

Modelo de Estudo de Virulência de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Crescida em Membrana de Celulose Bacteriana

Isadora Angelo de Araujo, Cesar Augusto Tischer e Doumit Camilios-Neto

Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Caixa Postal 10.001, CEP:86057-970 Londrina, PR. E-mail: camiliosneto@uel.br

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo estudar a produção de ramnolipídeos por Pseudomonas aeruginosa PAO1 como indicador de virulência deste importante microrganismo crescido em membrana de celulose bacteriana. Pseudomonas aeruginosa são capazes de aderir e colonizar quase todos os materiais, formando comunidades chamadas de biofilme. O aumento da densidade celular promove alterações no padrão de expressão gênica através de um processo denominado quorum sensing. Essa modificação leva ao aumento na produção de fatores de virulência pela comunidade bacteriana, e a formação dos biofilmes. Neste estudo foram realizados três diferentes processos de cultivo: cultivos em membrana de celulose, submersos e submersos estáticos. O estudo da produção de ramnolipídeos sobre uma matriz inerte (membrana de celulose bacteriana) mostrou-se promissor.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*, fatores de virulência, quorum sensing, membrana de celulose, ramnolipídeos.

INTRODUÇÃO

P. aeruginosa são capazes de aderir e se desenvolver em quase todos os materiais, formando comunidades chamadas de biofilme. As etapas de formação incluem a fixação reversível em uma superfície, posterior aderência irreversível, crescimento de microcolônias, maturação do biofilme e dispersão de células para outras superfícies e materiais (FLICKINGER et al., 2011). Com o aumento da densidade celular nos biofilmes, ocorre uma alteração na expressão dos genes bacterianos através de um processo denominado quorum sensing (QS). O QS pode ser descrito em quatro etapas: (1) síntese de moléculas sinalizadoras de pequeno porte; (2) liberação dessas substâncias indutoras; (3) recepção destas moléculas por células adjacentes; e (4) alterações na regulação dos genes quando há aumento da indução simultânea (SANDOZ; MITZIMBERG; SCHUSTER, 2007). A alteração na expressão dos genes dentro do biofilme promove um aumento na produção de fatores de virulência pela comunidade (FLICKINGER et al., 2011). Neste estudo foi analisada a produção de ramnolipídeos, um dos fatores de virulência deste microrganismo, através do crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 em cultivos em estado sólido sobre membrana de celulose bacteriana, em cultivos submersos e submersos estáticos. Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um modelo de estudo de virulência de *P. aeruginosa* PAO1 crescida sobre membrana de celulose bacteriana.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismo e Pré-inóculo

O microrganismo utilizado foi a cepa de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 mantida a -80 °C em meio Luria-Bertani (LB) acrescido de 20% (v/v) de glicerol. Os pré-inóculos foram realizados em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL do meio LB, inoculados com 1 mL da suspensão de células bacterianas e incubados a 37°C por 6 horas sob agitação de 200 rpm.

Cultivos de *P. aeruginosa* PAO1 e Produção de Ramnolipídeos

Cultivos estado sólido (CES) em membrana de Celulose Bacteriana: Os ensaios para CES foram realizados em frascos Erlenmeyers 250 mL, contendo uma membrana de aproximadamente 10-12 cm de diâmetro e 165 mg de massa seca obtida como descrito por Goelzer et al. (2009). As membranas foram esterilizadas por 20 min, a 121°C, resfriados e inoculados com o pré-inóculo em uma proporção de 2% de volume de pré-inóculo (D.O.₆₀₀ entre 0,6 e 0,8) em dois volumes de solução umedecedora: 8,5 mL por membrana no primeiro ensaio, e 10 mL no segundo. A solução umedecedora utilizada era constituída de meio de sais (contendo por litro: 3,0 g KH₂PO₄; 7,0 g K₂HPO₄; 0,2 g MgSO₄.7H₂O e 1,0 g (NH₄)₂SO₄) acrescida de glicerol (3% v/v). Também foram realizados ensaios adicionando 10,0 g de triptona por litro da solução umedecedora. As membranas inoculadas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C durante 9 dias.

Cultivos Submersos (CSb): Os ensaios para CSb foram realizados em frascos Erlenmeyers 250 mL, contendo 50 mL de solução umedecedora (mesma acima) com uma proporção de 2% de volume de pré-inóculo. Também foram realizados ensaios adicionando 10,0 g de triptona por litro da solução umedecedora. Os frascos foram incubados em estufa bacteriológica a 37°C, sob agitação de 200 rpm durante 9 dias.

Cultivos Submersos Estáticos (CSbE): Os ensaios para CSbE foram realizados em frascos Erlenmeyers 150 mL, contendo 17 mL de solução umedecedora (mesma acima) com uma proporção de 2% de volume de pré-inóculo. Também foram realizados ensaios adicionando 10,0 g de triptona por litro da solução umedecedora. Os frascos foram incubados em estufa bacteriológica a 37°C durante 9 dias.

