

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA — CAMPUS PATOS DE MINAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

GRAZIELLE RODRIGUES REIS

INVESTIGAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILMES *IN VITRO* PELA LINHAGEM
ACIDOBACTERIA AB23

PATOS DE MINAS
MARÇO DE 2026

GRAZIELLE RODRIGUES REIS

**INVESTIGAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILMES *IN VITRO* PELA LINHAGEM
ACIDOBACTERIA AB23**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Instituto de Biotecnologia da Universidade
Federal de Uberlândia como requisito final para
obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia.

Orientador: Dra. Cristine Chaves Barreto

PATOS DE MINAS

MARÇO DE 2026

GRAZIELLE RODRIGUES REIS

Investigação da Formação de Biofilmes *in vitro* pela Linhagem Acidobacteria AB23

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Banca Examinadora:

Dra. Cristine Chaves Barreto - Universidade Federal de Uberlândia, Presidente

Dr. Guilherme Ramos Oliveira e Freitas - Universidade Federal de Uberlândia, membro

Me. Carla Ferreira de Lima – Universidade Federal de Uberlândia, membro

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de defesa que se encontra no Sistema Eletrônico de Informações (SEI) da universidade Federal de Uberlândia.

Patos de Minas, 09 de março de 2026

AGRADECIMENTOS

Eu gostaria de expressar minha sincera gratidão a todas as pessoas que contribuíram para este trabalho.

Agradeço primeiramente ao meu orientadora Dra. Cristine Chaves Barreto, pelos ensinamentos e dedicação ao longo desta pesquisa. Também gostaria de agradecer à minha mãe Eliani por todo o apoio que ela me deu. Sua ajuda e apoio constantes foram cruciais em minha jornada pela graduação. Minha mãe estava presente quando eu precisava, me inspirou e encorajou a superar todas as dificuldades que eu enfrentei.

Aproveito a oportunidade para agradecer ao meu padrasto, Celmar, por todo ajuda e apoio que ele me deu. Agradeço também aos professores e colegas que, direta ou indiretamente contribuíram para meu crescimento acadêmico e pessoal durante este percurso.

A todos, meu muito obrigado!

RESUMO

Biofilmes são agregados microbianos envoltos em uma matriz primariamente polissacarídica, sintetizada por um ou mais membros desse biofilme. Espécies de *Pseudomonas* e *Staphylococcus* são conhecidas produtoras de biofilmes, porém grupos bacterianos recém-descobertos, ou apenas menos estudados, carecem de demonstração da capacidade de formar biofilme. Dentre eles está o filo *Acidobacteriota* que são bactérias comuns em solo, porém com poucos isolados em cultura. O objetivo geral do presente estudo foi explorar a produção de biofilmes *in vitro* na cepa AB23 de *Acidobacteriota*. Foram executados métodos qualitativos e quantitativos relacionados à produção de estruturas extracelulares associadas à formação de biofilme, incluindo coloração de cápsula, “*Congo Red Agar* (CRA)” e o ensaio com cristal violeta em placas de microtitulação. Os resultados demonstraram presença de cápsula na cepa bacteriana AB23. Adicionalmente, a formação de biofilme foi observada no grupo controle: *Staphylococcus epidermidis*. A cepa AB23 não apresentou crescimento em meio BHI, mesmo em pH mais ácido. Os ensaios comprovaram o crescimento da cepa AB23 em meio VL-55 com pH 6,5, contendo vermelho de congo apresentando alteração da cor sugestiva para formação de biofilme. Por fim, os dados obtidos por meio do método de microtitulação em placas corroboram os dados anteriores sugerindo a capacidade da cepa AB23 na produção de biofilme. Esse conjunto de resultados sugerem uma capacidade da cepa AB23 de ser formadora de biofilme *in vitro*. Considerando as perspectivas futuras para esta linhagem, vislumbra-se uma possível aplicação na área de biorremediação.

Palavras-chave: *Acidobacteriota*; Matriz extracelular polimérica; Vermelho congo; Cristal violeta.

ABSTRACT

Biofilms are microbial aggregates enveloped in a primarily polysaccharide matrix, synthesized by one or more members of that biofilm. *Pseudomonas* and *Staphylococcus* species are known biofilm producers; however, newly discovered or less studied bacterial groups lack demonstrated biofilm-forming capabilities. Among them is the phylum Acidobacteriota, which are common soil bacteria but have few isolates in culture. The overall objective of this study was to explore the in vitro production of biofilms in the AB23 strain of Acidobacteriota. Qualitative and quantitative methods related to the production of extracellular structures associated with biofilm formation were performed, including capsule staining, Congo Red Agar (CRA), and the crystal violet assay in microtiter plates. The results demonstrated the presence of a capsule in the AB23 bacterial strain. Additionally, biofilm formation was observed in the control group: *Staphylococcus epidermidis*. The AB23 strain did not show growth in BHI medium, even at a more acidic pH. Assays confirmed the growth of the AB23 strain in VL-55 medium at pH 6.5, containing Congo red, showing a color change suggestive of biofilm formation. Finally, the data obtained through the microtiter plate method corroborate the previous data, suggesting the capacity of the AB23 strain to produce biofilms. This set of results suggests the capacity of the AB23 strain to form biofilms in vitro. Considering future prospects for this strain, a possible application in the area of bioremediation is envisioned.

Keywords: *Acidobacteriota*; Polymeric extracellular matrix; *Congo Red*; Crystal violet.

SUMARIO

INTRODUÇÃO	7
Revisão na Literatura.....	8
<i>Biofilmes Microbianos: Definição e Relevância</i>	8
<i>Biofilmes em Acidobacteria: Ocorrência e Significado</i>	10
<i>Metodologias para Detecção e Quantificação de Biofilmes Bacterianos.....</i>	11
<i>Bactérias Formadoras de Biofilmes: Modelos e Diversidade.....</i>	13
OBJETIVO	15
Objetivo Específico	15
MATERIAL E MÉTODOS	16
Obtenção e Manutenção das Bactérias.....	16
Coloração da Cápsula	16
Teste dos Meios para Coloração com Vermelho Congo	16
Observação de Formação de Biofilmes em Lamínula.....	17
Ensaio de Formação de Biofilmes em Placas de Microtitulação	17
RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
CONCLUSÃO.....	25

1 INTRODUÇÃO

Biofilmes microbianos são um modo de crescimento coletivo caracterizado pela aderência das células a superfícies bióticas ou abióticas, seguida de sua imersão numa matriz extracelular polimérica. Este modo de crescimento protege as células e as torna resistentes a agentes antimicrobianos e a condições ambientais adversas, promovendo infecções persistentes, contaminação industrial ou biocorrosão. Por outro lado, os biofilmes desempenham funções benéficas em sistemas naturais e biotecnológicos, incluindo a biorremediação, a ciclagem de elementos e o crescimento de plantas. O entendimento de sua formação e composição é importante tanto para o controle de seus impactos negativos quanto para a exploração de sua potencial aplicação. Nem todas as bactérias formam biofilmes, mas algumas são particularmente estudadas, como as dos gêneros *Pseudomonas* e *Staphylococcus*.

O presente estudo trata de bactérias do filo *Acidobacteriota*, cujos membros são pouco estudados. Essas bactérias destacam-se por sua abundância e grande adaptabilidade ao solo, mesmo em condições extremas. Sua capacidade de produzir matrizes extracelulares, como celulose e exopolissacarídeos (EPS) sugere a capacidade de formar biofilme, o que é condizente com sua persistência no ambiente. No entanto, estudos sobre biofilmes de Acidobacteria ainda são raros, especialmente sobre classes específicas de bactérias cultivadas, como a cepa AB23. A investigação da formação de biofilme por parte da linhagem AB23 permitirá entender seus mecanismos adaptativos fundamentais para a sua sobrevivência no solo, assim como aplicações biotecnológicas, como a produção de biopolímeros ou de processos de biorremediação.

