



Estudo da formação de biofilmes por *Pseudomonas aeruginosa*

¹Marcos Antônio Batista Caixeta* (IC), ¹Ananda da Silva Braga (IC), ¹Débora Godoi Souza de Almeida (IC), ¹Plínio Lázaro Faleiro Naves (PQ). E-mail: marcosabatista80@gmail.com

¹Universidade Estadual de Goiás, Campus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas - Henrique Santillo (GO).

Resumo: A formação de biofilme por *P. aeruginosa* ocorrem através da produção de polissacarídeos específicos que aumentam sua patogenicidade e poder de resistência a antibióticos, mediante outros fatores da inibição da penetração. Uma das principais características do biofilme microbiano é sua alta capacidade de resistência aos antibióticos e ao sistema de defesa do hospedeiro sendo em média de 10 a 100 vezes maiores comparado as formas de vida planctônicas. Esta baixa susceptibilidade a antimicrobianos faz com que seja difícil erradicar essas infecções causados por bactérias formadoras de biofilmes. Este trabalho tem por objetivo estudar a cinética da formação de biofilmes por *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e 27853, provenientes da coleção do Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual de Goiás (CCET), em microplacas de poliestireno em diferentes meios e intervalos de tempo, com a quantificação da biomassa total formada utilizando a metodologia descrita por Stepanovic et al. (2004) com algumas modificações. *P. aeruginosa* é um patógeno oportunista que possui grande habilidade natural na formação do biofilme, explorando diversos nichos ambientais, portanto, sendo a principal causa de infecções nosocomiais em hospitais brasileiros, acometendo maior parte da população debilitada ou imunodeprimida.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*. Cristal violeta. Biofilme

Introdução

Biofilmes são comunidades microbianas compostas por uma ou mais espécies aderidas a um substrato embebido em uma matriz de polímeros extracelulares (exopolissacarídeos), que se diferenciam das formas livres planctônicas, tanto do ponto de vista fenotípico como genotípico (MOLINARO, et al. 2009; KASNOWSKI, et al. 2010).

A formação dessa estrutura microbiana é constituída de algumas etapas a saber: adesão inicial, mudança de vida planctônica para sésil, formação de micro colônias, maturação, destacamento de células e retorno do estilo de vida planctônico ou colonização de outro sítio. Essas estruturas podem ocorrer em vários tipos de ambientes, sejam eles bióticos ou abióticos (MOLINARO, et al. 2009).



Pseudomonas aeruginosa é um micro-organismo com extensa difusão, são detectados no meio ambiente (superfícies de plantas, no solo, na água) e em seres humanos, visto que fazem parte da microbiota. Diversas das infecções nosocomiais estão associadas a formação do biofilme em sistema de ventilação, abastecimento de água, feridas crônicas e instrumentos médicos como superfícies de cateteres, bisturis, marca-passos, válvulas cardíacas. Estas podem tirar partido deste biofilme e aumentar sua resistência a fatores como a proteção contra antibióticos, desinfetantes, o sistema imune inato e a várias influências ambientais negativas, permitindo-lhes assim abranger vários nichos ambientais e colonizar diversas matrizes de tecido, solo e planta (GARRETT; BHAKOO; ZHANG, 2008; MULCAHY; VICENT; LEWIS, 2014; MASÁK, 2014).

A adesão bacteriana varia com relação as interações físico-químicas na etapa de adesão primária (reversível) de acordo com a superfície na qual ocorre. Em superfícies bióticas este processo se dá por meio de interações não específicas (interações eletrostáticas, hidrofóbicas, de Van der Waals), já em superfícies abióticas envolve interações mediadas por ligações específicas do tipo receptor-ligante como ligações covalentes, iônicas e pontes de hidrogênio (TRENTIN; GIORDANI; MACEDO, 2013; MALAFAIA, 2016).

Existem diversos protocolos que foram propostos ao longo dos anos para analisar a formação relativa de biofilme, dentre estes os mais comuns são relacionados a análise de biofilme estático, sendo realizados em microplacas de 96 poços, permitindo uma triagem de alto rendimento para quantificar o crescimento de biofilme, onde se destaca os métodos baseados em corantes, como cristal violeta, safranina e outros corantes metabólicos como resazurina. (HANEY, E. et al, 2018).

Uma abordagem inovadora que permite a análise de formação do biofilme e susceptibilidade antimicrobiana e o dispositivo *Calgary Biofilm* que possibilita o crescimento de biofilmes em pinos suspensos em uma tampa de placa de microtitulação, entretanto este ainda é de alto custo para pesquisas. No entanto, o método de coloração com cristal violeta que se liga à moléculas de superfície carregadas negativamente e a polissacarídeos da matriz extracelular e considerado “padrão ouro” para quantificação de biofilmes em microplaca, uma



vez que é um ensaio de baixo custo relativo, e de fácil reprodutibilidade (O'TOOLE, G. A., 2011). Portanto, visto que esta formação de biofilmes por bactérias vem acarretando inúmeros problemas, em diversas áreas, busca-se com este projeto a otimização dos ensaios para formação do biofilme por *P. aeruginosa* e quantificar a adesão através da biomassa total formada em diferentes meios e intervalos de tempo, empregando-se a metodologia de ensaio colorimétrico com cristal violeta, que é um método rápido, confiável, de baixo custo, alto rendimento e adaptável.