Extração e Quantificação de Ramnolipídeos

Os volumes coletados após os 9 dias de incubação foram centrifugados a 4.000 rpm por 10 min e os sobrenadantes foram submetidos à extração com CHCl₃:MeOH (3:1) (extrato orgânico bruto) e quantificação indireta dos ramnolipídeos pelo método de fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma vez que os ramnolipídeos são um dos fatores de virulência deste microrganismo, e que a o controle da síntese destes compostos é regulado pelo QS, a produção desta classe de glicolipídeos foi escolhida para se avaliar a virulência de PAO1.

Na primeira tentativa de avaliar a produção de ramnolipídeos por CES em membrana de celulose utilizou-se 8,5 mL de solução umedecedora por membrana de celulose (assim como descrito por Amaral et al., (2014). No entanto, no referido trabalho, utilizou-se a cepa de *P.*

aeruginosa UFPEDA 614, cuja melhor taxa de crescimento é a 30°C (CAMILIOS-NETO et al., 2011), enquanto que para a cepa PAO1 a temperatura é de 37°C. Dessa forma, durante as primeiras tentativas de cultivo notou-se que a membrana perdeu muita água para o ambiente, comprometendo o crescimento bacteriano e a produção de ramnolipídeos (Fig. 1 A). Fato que se deve a maior taxa de evaporação proporcionada pela maior temperatura de cultivo (37°C). Deste modo, optou-se por um aumento na quantidade de solução umedecedora utilizada (de 8,5 mL para 10 mL), o que proporcionou um incremento na produção de ramnolipídeos (Fig. A).