Portanto, a importância deste trabalho está presente em vários aspectos: no científico, como contribuição para o conhecimento da fisiologia e ecologia de um grupo bacteriano abundante e filogeneticamente diverso; tecnológico e ambiental, na medida em que pode fornecer os fundamentos para o desenvolvimento de novos biofilmes baseados em ecossistemas naturais para a remediação de ambientes degradados; econômica, na medida em que fornece uma nova perspectiva para a substituição, em muitas aplicações, de biopolímeros naturais em substituição a sintéticos; e acadêmica, alinhada com a missão da instituição de produzir conhecimento disciplinar e interdisciplinar em um contexto de desenvolvimento sustentável. Com isso, este estudo abrange a ODS 15 (Vida Terrestre).

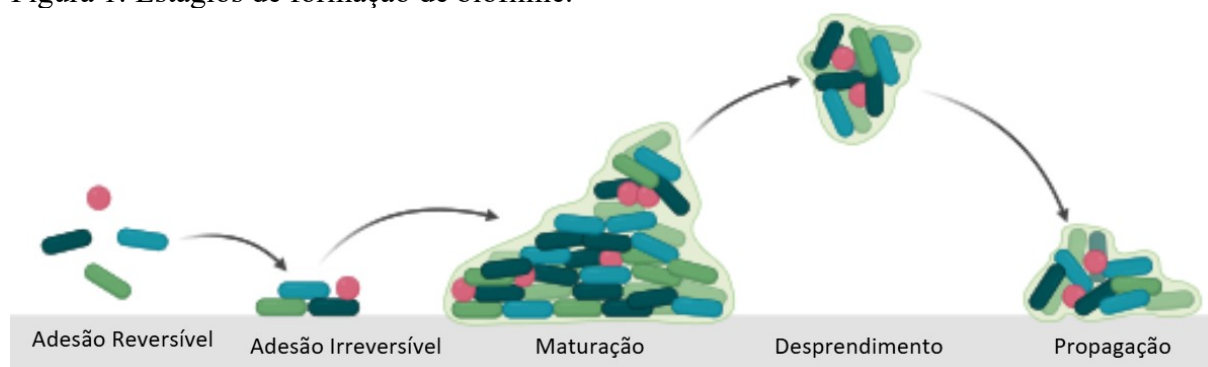
Nossa hipótese é que a linhagem AB23 de Acidobacteria é capaz de formar biofilme em meios sólidos e líquidos. A confirmação da hipótese fornecerá informações que podem esclarecer aspectos da ecologia e o potencial biotecnológico das acidobactérias como bactérias potencialmente formadoras de biofilmes.

1.1 Revisão na Literatura

1.1.1 Biofilmes Microbianos: Definição e Relevância

Os biofilmes microbianos consistem em uma forma de vida sésil, em que células microbianas aderem-se irreversivelmente a superfícies bióticas ou abióticas. Essas comunidades são envolvidas por uma matriz extracelular polimérica (MEC) de aparência gelatinosa secretada por um ou mais dos microrganismos de um biofilme. A MEC tem uma função estrutural atuando como um adesivo que fixa as células às superfícies, permitindo a comunicação intercelular via moléculas sinalizadoras (*quorum sensing*), protege contra estresses ambientais e opera como uma barreira física para impedir a passagem de agentes antimicrobianos (HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004). A formação do biofilme é um processo dinâmico que envolve estágios sequenciais (Figura 1): adesão reversível das células planctônicas; adesão irreversível mediada pela produção da MEC; desenvolvimento e maturação da arquitetura tridimensional; e desprendimento de células para colonização de novas superfícies (KAPLAN, 2010). A importância dos biofilmes é variada; podem ser benéficos, como na biorremediação e no tratamento de águas residuais, ou prejudiciais, contribuindo para infecções crônicas e danos industriais (BALCÁZAR et al., 2015).

Figura 1: Estágios de formação de biofilme.



Fonte: Própria autora, criado com BioRender.com, licença: <https://BioRender.com/f5f4p3l>

A matriz extracelular de um biofilme é constituída principalmente por polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e água (FLEMMING; WINGENDER, 2010). Trata-se de uma estratégia evolutiva ancestral, com registros fósseis de bilhões de anos (SCHOPF, 2006). A arquitetura tridimensional dos biofilmes compreende micro colônias, canais de nutrientes e

poros, variando de uma única camada a estruturas multicelulares complexas, dependendo das condições ambientais (STOODLEY et al., 1999).

Devido à sua resistência a antimicrobianos, derivada do crescimento mais lento no biofilme, da restrição à difusão de compostos pela MEC, da presença de células em estados fisiológicos diferenciados e da inativação de drogas (HOIBY, 2014), os biofilmes potencializam a gravidade de doenças infecciosas. Biofilme estão associados a mais de 60% das infecções microbianas em tecidos e dispositivos médicos implantados e tecidos celulares, como fibrose cística e cepas gangrenosas persistentes (MULCAHY et al., 2008; KULETA; KOZIK; KOZIK, 2009; AMINI et al., 2011). Portanto, a capacidade de desenvolver biofilmes é um fator de virulência urgente que ameaça a eficácia dos regimes terapêuticos atuais, além de aumentar os custos médicos. A resistência é multifatorial e derivada do crescimento mais lento dentro do biofilme, da restrição na difusão de antimicrobianos pela MEC, da presença de células em estados fisiológicos diferenciados e da inativação de drogas (HOIBY, 2014).

Do lado industrial, os biofilmes representam prejuízos econômicos significativos, causando biocorrosão em equipamentos, contaminação de alimentos e obstrução de sistemas. Aproximadamente 40% da biocorrosão em dutos de indústrias petrolíferas resulta da formação de biofilme (ALBUQUERQUE et al., 2014).

Com base no artigo de Yan et al. (2022), a formação de biofilmes pelas bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico (diazotróficas) é crucial para a promoção de interações mutualísticas com plantas. Os biofilmes criam um ambiente que garante a proteção da enzima nitrogenase, responsável pela conversão de dióxido de nitrogênio em amônia, que é sensível ao oxigênio atmosférico. O mesmo estudo mostrou que a modificação genética do arroz para aumentar a exsudação de apigenina, um flavonoide potencializador da formação de biofilmes em bactérias diazotróficas, não apenas promove a formação de biofilmes, mas também altera significativamente a estrutura do microbioma radicular, aumentando a riqueza de bactérias associadas às raízes (YAN et al, 20222).

Tendo isso em vista, estudos têm sido consistentes no desenvolvimento de estratégias de controle e erradicação de biofilmes, inibidores de *quorum sensing* e peptídeos antimicrobianos (DE LA FUENTE-NÚÑEZ et al., 2014; BAKER et al., 2016). Entretanto, os biofilmes também possuem grande potencial para aplicação em processos biotecnológicos, tais quanto a biorremediação e reatores biológicos e promoção de crescimento de plantas (HASSARD et al., 2016, YAN et al., 2022). Portanto, a compreensão detalhada acerca da composição, formação e regulação é de fundamental relevância.

1.1.2 Biofilmes em Acidobacteria: Ocorrência e Significado

O filo *Acidobacteriota* inclui um número significativo de linhagens bacterianas que estão entre as mais abundantes em muitos tipos de solos, incluindo solos de tundra, turfas, solos agrícolas e solos contaminados. A diversidade filogenética dos Acidobacteria e a adaptabilidade a condições extremas, como pH baixo, temperaturas baixas, e contaminação, têm sido associadas à formação de estruturas extracelulares complexas, como biofilmes e matrizes extracelulares poliméricas. Vários estudos indicaram que a produção de e exopolissacarídeos (EPS), sugere a capacidade de formar biofilme, e a síntese de celulose bacteriana são mecanismos básicos que garantem a sobrevivência, proteção ecológica e função ecológica dos Acidobacteria em ambientes adversos. (BELOVA et al., 2022; KIELAK et al., 2017; SHI et al., 2015)

A formação de biofilme por Acidobacterias foi observada pela primeira vez em culturas de representantes como *Terriglobus roseus* e *Granulicella spp.*, (BELOVA et al., 2022) onde as matrizes extracelulares cuja composições ainda não são completamente caracterizadas e promovem a agregação célula-célula, resultando em crescimento visivelmente aglomerado em culturas líquidas. Acredita-se que essas estruturas sejam uma estratégia de proteção contra predação, dessecação e estresse ambiental; elas também contribuem para a retenção de nutrientes e água, auxiliando na formação e estabilização do solo. Posteriormente, a análise genômica de diversas linhagens de Acidobacteria revelou a presença de *loci* de síntese de celulose (bcs), indicando a capacidade de produção de polissacarídeos estruturais que podem compor a matriz extracelular de biofilmes (BELOVA et al., 2022).

