LAGRAFEUILLE R, SOUWEINE B and FORESTIER C (2016) Anti-  
1143 biofilm Activity as a Health Issue. *Front. Microbiol.* 7:592. doi:  
1144 10.3389/fmicb.2016.00592
- 1145 MIQUEL, S., LAGRAFEUILLE, R., SOUWEINE, B. & FORESTIER, C. Anti-biofilm  
1146 activity as a health issue. *Front. Microbiol.* 7, 592 (2016).
- 1147 MUSSO N, CARUSO G, BONGIORNO D, GRASSO M, BIVONA DA, CAMPANILE  
1148 F, CARACI F, STEFANI S. Different Modulatory Effects of four Methicillin-Resistant  
1149 *Staphylococcus aureus* clones on MG-63 Osteoblast-Like Cells. *Biomolecules*, 2021 Jan  
1150 7;11(1):72. Doi: 10.3390/biom11010072. PMID: 33430251; PMCID: PMC7825699.
- 1151 ONBAS, TUGCE & OSMANAGAOGLU, OZLEM & KIRAN, FADIME. (2019).  
1152 Potential Properties of *Lactobacillus plantarum* F-10 as a Bio-control Strategy for Wound  
1153 Infections. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 11. 10.1007/s12602-018-9486-8.
- 1154 PRABHURAJESHWAR C, CHANDRAKANTH RK (2017) Probiotic potential of  
1155 lactobacilli with antagonistic activity against pathogenic strains: An in vitro validation  
1156 for the production of inhibitory substances. *Biomed J* 40: 270–283.
- 1157 RAISIN (2015). Available at: <http://www.invs.sante.fr/Publications-et-outils/R-apports-et-syntheses/Maladies-infectieuses/2015/Enquete-nationale-de-prevalence-des-infections-nosocomiales-et-des-traitements-anti-infectieux-en-etablissements-d-hospitalisation-a-domicile-HAD-France-mai-juin-2012> [accessed December 21, 2015].
- 1161 RAMOS AN, SESTO CABRAL ME, ARENA ME, ARRIGHI CF, ARROYO  
1162 AGUILAR AA, VALDÉZ JC. Compounds from *Lactobacillus plantarum* culture  
1163 supernatants with potential pro-healing and anti-pathogenic properties in skin chronic  
1164 wounds. *Pharm Biol.* 2015 Mar;53(3):350-8. doi: 10.3109/13880209.2014.920037. Epub  
1165 2014 Oct 27. PMID: 25347359.
- 1166 RENDUELES, O., AND GHIGO, J.-M. (2015). Mechanisms of competition in biofilm  
1167 communities. *Microbiol. Spectr.* 3, 1–18. doi: 10.1128/microbiolspec.MB-0009-2014

- 1168 RIJKERS GT, BENGMARK S, ENCK P, HALLER D, HERZ U, KALLIOMAKI M, ET  
 1169 AL. Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics: current  
 1170 status and recommendations for future research. *J Nutr.* 2010;140(3):671S–6S
- 1171 SARIKHANI M., KERMANSHAHI R.K, GHADAM P., GHARAVI, S. The role of  
 1172 probiotic *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 bacteriocin on effect of HBsu on  
 1173 planktonic cells and biofilm formation of *Bacillus subtilis*. *Biomac*(2017),  
 1174 doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.03.087.
- 1175 SHI, L. H. et al. Beneficial Properties of Probiotics. *Tropical Life Sciences Research*,  
 1176 [s.l.], v. 27, n. 2, p.73-90, 2016
- 1177 SONG H, ZHANG J, QU J, LIU J, YIN P, ZHANG G, SHANG D. *Lactobacillus*  
 1178 *rhamnosus* GG microcapsules inhibit *Escherichia coli* biofilm formation in coculture.  
 1179 *Biotechnol Lett.* 2019 Sep;41(8-9):1007-1014. doi: 10.1007/s10529-019-02694-2. Epub  
 1180 2019 May 30. PMID: 31147809.
- 1181 SONI I, CHAKRAPANI H, CHOPRA S. Draft Genome Sequence of Methicillin-  
 1182 Sensitive *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. *Genome Announc.* 2015 Sep  
 1183 24;3(5):e01095-15. doi: 10.1128/genomeA.01095-15. PMID: 26404610; PMCID:  
 1184 PMC4582586.
- 1185 VILELA S.F.G., BARBOSA J.O., ROSSONI R.D., SANTOS J.D, PRATA M.C.,  
 1186 ANBINDER A.L., JORGE A.O.C., AND JUNQUEIRA J.C. *Lactobacillus acidophilus*  
 1187 ATCC 4356 inhibits biofilm formation by *C. albicans* and attenuates the experimental  
 1188 candidiasis in *Galleria mellonella*. *Virulence* 6:1, 29--39; January 2015; © 2015 Taylor  
 1189 & Francis Group, LLC
- 1190 VUOTTO, C., LONGO, F., AND DONELLI, G. (2014). Probiotics to counteract  
 1191 biofilm-associated infections: promising and conflicting data. *Int. J. Oral Sci.* 6, 189–194.  
 1192 doi: 10.1038/ijos.2014.52
- 1193 WHITELEY M, DIGGLE SP, GREENBERG EP. Progress in and promise of bacterial  
 1194 quorum sensing research. *Nature.* 2017 Nov 15;551(7680):313-320. doi:  
 1195 10.1038/nature24624. Erratum in: *Nature.* 2018 Feb 28;555(7694):126. PMID:  
 1196 29144467; PMCID: PMC5870893.

- 1197 WORLD HEALTH ORGANIZATION/CDC/ICBDSR. Global priority list of antibiotic-  
1198 resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics.  
1199 Geneva: World Health Organization; 2017. Disponível em:  
1200 [http://www.who.int/medicines/publications/global-prioritylist-antibiotic-resistant-](http://www.who.int/medicines/publications/global-prioritylist-antibiotic-resistant-bacteria/en/)  
1201 [bacteria/en/](http://www.who.int/medicines/publications/global-prioritylist-antibiotic-resistant-bacteria/en/). Acesso em: 01/03/2022.
- 1202 WU CC, LIN CT, WU CY, et al. (2015) Inhibitory effect of *Lactobacillus salivarius* on  
1203 *Streptococcus mutans* biofilm formation. *Mol Oral Microbiol* 30: 16–26.
- 1204 XU X, PENG Q, ZHANG Y, TIAN D, ZHANG P, HUANG Y, MA L, QIAO Y, SHI B.  
1205 A novel exopolysaccharide produced by *Lactobacillus coryniformis* NA-3 exhibits  
1206 antioxidant and biofilm-inhibiting properties in vitro. *Food Nutr Res.* 2020 Apr 3;64. doi:  
1207 10.29219/fnr.v64.3744. PMID: 32425737; PMCID: PMC7217292.