

Avaliação da capacidade de formação de Biofilmes *in vitro* por estirpes bacterianas isoladas de sapal

1. Fundamentação Teórica

As estirpes utilizadas neste trabalho foram isoladas de ambientes de sapal, ecossistemas costeiros caracterizados por elevada carga orgânica, flutuações periódicas de oxigenação, salinidade variável e forte dinâmica físico-química. Estas condições selecionam microrganismos metabolicamente versáteis, frequentemente capazes de utilizar compostos hidrofóbicos e de desenvolver estratégias de adaptação como a formação de biofilmes.

Biofilmes são comunidades microbianas estruturadas que crescem aderentes a superfícies e embebidas numa matriz extracelular polimérica (EPS), composta por polissacáridos, proteínas, ácidos nucleicos extracelulares e lípidos. A formação de biofilme constitui uma estratégia adaptativa que confere maior resistência a stresse ambiental, variações de salinidade, limitações nutricionais e exposição a compostos tóxicos. A formação de biofilme pode constituir um *trait* microbiano relevante em processos de biorremediação. Em ambientes contaminados com compostos hidrofóbicos (ex.: óleos vegetais), a organização em biofilme pode:

- aumentar a retenção de células na interface óleo-água;
- favorecer a concentração local de enzimas extracelulares (ex.: lipases);
- facilitar interações metabólicas em consórcios microbianos;
- melhorar a tolerância a compostos potencialmente tóxicos;
- aumentar a eficiência global de degradação por proximidade celular e partilha de metabolitos.

Assim, a avaliação da capacidade de formação de biofilme permite explorar não apenas um fenótipo estrutural, mas também um potencial traço funcional com implicações ecológicas e aplicadas.

O ensaio em microplaca com coloração por violeta de cristal constitui um método padronizado para quantificação da biomassa total aderente. A comparação com a fração planctónica permite distinguir crescimento livre de crescimento sésil e inferir estratégias adaptativas distintas. Este modelo experimental permite relacionar formação de biofilme com potencial ecológico e aplicações em biorremediação.

2. Objetivos

- Avaliar quantitativamente a formação de biofilmes por estirpes isoladas de sapal.
- Comparar formação de biofilmes em culturas individuais e co-cultura.
- Diferenciar biomassa total, fração planctónica e componentes da matriz.
- Avaliar a eficiência relativa de formação de biofilme em co-culturas versus culturas puras.

3. PRÉ-AULA – Preparação da aula

- Culturas frescas (18–24 h) das estirpes a testar (Sa e Sb)
- Meio de cultura NB
- Microplacas de 96 poços estéreis
- Solução salina 0,85% (p/v) estéril
- Violeta de cristal 0,1%
- Ácido acético 33% (v/v)
- Azul de bromofenol (se aplicável)

4. Aula de 24 de março – Inoculação

Materials

- Estirpe Sa
- Estirpe Sb
- Solução salina estéril (0,85%)
- Microtubos estéreis
- Micropipetas e pontas estéreis
- Zaragatoas ou ansa estéril
- Vórtex
- Escala de McFarland
- Meio NB
- Microplacas estéreis de 96 poços (fundo plano)
- Incubadora (28 °C)

Procedimento

1. Transferir 1 mL de solução salina estéril para microtubo.
2. Suspender colónias bacterianas em solução salina.
3. Homogeneizar em vórtex.
4. Ajustar a turbidez para aproximadamente 0,5 McFarland.
5. Adicionar 180 μ L de meio em cada poço da microplaca (ver Tabela. 1).
6. Preparar as seguintes condições:
 - o Sa (em triplicado – Tabela 1)
 - o Sb (em triplicado – Tabela 1)
 - o Co-cultura (Sa + Sb, volumes iguais de cada suspensão – Tabela 1)
 - o Solução salina (controlo negativo; C-)
7. Inocular 20 μ L em cada poço respetivo da microplaca (ver Tabela 1).
8. Incubar a 28 °C.

Cada grupo deverá utilizar uma microplaca como sugerido na Tabela 1.

Tabela 1. Esquema de inoculação das estirpes na microplaca.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Sa	Sa	Sa	Sa	Sa	Sa	Sa	Sa	Sa	C-	C-	C-
B	Sb	Sb	Sb	Sb	Sb	Sb	Sb	Sb	Sb	C-	C-	C-
C	Sa+Sb	Sa+Sb	Sa+Sb	Sa+Sb	Sa+Sb	Sa+Sb	Sa+Sb	Sa+Sb	Sa+Sb	C-	C-	C-

[illegible]

5. Aula de 30 de março – Quantificação

A quantificação será feita nos seguintes quatro passos:

Passo	Componente Medido	Reagente Principal
A	Crescimento Planctónico	Meio de Cultura (600nm)
B	Biomassa Total (Solubilizada)	Ácido Acético (600 nm)
C	Biofilme (Polissacáridos/Parede)	Violeta de Cristal (570 nm)
D	Matriz (Proteínas/Peptídeos)	Azul de Bromofenol (600 nm)

A. Quantificação da Fração Planctónica

1. Transferir cuidadosamente o sobrenadante para novos poços sombreados a amarelo (Tabela 2).
2. Medir absorbância a 600 nm (OD600).