Em um estudo com *Acidiscarina polymorpha* SBC82, isolada de solo de tundra coberto de líquen, foi explorada a formação de câmaras extracelulares em forma de saco, compostas por fibras compactadas e paralelas apresentadas como estruturas laminadas. Os resultados do exame de espalhamento de raios X de baixo ângulo (SAXS) revelaram que culturas maduras formaram uma rede de fibras densa e ordenada semelhante à celulose. Isso corroborou a aparência celulósica do envelope extracelular, pois o tratamento com celulase facilitou a degradação dessas estruturas. O genoma da cepa SBC82 apresenta um *locus* bcs com genes de síntese de celulose, notavelmente uma das acidobactérias do Cerrado, a cepa AB60, também apresenta o mesmo *locus* responsável pela produção de celulose bacteriana (BELOVA et al., 2022)

Além da celulose bacteriana, algumas Acidobacterias produzem EPS heteropolimérico com características físico-químicas especiais. Em um estudo de Kielak et al., (2017) sobre duas

cepas de *Granulicella sp.* (WH15 e 5B5) isoladas de solos ácidos, os EPS produzidos foram caracterizados como heteropolissacarídeos solúveis em água contendo manose, glicose, galactose e xilose como monômeros principais e apresentando propriedades de emulsificação. Esses EPS formaram emulsões estáveis com óleos vegetais, hidrocarbonetos e diesel com eficiência superior à goma xantana comercial em alguns casos, bem como resistência a altas temperaturas. Essa característica dos EPS de *Acidobacteria* não só desempenha um papel na proteção celular e geração de biofilme no ambiente biológico, mas também tem potencial biotecnológico para aplicações industriais, incluindo biorremediação, estabilização de emulsões e produção sustentável de biopolímeros.

Em um contexto de biorremediação, *Acidobacteria* foram reconhecidas como constituintes de biofilmes em reatores utilizados no tratamento de esgoto complexo, como água de areia de óleo extraída. Em Reatores de Biofilme de Leito Móvel (*MBBR*) usados para degradação de ácido naftênico, *Acidobacteria* estava entre os filos dominantes presentes nos suportes de plataforma, assim como *Proteobacteria* e *Nitrospirae*. A presença de *Acidobacteria* nesses sistemas indica sua resistência a agentes tóxicos e eles podem estar envolvidos no processo de degradação de poluentes recalcitrantes, especialmente quando associados a pré-tratamentos como ozonização, que é eficaz na redução da toxicidade e biodegradação de efluentes (SHI et al., 2015).

Portanto, a formação de biofilme e a produção de celulose e EPS heteropolimérico são as características funcionais que algumas linhagens de *Acidobacterias* possuem, permitindo-lhes sobreviver e prosperar em solos e em ambientes aquáticos contaminados. Essas arquiteturas protegem contra estresses abióticos e bióticos e mediam interações com a matriz do solo, controlam o ciclo de nutrientes e têm potencial aplicação biotecnológica para a indústria de biorremediação e aplicações de biopolímeros (VASQUES et al., 2024). É muito importante continuar estudando seus componentes genéticos, diversidade estrutural e funções ecológicas, como aquelas proporcionadas pelos biofilmes formados por *Acidobacteria*, que também serão um processo aberto e contínuo, fundamental para entender sua função na ecológica dos biofilmes e as aplicações futuras sustentáveis.

1.1.3 Metodologias para Detecção e Quantificação de Biofilmes Bacterianos

A identificação e quantificação de biofilmes bacterianos são passos básicos para entender a ecologia e fisiologia microbiana bem como a resistência antimicrobiana associadas à sobrevivência e persistência microbiana em áreas variadas, incluindo clínica, ambiental e

agrícola. Diferentes metodologias foram propostas e aprimoradas para esse propósito, cada uma com diversas aplicações, vantagens, limitações, técnicas qualitativas, quantitativas e de imagem.

Dentre as técnicas qualitativas, o teste em ágar vermelho Congo (*Congo Red Agar* – CRA) é aquele que tem sido usado como técnica fenotípica presuntiva para detecção de biofilme através da produção de matriz polissacarídica (FREEMAN et al, 1989). Nesta abordagem de análise, colônias que desenvolvem uma coloração escura ou enegrecida são consideradas produtoras de polissacarídeos extracelulares associados à formação de biofilme. No entanto, como demonstrado por Lima et al. (2017), esse método tem baixa sensibilidade para estimativa de produção de biofilme e, portanto, pode subestimar a produção de biofilme de espécies como *Pseudomonas aeruginosa* em comparação com métodos quantitativos.

Métodos semiquantitativos, por outro lado, estão disponíveis para uma avaliação mais específica da formação de biofilme. Os métodos mais amplamente utilizados são o ensaio de microplaca que envolve a adição de cristal violeta a placas de poliestireno. Este protocolo, delineado por Stepanovic et al. (2000) e modificado em vários trabalhos, envolve a incubação de suspensões bacterianas em placas de 96 poços e posterior adesão do corante cristal violeta ao biofilme, em seguida, após várias lavagens, o biofilme é destruído liberando o corante cuja quantidade é determinada pela absorbância usando um espectrofotômetro. A densidade óptica obtida pode ser comparada a um controle negativo e os isolados podem ser classificados como não aderentes, fracamente, moderadamente ou fortemente aderentes. Por exemplo, este método em isolados clínicos de *P. aeruginosa* de pacientes com pneumonia associada à ventilação foi usado como controle, observando que 75% dos isolados produziram biofilmes (STEPANOVIC et al. 2000)

Finalmente, um método quantitativo adicional envolve a contagem de células viáveis produzidas pelo biofilme, expressas em Unidades Formadoras de Colônias por mililitro ($\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$). O método envolve a desagregação mecânica ou por sonicação do biofilme que se forma em uma escova de dentes, cateter ou microplaca, seguida de diluição seriada e plaqueamento em meio sólido. Publicações como Barbaresco et al. (2024) quantificaram a adesão de *Streptococcus mutans* às cerdas de escovas de dentes usando este método e mostraram a capacidade de formação de biofilme neste ambiente.

Outras formas de caracterização de biofilme, como a coloração com safranina, podem ser usadas para quantificar a matriz extracelular, enquanto o cristal violeta pode ser mais aplicável para estimar a biomassa total de acordo com a avaliação de componentes específicos do biofilme. Usando ambos os corantes, Souza (2019) conduziu um estudo de isolados de

bactérias Gram-negativas de uma unidade de terapia intensiva neonatal e encontrou todos esses isolados como produtores de biofilme, com diferentes níveis de biomassa e matriz extracelular.

Além desses métodos, a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a microscopia de fluorescência são frequentemente usadas para caracterizar estruturas de biofilmes por suas características e dinâmicas. A MEV fornece visualização tridimensional da composição do biofilme e espessura da matriz extracelular, e métodos de microscopia de fluorescência, incluindo métodos confocais, fornecem informações em tempo real sobre expressão de bombas de efluxo, heterogeneidade celular e processos em biofilme. Tais materiais também são necessários para experimentos que comparam morfologia a mecanismos de resistência antimicrobiana para prever os mecanismos de resistência antimicrobiana, conforme indicado na revisão de Silva et al. (2025).