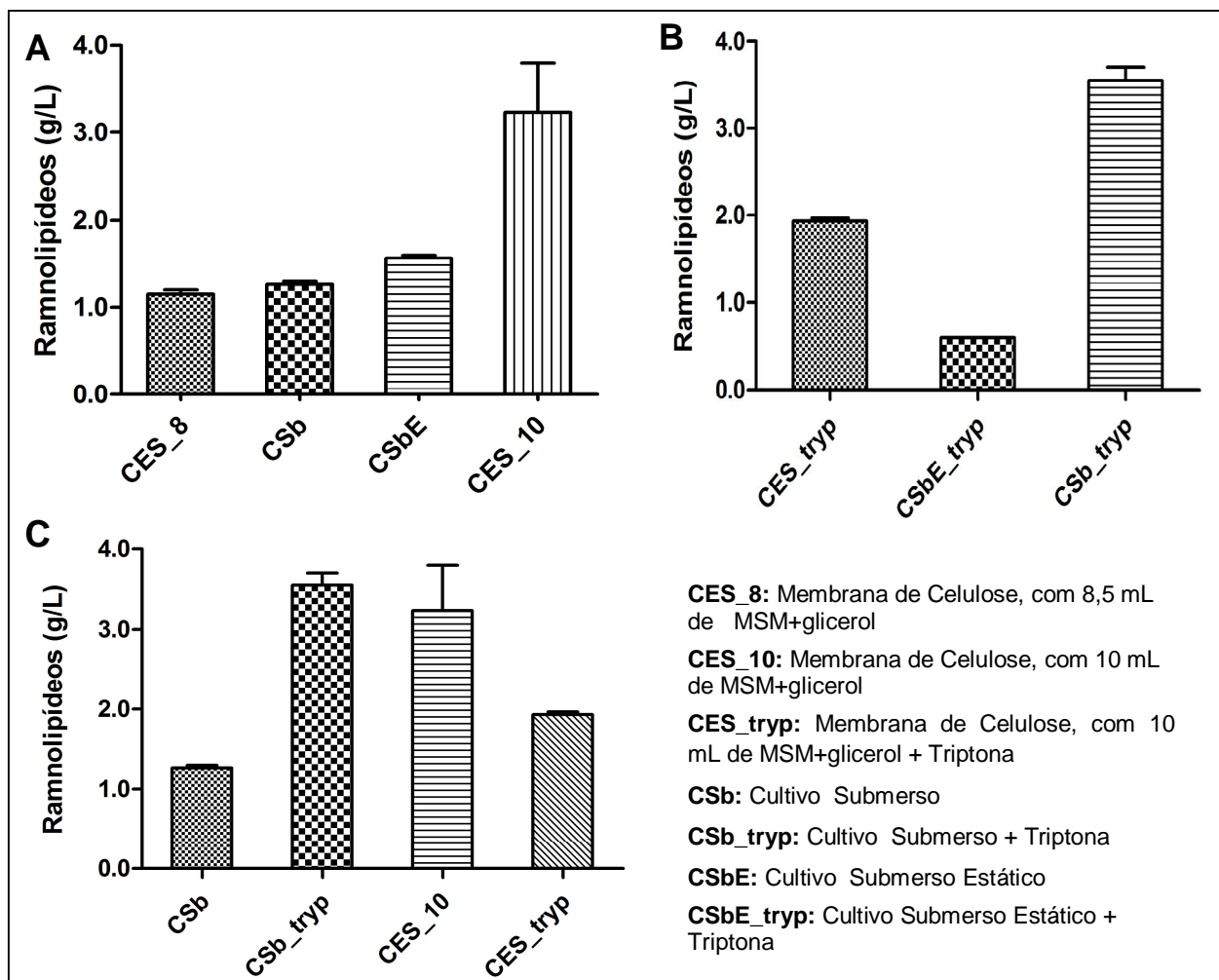


Figura 1 Produção de ramnolipídeos nos diferentes processos de cultivo, na presença e ausência de triptona

O processo de CES utilizando membranas de celulose é particularmente diferente das CES utilizando outros suportes sólidos. Esta diferença está relacionada à necessidade da membrana de celulose em ficar todo o período do cultivo submersa na solução umedecedora, já que, como anteriormente apontado, esta perde água muito facilmente para o ambiente (AMARAL et al.,

2014). Assim, o processo descrito neste trabalho não é uma CES clássica, pois o sistema impossibilita a formação dos poros (fase gasosa contínua entre as partículas sólidas).

Em relação aos outros dois tipos de cultivo, cultivos submersos e submersos estáticos, o cultivo em membrana de celulose bacteriana mostrou-se mais eficiente para a produção de ramnolipídeos, alcançando uma média de 3,0 g/L (Fig. 1 A e C). A maior produção dos ramnolipídeos nos cultivos sólidos sugere um estímulo positivo do processo no sistema de virulência da bactéria. Adicionalmente, tentou-se uma outra forma de estímulo do sistema de virulência de PAO1, adição de triptona (forma hidrolisada da caseína) nos diferentes processos de cultivo. A presença de peptídeos poderia estimular o QS da PAO1, já que para consumir estes compostos primeiramente o microrganismo precisa expressar as proteases extracelulares que apresentam regulação transcricional por este sistema (SANDOZ; MITZIMBERG; SCHUSTER, 2007). Houve um aumento considerável na produção de ramnolipídeos nos cultivos submersos e uma diminuição significativa de produção de ramnolipídeos nos cultivos submersos estáticos e na CES (Fig. 1 B e C). Mais estudos precisam ser feitos, e no momento não é possível traçar nenhuma conclusão mais elaborada da possível função deste composto na variação da produção de ramnolipídeos, tão pouco qual é a relação deste com os diferentes processos de cultivo.

CONCLUSÕES

Neste trabalho estabeleceu-se um modelo padrão para comparação da produção de ramnolipídeos como indicador de virulência. O estudo da produção de ramnolipídeos sobre uma matriz inerte (membrana de celulose bacteriana) mostrou-se promissor. A utilização deste sistema poderá proporcionar avanços na compreensão do metabolismo microbiano durante a produção de ramnolipídeos por CES assim como proporcionar *insights* sobre os fatores de virulência, o QS e a produção de ramnolipídeos.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, M; CHAVES, HF, FARIA-TISCHER, PCS; TISCHER, CA; CAMILIOS-NETO, D. Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* crescida em membrana de celulose bacteriana. **IV Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia**, Londrina, p. 4, ago. 2014.
- CAMILIOS-NETO, D; BUGAY, C; SANTANA-FILHO, AP; JOSLIN, T; SOUZA, LM; SASSAKI, GL; MITCHELL, DA; KRIEGER, N. Production of rhamnolipids in solid-state cultivation using a mixture of sugarcane bagasse and corn bran supplemented with glycerol and soybean oil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, p. 1395-1403, 2011.
- DUBOIS, M; GILLES, KA; HAMILTON, JK; REBERS, PA; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.
- FLICKINGER, ST; COPELAND, MF; DOWNES, EM; BRAASCH, AT; TUSON, HH; EUN, YJ; WEIBEL, DB. *Quorum Sensing* between *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Accelerates Cell Growth. **Journal of the American Chemical Society**. Washington, DC - USA, v. 133, n. 15, p. 5966-5975. 24 mar. 2011.
- GOELZER, FDE; FARIA-TISCHER, PCS; VITORINO, JC; SIERAKOWSKI, MR; TISCHER CA. Production and characterization of nanospheres of bacterial cellulose from *Acetobacter xylinum* from processed rice bark. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, p. 546-551, 2009.
- SANDOZ, KM; MITZIMBERG, SM; SCHUSTER, M. Social cheating in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, p. 15876-15881, 2007.