B. Quantificação da Biomassa Total Solubilizada (ácido acético)

3. Nos poços sombreados a verde (Tabela 2), adicionar 200 μ L de ácido acético a 33 %, e ressuspender com pipeta.
4. Medir absorbância a 600 nm.

C. Quantificação de Polissacáridos/Parede (violeta de cristal)

5. Nos poços sombreados a azul (Tabela 2), adicionar 200 μ L de violeta de cristal e deixar atuar durante 10-15 min.
6. Lavar suavemente 3x com 200 μ L água estéril.
7. Secar ao ar.
8. Adicionar 200 μ L de ácido acético 33% para solubilizar o corante.
9. Medir absorbância a 570 nm.

D. Quantificação da Matriz (azul de bromofenol)

10. Nos poços sombreados a cinzento (Tabela 2), adicionar 20 μ L de azul de bromofenol e deixar atuar durante 10-15 min.
11. Lavar suavemente 3x com 200 μ L de ácido acético a 0,5 %.
12. Secar ao ar.
13. Medir absorbância a 600 nm.

Tabela 2. Esquema de inoculação das estirpes na microplaca.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Sa	Sa	Sa	Sa	Sa	Sa	Sa	Sa	Sa	C-	C-	C-
B	Sb	Sb	Sb	Sb	Sb	Sb	Sb	Sb	Sb	C-	C-	C-
C	Sa+Sb	Sa+Sb	Sa+Sb	Sa+Sb	Sa+Sb	Sa+Sb	Sa+Sb	Sa+Sb	Sa+Sb	C-	C-	C-
D	Sa	Sa	Sa	Sa	Sa	Sa	Sa	Sa	Sa	C-	C-	C-

E	Sb	Sb	Sb	Sb	Sb	Sb	Sb	Sb	Sb	C-	C-	C-
F	Sa+Sb	Sa+Sb	Sa+Sb	Sa+Sb	Sa+Sb	Sa+Sb	Sa+Sb	Sa+Sb	Sa+Sb	C-	C-	C-
G												
H												

Tratamento de Dados

- Calcular média e desvio padrão dos triplicados.
- Subtrair valor do branco (ou seja, do controlo negativo).
- Comparar:
 - Biomassa total vs crescimento planctónico.
 - Culturas individuais vs co-cultura.
- Determinar índice relativo de formação de biofilme:

Biofilme normalizado = (OD biofilme) / (OD planctónico)

- Classificar as estirpes como:
 - Não formadora
 - Fraca
 - Moderada
 - Forte formadora

Tabela 3

	OD planctónica (600 nm)	OD biofilme (570 nm)	OD matriz proteica (600 nm)	Índice normalizado (biofilme/planctónico)
Sa				
Sb				
Sa+Sb				
Controlo negativo				

6. Guião de discussão e análise crítica

Os estudantes podem analisar os resultados considerando os seguintes pontos:

A. Interpretação Biológica

1. A maior biomassa implica maior crescimento?
2. A co-cultura promoveu sinergia ou competição?
3. Que mecanismos regulam a transição planctónico → séssil?
4. Que papel desempenha o quorum sensing?

B. Análise Experimental

5. Quais as limitações do método da violeta de cristal?
6. O ensaio distingue células viáveis de matriz inerte?
7. Que métodos alternativos poderiam ser usados? (ex.: confocal, CFU, XTT)

C. Aplicação

8. Qual a relevância ecológica da formação de biofilmes em sapais?
9. Como este fenótipo pode influenciar processos de biorremediação?

7. Síntese Final

- Compreender a formação de biofilmes como estratégia adaptativa de microrganismos, nomeadamente os de sapais.
- Diferenciar crescimento planctónico e sésil e quantificar biomassa aderente.
- Avaliar interações entre estirpes individuais e co-culturas na formação de biofilme.
- Reconhecer a relação entre biofilme e potencial biorremediador de óleos vegetais.
- Interpretar criticamente resultados experimentais e limitações metodológicas.

8. Sugestão de bibliografia

- Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418), 1318–1322. (estrutura e funções dos biofilmes, aplicável a ambientes naturais e contaminados).
- Davey, M. E., & O'Toole, G. A. (2000). Microbial biofilms: From ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4), 847–867. (mecanismos genéticos e ambientais que regulam biofilmes, útil para interpretação em ecologia microbiana).
- Flemming, H.-C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 623–633. (revisão detalhada da matriz extracelular, essencial para compreensão do *trait* funcional).
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., & Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 95–108. (revisão abrangente sobre biofilmes em ecossistemas naturais e suas funções adaptativas).
- Singh, R., Paul, D., & Jain, R. K. (2006). Biofilms: Implications in bioremediation. *Trends in Microbiology*, 14(9), 389–397. (relaciona biofilmes e degradação de poluentes, incluindo compostos hidrofóbicos como óleos).