Em ambientes agrícolas, metodologias adaptadas foram aplicadas para determinar a capacidade de formação de biofilme por bactérias promotoras de crescimento de plantas. Vasques et al. (2024) que compreende a incubação de cepas em microtubos em meios específicos, coloração por cristal violeta e leitura de espectrofotômetro seguindo os princípios da microbiologia clínica.

Finalmente, pode-se notar que a escolha da metodologia e fatores (por exemplo, objetivos do estudo, organismos e ambiente) são importantes. Procedimentos quantitativos, incluindo a análise de microplaca e cristal violeta, são bem validados e fornecem reprodutibilidade, enquanto estudos de imagem complementam com dados estruturais e funcionais. A padronização de protocolos e o uso de controles positivos e negativos são críticos para a robustez dos resultados e o avanço no diagnóstico, controle e agentes antimicrobianos para combater os biofilmes ou para serem usados na indústria como matéria prima.

1.1.4 Bactérias Formadoras de Biofilmes: Modelos e Diversidade

Bactérias formadoras de biofilme são uma forma de crescimento microbiano de significativa importância em contextos clínicos, ambientais e agrícolas. Acredita-se que cerca de 80% das infecções humanas estejam relacionadas a biofilmes e incluem infecções do trato urinário, periodontite, endocardite, osteomielite, fibrose cística e infecções de dispositivos médicos implantáveis. A formação de biofilme proporciona aos microrganismos alta resistência a antibióticos e resposta no sistema imunológico do paciente, limitando as aplicações terapêuticas e aumentando ainda mais o custo da hospitalização (MACK et. al., 2004; LYTE et. al., 2003).

Vários gêneros bacterianos são capazes de tal formação, e modelos clínicos e de pesquisa têm tido grande importância. *Staphylococcus epidermidis*, um coco gram-positivo, tem sido amplamente associado a infecções de feridas cirúrgicas, endocardite e complicações em dispositivos médicos devido à sua produção de biofilme através de adesinas, sendo o estafilococo coagulase-negativo mais clinicamente relevante. A produção de biofilme em *S. epidermidis* está bem estabelecida, com dois estágios distintos, adesão primária e acumulação. A adesão de primeiro estágio está associada a fatores proteicos mediados por proteínas da matriz extracelular do hospedeiro, como fibrinogênio, fibronectina e vitronectina, que são depositadas nas superfícies do biomaterial (MACK et. al., 2004; LYTE et. al., 2003). Além disso, o *Staphylococcus aureus* figura entre os principais agentes etiológicos em infecções associadas à formação de biofilmes.

Por outro lado, *Pseudomonas aeruginosa*, um bacilo Gram-negativo, é um patógeno oportunista típico. Em pessoas saudáveis, pode causar infecções leves como otite média ou externa, mas em pacientes imunocomprometidos, vítimas de queimaduras ou fibrose cística, infecções graves podem ocorrer. A técnica ágar vermelho do Congo mostrou baixa sensibilidade para esta espécie, mas ensaios quantitativos de microplacas de poliestireno produziram dados superiores na detecção de biofilmes. (SAGINI et. al., 2024; LIMA et. al., 2017)

Fora do ambiente clínico, os biofilmes são essenciais na agricultura, pois a capacidade de formar biofilmes e sintetizar EPS é uma característica encontrada em bactérias promotoras de crescimento de plantas. O biofilme é uma espécie de zona selada para o crescimento e sobrevivência em condições hostis. Eles também têm funções que vão desde a proteção antimicrobiana contra microrganismos até estresses abióticos, passando pelo transporte de nutrientes e metabólitos. O acúmulo de EPS pode apoiar o carregamento de nutrientes e a tolerância a condições de água e salinidade após os microrganismos serem capazes de promover a capacidade de colonização das raízes (VASQUES et. al., 2024)

2 OBJETIVO

Detecção da formação de biofilmes pela linhagem de Acidobacteriota AB23 em condições *in vitro*.

2.1 Objetivo Específico

1. Detecção microscópica de cápsula da linhagem AB23;
2. Avaliar a formação de biofilmes em meio de cultura sólido utilizando a técnica de coloração com vermelho congo (CRA);
3. Quantificar a formação de biofilme em meio de cultura líquido através do método de cristal violeta em placas de microtitulação;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção e Manutenção das Bactérias

As atividades foram realizadas no Laboratórios de Microbiologia da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), campus de Patos de Minas, entre julho de 2025 até fevereiro de 2026. A amostra da Acidobacteria AB23 foi isolada de solo do Cerrado brasileiro, um bioma caracterizado por solos ácidos, pobres em nutrientes e com alta concentração de alumínio. Essa bactéria foi inicialmente identificada como uma cepa de *Occallatibacter savannae*, mas sua identificação definitiva ainda não foi obtida. O isolamento foi realizado em meio VL-55 (De CASTRO et al, 2013) utilizando xilana (0,05%) como fonte de carbono. O meio VL-55 é quimicamente definido, contendo os sais: MES (3,9 g/L), MgSO₄ (0,4 mM), CaCl₂ (0,6 mM) e (NH₄)HPO₃ (0,4 mM), solução de vitaminas de wolfe (2 mL/L) e elementos traço de Balch (2 mL/L), com adição de de AlK(SO₄)₂ (0,01 g/L) conforme descrito em Sait et al. (2002) e De Castro et al (2013).

Como controle, a bactéria *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* obtidas da coleção de culturas da UFU, no campus de Patos de Minas, e cultivada em meio BHI, preparado conforme especificações do fabricante (Fluka Analytical). Todos os meios de cultura foram autoclavados a 121°C por 20 minutos antes do uso.

3.2 Coloração da Cápsula

A coloração de cápsula foi realizada conforme protocolo estabelecido por VERMELHO (2019), utilizando as amostras de AB23, cultivadas por 2 semanas, *S. epidermidis* e *S. Aureus*, cultivadas por 24 horas. Para a preparação das lâminas, realizou-se um esfregaço, evitando-se a fixação por calor, uma vez que esse procedimento poderia danificar a estrutura da cápsula bacteriana e comprometer a observação posterior. Empregou-se solução de cristal violeta utilizada em coloração de Gram (Violeta de genciana 2%, em etanol 95% e oxalato de amônio 0,2 %, em água). A lâmina foi recoberta com a solução de cristal violeta por 5 minutos. Em seguida, procedeu-se à lavagem com solução de sulfato de cobre a 20%, preparada em água destilada.

3.3 Teste dos Meios para Coloração com Vermelho Congo

O meio BHI e o meio VL-55 (PINTO et al., 2021) foi elaborado utilizando lactose como fonte de carbono. A ambos os meios, foi adicionada uma solução de *Congo Red* preparada segundo Freeman et al. (1989), dissolvendo-se 0,4 g do corante em 50 mL de água destilada (0,8 %). Após a esterilização, 10 mL dessa solução foram incorporados em 100 mL de BHI antes do plaqueamento (LIMA, 2017). Para selecionar um controle positivo adequado, foram testadas as bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, incubadas por 48 horas. Todos os meios (BHI e VL-55) foram preparados em diferentes valores de pH: 5,5; 6,0 e 6,5, com e sem a adição de *Congo Red* para o crescimento de AB23, incubada por 2 semanas.

3.4 Observação de Formação de Biofilmes em Lamínula

Preparou-se o meio VL-55 líquido (PINTO et al., 2021) para a cultura de AB23, incubada por 1 mês, e o meio BHI líquido para *S. Epidermidis*, incubada por 48 horas, em tubos tipo Falcon de 50 mL. Os meios foram inoculados com as bactérias e foi adicionada uma lamínula estéril a cada frasco. As culturas foram incubadas em temperatura ambiente, sem agitação, para avaliação do crescimento.