Material e Métodos

Micro-organismos utilizados no estudo

Para a realização dos ensaios foram utilizadas estirpes padrão de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027 e 27853) provenientes da coleção do Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual de Goiás (UEG – CCET).

Manutenção e reativação das cepas estudadas

A manutenção das cepas foi realizada conforme descrito por Silva, Costa e Chinarelli (2008) com pequenas modificações. Primeiramente, foram realizados repique das cepas a fim de se obterem colônias isoladas. As cepas foram repicadas em meio sólido ágar cetrimida, pela técnica de esgotamento por estrias e as placas incubadas a 35°C por 24 horas. Logo em seguida, foram transferidas de 3 a 5 colônias isoladas e típicas para um tubo com 15 mL caldo Nutriente + 20% de glicerol, seguidas de homogeneização em agitador de tubos (vórtex) por 15 segundos, após este procedimento os tubos foram incubados por 12 horas a 35°C. Em seguida, foram transferidas alíquotas de 1 mL para microtubos tipo *Eppendorf*, previamente esterilizados e devidamente rotulados. Posteriormente as alíquotas foram armazenadas a 8° C por sete dias e congeladas em freezer a -20°C.

As cepas foram reativadas em ágar cetrimida, pela técnica do esgotamento. As placas foram semeadas com auxílio de alças de platina e em seguida incubadas a 35°C por 24 horas.

Produção de biofilmes "*in vitro*" em microplacas: determinação da biomassa total (polissacarídeos e bactérias)



Foi utilizada a metodologia descrita por Stepanovic et al. (2004) com algumas modificações. Resumidamente, as colônias de *Pseudomonas aeruginosa* foram suspensas em 5 mL de solução fisiológica estéril 0,9 % e a suspensão foi ajustada a escala 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹). Em seguida foi transferido 1 mL da suspensão para 9 mL dos caldos de Soja Trypticaseína (TSB) e Água Peptonada (AP) (1/10), ajustando o inóculo para $1,5 \times 10^7$ UFC mL⁻¹.

Depois, em cada poço de uma microplaca de poliestireno, contendo 100 µL do meio de cultura TSB e AP, foram colocados 5 µL da suspensão celular para o crescimento do biofilme (1×10^5 mL⁻¹), exceto no poço usado para como controle negativo, no qual foram colocados 100 µL de meio de cultura.

As microplacas foram incubadas nos intervalos de 24h e 48h. Após este período foi feita a leitura visual, confirmando o crescimento das cepas e a não contaminação dos controles negativos. Posteriormente os meios de cultura foram retirados dos poços, e lavado três vezes com 200 µL de solução fisiológica estéril para a remoção das células não aderidas.

Para os ensaios de estudo da biomassa total, as placas foram tratadas segundo metodologia descrita por Naves et al. (2008). Resumidamente, foram adicionados 110 µL de cristal violeta a 1% por 10 minutos, em seguida o corante foi desprezado e as placas lavadas cinco vezes com 200 µL de água destilada. As placas foram secadas a 35°C por 20 minutos, posteriormente foram adicionados 110 µL de etanol absoluto em cada poço para a coloração das bactérias aderidas e a placa incubada durante 10 minutos. Posteriormente, as leituras das densidades ópticas (DO) de cada poço foram realizadas por um leitor de placas automatizado (Epoch) a 492 nm.

A partir das densidades ópticas obtidas foram calculadas a formação de biofilme pela seguinte fórmula: $FB = BA - PC$ (NAVES, 2009). Sendo que FB corresponde à formação do biofilme, BA é a densidade óptica a 492nm dos poços com as bactérias aderidas, PC representa as densidades ópticas dos poços controle não inoculados.

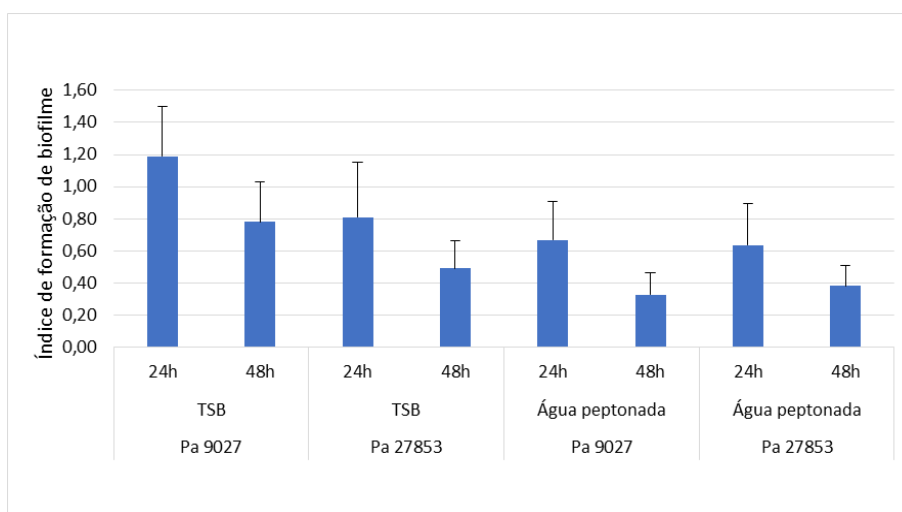
Análises estatísticas

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e em ensaios independentes. As variáveis quantitativas geradas, índices de formação de biofilmes,

foram analisadas descritivamente com o cálculo das médias e desvios padrão. Para avaliar o significado das diferenças entre a formação de biofilme nas diferentes condições testadas foi utilizado o teste t de Student pareado bicaudal ($p < 0,01$).