3.5 Ensaio de Formação de Biofilmes em Placas de Microtitulação

O ensaio foi conduzido em microplaca de 96 poços, utilizando-se dois meios de cultura: caldo BHI (pH 5,5) e meio VL55, preparado conforme descrito por Pinto et al. (2021). O protocolo experimental seguiu as diretrizes estabelecidas por Batistão (2014), com adaptações. As bactérias controle (*Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*) foram incubada a 37°C por 24 horas em meio de BHI. A bactéria AB23 foi incubada em condições de 27°C no escuro, em um período de 15 dias para desenvolvimento do biofilme. Todo o procedimento foi realizado sem agitação. No ensaio de quantificação de biomassa utilizando cristal violeta, cada isolado bacteriano foi inoculado em 8 poços da microplaca.

O experimento foi dividido em duas etapas. Na primeira etapa, cada poço recebeu uma suspensão bacteriana na proporção de 1:10 (v/v) em relação ao volume do meio de cultura, correspondente a 10 µL de inóculo bacteriano, previamente lavado com solução de sais e 100 µL de meio.

Na segunda etapa, procedeu-se à quantificação da biomassa aderida. Inicialmente, os poços foram lavados três vezes com solução salina (NaCl 0,9%). Em seguida, foram

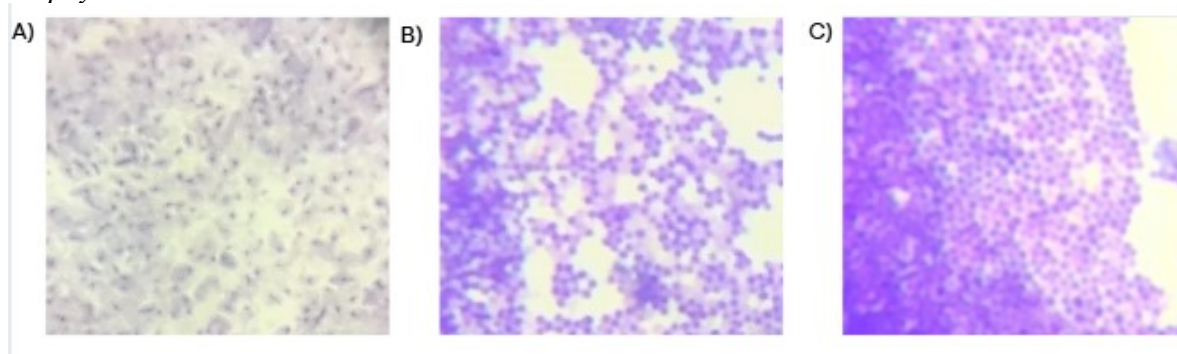
preenchidos com metanol puro por 15 minutos para fixação do biofilme. Após esse período, o metanol foi descartado por inversão da placa, e as placas foram secas à temperatura ambiente. Posteriormente, os poços foram corados com cristal de violeta a 1% por 5 minutos. O corante foi então removido, e os poços foram lavados três vezes com água destilada e novamente secos à temperatura ambiente. Para a solubilização do corante retido nas células aderidas, adicionou-se ácido acético a 33% em cada poço, seguido de incubação por 10 minutos. Em seguida, o conteúdo de cada poço foi transferido para uma nova microplaca, e a absorbância foi medida a 570 nm em leitor de microplacas, utilizando ácido acético a 33% como branco.

Para a classificação da produção de biofilme, adotou-se o critério estabelecido por Batistão (2014), que define um ponto de corte (DOc) a partir da média da DO do controle negativo (branco) acrescida de três vezes o seu desvio padrão. O valor do branco utilizado como controle negativo apresentou média de 0,048 e desvio padrão de 0,001. Desta forma, o ponto de corte (DOc) foi calculado como sendo de 0,051. Com base neste valor, os limites para as categorias de produção de biofilme foram estabelecidos em: Não produtor/Fraco produtor: DO da amostra $\leq 0,102$ ($2 \times \text{DOc}$); Moderado produtor: $0,102 < \text{DO da amostra} \leq 0,204$ ($4 \times \text{DOc}$) ou Forte produtor: DO da amostra $> 0,204$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise microscópica da cepa AB23, após coloração de cápsula, revelou a presença da cápsula bem definida e distinto ao redor das células (Figura 2A). Este fenótipo não foi claramente observado nas cepas controle *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, porém foi observada uma formação mais clara ao fundo da célula bacteriana, o que sugere a presença de estruturas extracelulares associadas a produção de polissacarídeos em ambas as bactérias (Figura 2B e Figura 2C). A morfologia da AB23, evidenciada como cocos e sendo Gram-negativas de pequenas dimensões (Figura 3), aliada à presença da cápsula, fornece o primeiro indicativo de seu potencial para a formação de biofilmes.

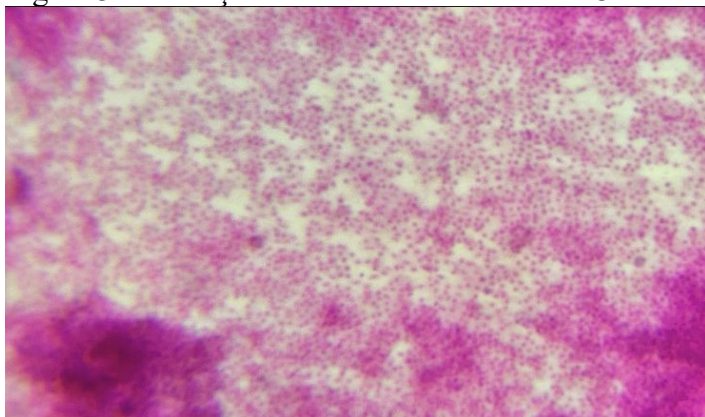
Figura 2 : Coloração de cápsula bacteriana. A) Coloração de cápsula da cepa AB23, células obtidas da cultura em meio VL 55 com lactose e vermelho congo em pH 6,5. B) Coloração de *Staphylococcus epidermidis* obtida de células em meio BHI. C) Coloração de *Staphylococcus aureus* em meio de BHI .



Fonte: Própria autora (2026).

A cápsula bacteriana é descrita como um envoltório de mucopolissacarídeo de alto peso molecular que não é essencial para a sobrevivência da bactéria, mas atua como um importante fator de virulência. Sua função principal é inibir a fagocitose, dificultando que as células de defesa do hospedeiro capturem e destruam a bactéria, o que facilita a propagação do microrganismo e a instalação de processos infecciosos, mas em uma bactéria de solo como a nossa, sua função está mais ligada à proteção contra estresses ambientais, como dessecação e predação (MOREIRA et al., 2015). A visualização nítida dessa estrutura na linhagem AB23, cultivada em condições *in vitro*, sugere que a produção de exopolissacarídeos (EPS) é uma característica intrínseca desta Acidobacteria.

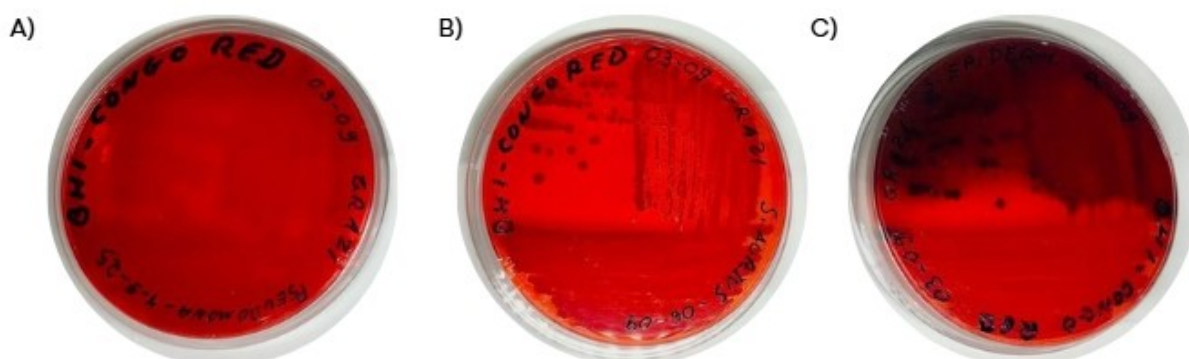
Figura 3: Coloração de Gram da bactéria AB23.



Fonte: Cedida por Cristine Chaves Barreto, originada de aula de microbiologia.

O ensaio qualitativo em meio sólido com o corante Vermelho Congo (CRA) demonstrou ser eficaz para a detecção presuntiva da matriz exopolissacarídica em algumas bactérias. Inicialmente, para a validação do método, as cepas-controle foram testadas em meio BHI (Figura 4). Apenas *S. epidermidis* apresentou colônias com a coloração enegrecida característica, indicando a produção de biofilme (Figura 4C), o que está de acordo com o descrito por Freeman et al. (1989). A ausência do fenótipo em *Pseudomonas aeruginosa* e *S. aureus* nas condições testadas não invalida sua conhecida capacidade de formar biofilmes, mas ressalta a influência de fatores como a linhagem específica, o estado fisiológico do inóculo e as condições de cultivo (como temperatura e composição do meio) na ativação das vias metabólicas responsáveis pela síntese da matriz (LIMA et al., 2017). O estudo de Lima et al 2017 sugere também que o método CRA não é eficaz para a detecção presuntiva de biofilme em *Pseudomonas aeruginosa*, sugerindo o teste colorimétrico com cristal violeta. A falta de positividade pode estar associada à deficiência do gene *pel*, responsável pela produção da matriz extracelular rica em glicose, capaz de se ligar ao corante vermelho Congo e alterar a coloração das colônias produtoras de biofilme. Estudos demonstram que isolados de *Pseudomonas aeruginosa* mutantes para o gene *pel* não produzem essa matriz, resultando, consequentemente, na ausência de reação positiva no teste do ágar vermelho Congo.

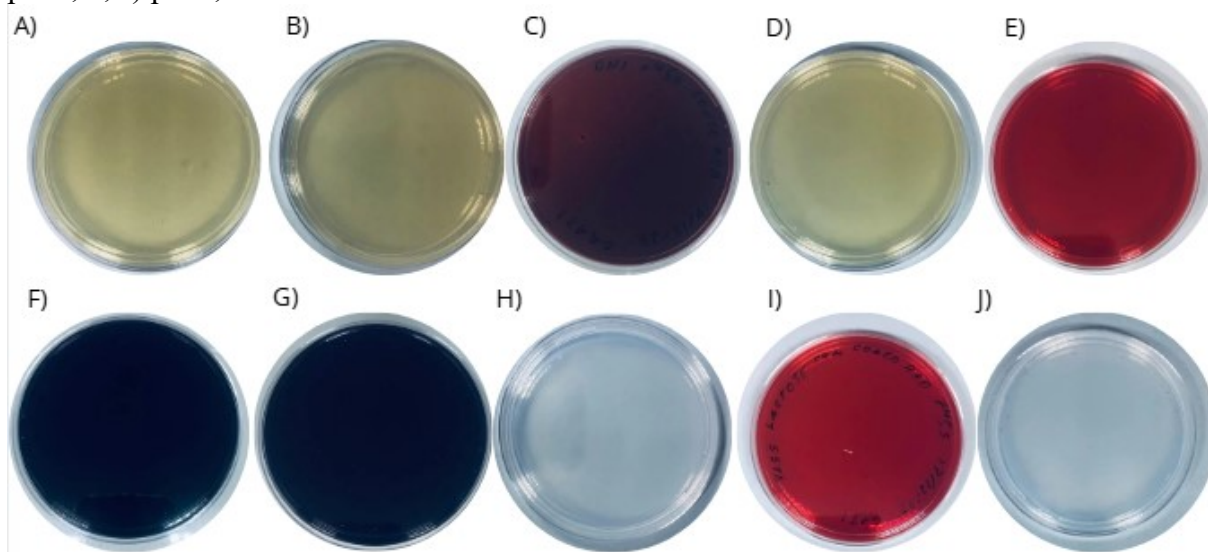
Figura 4: Placas de Petri contendo meio BHI Congo Red ágar (CRA) semeadas com diferentes microrganismos para observação da produção de biofilme. A) *Pseudomonas aeruginosa*; B) *Staphylococcus aureus* e C) *Staphylococcus epidermidis*.



Fonte: Própria autora (2026).

Após a validação do método CRA, a capacidade da cepa AB23 foi avaliada em diferentes meios e pH. Observou-se que os meios BHI e VL55 suplementados com Vermelho Congo e com pH inferior a 6,5 apresentaram escurecimento espontâneo do ágar antes mesmo da inoculação (Figura 5). Este fenômeno, também reportado por Lima et al. (2017), reforça o papel do Vermelho Congo como um indicador de pH, limitando sua aplicabilidade em meios mais ácidos, onde a mudança de cor pode gerar falsos positivos ou dificultar a interpretação.

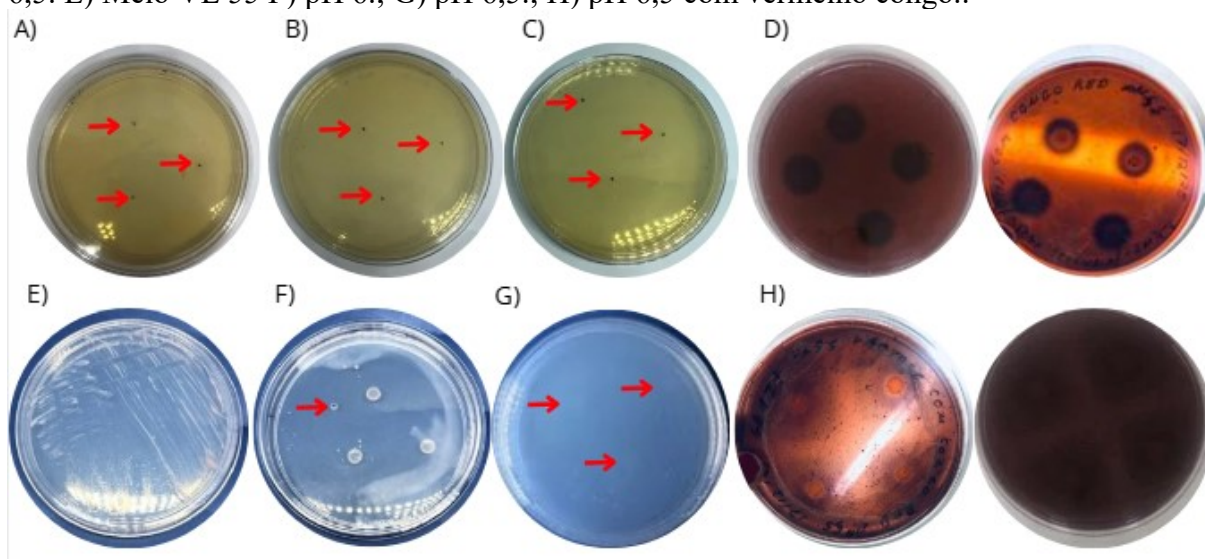
Figura 5 - Diferentes meios em cultura sólidos, com diferentes tipos de pH, sem o inoculo. Meio BHI A) pH 5,5.; B) pH 6.; C) BHI contendo vermelho de congo (*Congo Red*) em pH 6.; D) pH 6,5.; E) BHI contendo vermelho de congo (*Congo Red*) em pH 6,5. F) Meio VL 55 contendo vermelho de congo (*Congo Red*) em pH 5,5.; G) Meio VL 55 contendo vermelho de congo (*Congo Red*) em pH 6.; H) pH 6.; I) Meio VL 55 contendo vermelho de congo (*Congo Red*) em pH 6,5.; J) pH 6,5.



Fonte: Própria autora (2026).

Apesar dessa limitação, nos meios com pH 6,5, que se mantiveram estáveis, a inoculação da AB23 resultou em crescimento após 2 a 4 semanas de incubação, compatível com seu metabolismo lento. Conforme esperado, não houve crescimento da Acidobactéria nos meios BHI, mesmo com o pH ajustado (Figura 6) onde as setas mostram o ponto de inoculação da bactéria, confirmando que este meio não é adequado para seu cultivo, provavelmente devido à sua composição rica em nutrientes, que não reflete as condições fisiológicas de *Occlatibacter savannae*. Em contraste, nos meios VL55, particularmente nos pH 6,0 e 6,5, observou-se desenvolvimento das colônias. Nos meios VL55 contendo Vermelho Congo (pH 6,5), as colônias da AB23 exibiram um escurecimento evidente ao seu redor (Figura 6H). Este resultado é um forte indicativo qualitativo da produção de uma matriz exopolissacarídica (EPS) pela linhagem AB23, corroborando a hipótese de sua capacidade de formar biofilme e sugerindo que os EPS produzidos interagem com o corante de maneira similar aos de *S. Epidermidis* (Figura 4).

Figura 6: Avaliação da presença de biofilme em *O. savannae* AB23 em meio sólido. Meio BHI A) pH 5,5.; B) pH 6.; C) pH 6,5.; D) BHI contendo vermelho de congo (Congo Red) em pH 6,5. E) Meio VL 55 F) pH 6.; G) pH 6,5.; H) pH 6,5 com vermelho congo..



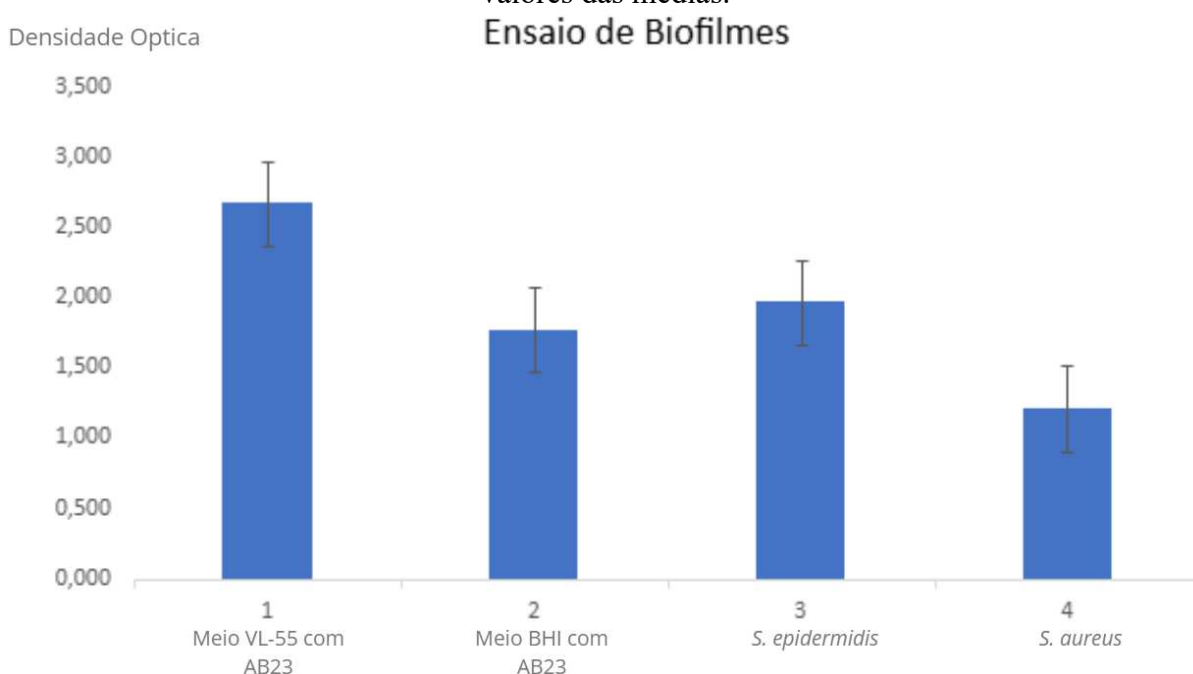
Fonte: Própria autora (2026).

A avaliação da formação de biofilme em meio líquido, que consistia na incubação de lamínulas em meio para observação da adesão bacteriana, não apresentou crescimento aderido à lamínula, embora o crescimento tenha sido observado visualmente no tubo. Isso pode ter ocorrido devido à baixa adesão da linhagem a esse tipo de superfície de vidro nas condições testadas.

Para uma avaliação mais aprofundada e padronizada da capacidade de formação de biofilme, as linhagens foram submetidas ao ensaio quantitativo em microplaca de 96 poços. A análise dos dados do ensaio em microplaca permitiu uma visão mais detalhada da formação de biofilme em condições controladas. Podemos concluir que as linhagens controle apresentaram comportamento distinto, onde *S. epidermidis* apresentou um maior valor de absorbância (Figura 6). Estes dados estão de acordo com a variabilidade conhecida na literatura da sua capacidade de formação de biofilme entre diferentes espécies e mesmo entre linhagens da mesma espécie, que pode ser influenciada por fatores genéticos e ambientais (LIMA et al., 2017).

Ao analisar a cepa AB23, observou-se uma absorbância comparável aos dos microrganismos controle (Figura 6) quando a bactéria foi crescida em meio VL-55. No entanto, ao avaliar os resultados obtidos com a inoculação da AB23 em caldo BHI com pH 5,5, observou-se um resultado de absorbância baixo, uma vez que não houve crescimento bacteriano, conforme demonstrado em meio sólido (Figura 5). Diante disso, sugere-se que o resultado possa ter sido obtido no momento da inoculação, considerando a possibilidade de que, além das células, parte do biofilme formado também tenha sido transferida para o meio.

Figura 6: Ensaio de formação de biofilme em microplaca de 96 poços. As barras indicam valores das médias.



Fonte: Própria autora (2026).

Considerando a classificação proposta por Batistão (2014), o valor do branco foi 0,048 com desvio padrão de 0,001, sendo o ponto de corte calculado como 0,051. Dessa forma, todas as amostras analisadas apresentaram valores de densidade óptica superiores ao limite

estabelecido para a categoria de forte produtor de biofilme ($DO > 0,204$). A amostra de AB23 cultivada em meio VL-55 exibiu a maior média de biomassa, com DO de 2,680, enquanto em meio BHI, AB23 apresentou da DO de 1,782). Dentre os controles, *S. epidermidis* apresentou DO de 1,978 e *S. aureus* DO de 1,218. Estes resultados indicam que, nas condições experimentais avaliadas, todas as cepas estudadas são capazes de formar biofilme, sendo classificadas como fortemente produtoras.

5 CONCLUSÃO

Neste estudo, os resultados obtidos sugerem que a linhagem *Acidobacteria* AB23 é capaz de criar biofilmes *in vitro*. Uma técnica qualitativa de ágar vermelho do Congo revelou a formação de uma matriz de exopolissacarídeos em meios sólidos; a análise microscópica evidenciou a presença de estruturas capsulares ao redor das células; adicionalmente, o ensaio quantitativo em microplaca de 96 poços com cristal violeta corroborou os achados qualitativos, sugerindo a capacidade da cepa AB23 de produzir biomassa aderida em meio líquido.

Esses resultados sugerem a hipótese inicial e destacam a importância ecológica desse fenótipo na sobrevivência da AB23 em solos. Além disso, abrem caminho para futuras pesquisas sobre o potencial biotecnológico dessa linhagem, possivelmente para o desenvolvimento de biopolímeros e/ou suas aplicações em ambientes ambientais.

Para dar continuidade ao presente estudo e corroborar a hipótese levantada, recomenda-se, em pesquisas futuras, o emprego da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para a caracterização morfológica da matriz de EPS e a análise molecular por sequenciamento para a identificação dos genes associados à sua produção.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, A. C.; ANDRADE, C; NEVES, B. Biocorrosão – da integridade do biofilme à integridade do material. **Corrosão e Protecção de Materiais.**, v. 33, n 1-2, pp. 18 - 23, 2014. Disponível em: <https://scielo.pt/pdf/cpm/v33n1-2/v33n1-2a03.pdf>

ALVES, T. M. S.; SILVA, C. A.; SILVA, N. B.; MEDEIROS, E. B.; VALENÇA, A. M. G. Atividade Antimicrobiana de Produtos Fluoretados sobre Bactérias Formadoras do Biofilme Dentário: Estudo *in vitro*. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, João Pessoa, v. 10, n. 2, p. 209-216, maio/ago. 2010. DOI: 10.4034/1519.0501.2010.0102.0013.

AMINI, S., HOTTES, A.K., SMITH, L.E., TAVAZOIE, S. Fitness Landscape of Antibiotic Tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. **PLoS Pathogens**, v.7, n.10, e1002298. 2011. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002298. PMID: 22028649; PMCID: PMC3197603.

BALCÁZAR, J. L.; SUBIRATS, J.; BORREGO, C. M. The role of biofilms as environmental reservoirs of antibiotic resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 2015. DOI: 10.3389/fmicb.2015.01216.

BAKER, P. et al. Exopolysaccharide biosynthetic glycoside hydrolases can be utilized to disrupt and prevent *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Science Advances**, v. 2, n. 5, e1501632. 2016. DOI: 10.1126/sciadv.

BARBARESCO, M. J. et al. Perfil da formação de biofilme de *Streptococcus mutans* isolados da cavidade bucal em escovas dentais. **Revista Sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais**, v. 13, n. 6, p. 103–115, 2024. DOI: <https://doi.org/10.31668/d7d6hs13>.

BATISTÃO, Deivid William da Fonseca. **Marcadores genéticos de risco para forte produção de biofilme em cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina e sua associação com o perfil clonal**. 2014. 87 f. Tese (Doutorado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014.

BELOVA, Svetlana E. et al. Building a cell house from cellulose: the case of the soil acidobacterium *Acidisarcina polymorpha* SBC82. **Microorganisms**, v. 10, n. 11, p. 2253, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10112253>.

DE CASTRO V. H., SCHROEDER L. F., QUIRINO B. F., KRUGER R. H., BARRETO C. C. Acidobacteria from oligotrophic soil from the Cerrado can grow in a wide range of carbon

source concentrations. **Canadian Journal of Microbiology**. V. 59, n. 11, pp. 746-53. 2013. DOI: 10.1139/cjm-2013-0331.

DE LA FUENTE-NÚÑEZ, C. et al. Broad-Spectrum Anti-biofilm Peptide That Targets a Cellular Stress Response. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 5, e1004152. 2014. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004152.

FLEMMING, H.-C.; WINGENDER, J. The Biofilm Matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, pp. 623-633. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>

FREEMAN, D. J.; FALKINER, F. R.; KEANE, C. T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. **Journal of Clinical Pathology**, v. 42, p. 872–874, 1989. DOI: 10.1136/jcp.42.8.872.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J.W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, pp. 95–108, 2004. DOI: 10.1038/nrmicro821.

HASSARD, F. et al. Mesh rotating reactors for biofilm pre-treatment of wastewaters – Influence of media type on microbial activity, viability and performance. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 103, n. part A, pp. 69–75, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.psep.2016.06.018>

HOIBY, N. A personal history of research on microbial biofilms and biofilm infections. **Pathogens and Disease**, v. 70, p. 205–211, 2014. DOI:10.1111/2049-632X.12165.

KAPLAN, J. B. Biofilm Dispersal: Mechanisms, Clinical Implications, and Potential Therapeutic Uses. **Journal of Dental Research**, v. 89, n. 3, p. 205–218, 2010. DOI: 10.1177/0022034509359403

KIELAK, Anna M. et al. Characterization of novel Acidobacteria exopolysaccharides with potential industrial and ecological applications. **Scientific Reports**, v. 7, n. 41193, 2017. DOI: 10.1038/srep41193.

KULETA, J. K.; KOZIK, M. R.; KOZIK, A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. **Acta Biochimica Polonica**. v. 56, n. 2, p. 211-224, 2009. DOI: https://doi.org/10.18388/abp.2009_2452. PMID: 19543556.

LIMA, J. L. C.; ALVES, L. R.; PAZ, J. N. P.; RABELO, M. A.; MACIEL, M. A. V.; MORAIS, M. M. C. Análise da produção de biofilme por isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* de pacientes com pneumonia associada à ventilação mecânica. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 29, n. 3, p. 310-316, 2017. DOI: 10.5935/0103-507X.20170039.

LYTE, Mark et al. Stimulation of *Staphylococcus epidermidis* growth and biofilm formation by catecholamine inotropes. **The Lancet**, v. 361, p. 130–135, 2003. DOI: 10.1016/S0140-6736(03)12231-3.

MACK, D. et al. Mechanisms of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*: functional molecules, regulatory circuits, and adaptive responses. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 294, n. 4, p. 203–212, 2004. DOI: 10.1016/j.ijmm.2004.06.015.

MOREIRA, José Luciano Bezerra; CARVALHO, Cibele Barreto Mano de; FROTA, Cristiane Cunha. **Visualização bacteriana e colorações**. Imprensa Universitária da Universidade Federal do Ceará, 2015. ISBN: 978-85-7485-238-6. Disponível em: <http://dspace.unisa.br/handle/123456789/2707>

MULCAHY, H.; CHARRON-MAZENOD L.; LEWENZA, S. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **PLoS Pathogens**, v.4, p.100- 113, 2008. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000213. PMID: 19023416; PMCID: PMC2581603.

PINTO, O. H. B. et al. Soil Acidobacteria Strain AB23 resistance to oxidative stress through production of carotenoids. **Microbial Ecology**, v. 8, p. 169-179, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01548-z>

SAGINI, J. P. N. et al. Inhibition of *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by grape and rice agroindustrial residues. **Microbial Pathogenesis**, v. 197, p. 107019, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2024.107019>.

SCHOPF, J. W. Fossil evidence of Archaean life. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 361, pp. 869–885. 2006 DOI: <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1834>

SHI, Y. et al. Treatment of oil sands process-affected water using moving bed biofilm reactors: With and without ozone pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 192, p. 219-227, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.05.068>.

SILVA, M. S. L.; BENTO, A. P.; SILVA, F. M.; DIAS, M. C. S.; FERREIRA, R. L. B.; ALVES, R. M. A.; CANDIDO, V. S. Aplicações das técnicas de imagem na detecção de

biofilmes e mecanismos de resistências em bactérias patogênicas. **Revista Aracê**, v.7, n.4, p. 17040-17050, 2025. DOI: <https://doi.org/10.56238/arev7n4-083>.

SOUZA, Andressa Baiense. **Deteção de biofilme em bactérias Gram-negativas isoladas em uma unidade de terapia intensiva neonatal**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biomedicina) — Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019. <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/27923>

STEPANOVIC S.; Vukovic D.; Dakic I.; Savic B.; Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, pp. 175-9, 2000. DOI: 10.1016/s0167-7012(00)00122-6.

STOODLEY, et al. Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**, v. 85, p. 19-28, 1999. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1998.tb05279.x.

VASQUES, N. C.; CEREZINI, P.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. **Bioprospecção de microrganismos para o uso em bioinsumos: métodos para triagem inicial de bioativos visando à nutrição de plantas e à tolerância a estresses abióticos e bióticos**. Londrina: Embrapa Soja, 2024. ISSN 2176-2937.

VERMELHO, A. B. **Práticas de Microbiologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2019. E-book. p.71. ISBN 9788527735575.

YAN D, et al. Genetic modification of flavone biosynthesis in rice enhances biofilm formation of soil diazotrophic bacteria and biological nitrogen fixation. **Plant Biotechnology Journal**, v. 20, n. 11, p. 2135-2148, 2022. DOI: 10.1111/pbi.13894. PMID: 35869808; PMCID: PMC9616522.