Resultados e Discussão

Gráfico 1: Índices de formação de biofilmes de *P. aeruginosa* ATCC 9027 e 27853 em caldo TSB e água peptonada nos intervalos de 24h e 48h.



TSB - Caldo de Soja Triptocaseína, Pa - *Pseudomonas aeruginosa*

Como é possível apreciar no Gráfico 1, *P. aeruginosa* ATCC 9027 apresentou melhor desempenho na formação de biofilmes, notadamente em caldo TSB quando comparado ao da *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Outro aspecto revelado é que todas as leituras obtidas com 24h de incubação foram superiores as obtidas com 48h e que o caldo TSB propiciou melhores índices de formação de biofilme quando comparado a água peptonada. Os ensaios foram realizados em sistema fechado, onde não ocorre renovação dos nutrientes e as substâncias tóxicas acumulam-se no meio. Por isso os resultados da formação de biofilme nas primeiras 24 horas mostraram-se mais intensos em relação as placas incubadas por 48 horas.

O caldo TSB é caracterizado como um meio altamente nutritivo e equilibrado, sendo este de uso geral para o crescimento de uma grande variedade de micro-organismos incluindo fungos e bactérias, este que em nosso estudo proporcionou um ambiente mais adequado para o crescimento das bactérias e formação de



biofilme. Em contraste, a água peptonada que é considerada um meio mínimo para o crescimento, usada em diluições seriadas de amostras para análise, transporte de micro-organismos e para o pré-enriquecimento não seletivo de *Salmonella sp* (SILVA, JUNQUEIRA, SILVEIRA, 2001, apud PITON, 2012) e em nossas condições experimentais não propiciou condições ótimas para a formação de biofilme pelas cepas de *P. aeruginosa* estudadas.

As diferenças observadas foram analisadas do ponto de vista estatístico pelo teste t de Student e os resultados estão expressos na Tabela 1

Tabela 1: Estudo da significância das diferenças encontradas entre os meios de cultura e tempo de incubação nos ensaios de formação de biofilme para as cepas de *P. aeruginosa* ATCC 9027 e 27853.

Cepas	Variáveis estudadas com o teste t de Student				
	TSB 24h vs 48h	AP 24h vs 48h	TSB 24h vs AP 24h	TSB 48h vs AP 48h	TSB 24h vs AP 48h
Pa 9027	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Pa 27853	< 0,0001	< 0,0001	= 0,0053	= 0,0004	< 0,0001

Pa - *Pseudomonas aeruginosa*, TSB - Caldo de Soja Triptocaseína, AP - Água peptonada

A partir da análise dos resultados obtidos pode se observar que a disponibilidade de nutrientes é determinante para uma maior formação de biofilme. Sugerindo interferência em relação ao nutriente do meio de cultura e capacidade da bactéria em expressar fatores de adesão.

A primeira etapa do processo de formação do biofilme começa pela adesão reversível de bactérias planctônicas sobre uma superfície adequada para o crescimento, seguido pela fixação irreversível de bactérias que posteriormente formam microcolônias na matriz de EPS (RASAMIRAVAKA, T. et al. 2015). Substrato e célula bacteriana podem influenciar essa adesão inicial a superfícies inertes através de suas propriedades, tendo como exemplo hidrofobicidade, rugosidade superficial, presença de fímbrias, flagelos e produção de EPS. Fatores como temperatura, pH, tempo de incubação ou composição do meio de cultura são



capazes de afetar as propriedades das células bacterianas em iniciar a adesão (KALICIŃSKA, A.; TYSKI, S. 2009; ZERAIK, A. E.; NITSCHKE, M. 2012).

Diversos estudos, explorando vários tipos de bactérias, foram estabelecidos por Stepanovic et al. (2000, 2004) onde de forma geral nesses estudos o meio de cultura que produzia maior nível de células aderentes variou para cada linhagem microbiana, no qual a inanição seria capaz de aumentar a adesão de alguns micro-organismos, ao passo que outros exibiam altas taxas de adesão em meio rico em nutrientes. Nestes estudos eles confirmaram diferentes níveis de produção de biofilme de acordo com o teor de nutrientes do meio, observando que para *Salmonella spp* a adesão era maior em meio pobre em nutrientes, enquanto para *L. monocytogenes* o meio rico em nutrientes produziu mais biofilme.

Ao analisar diferentes isolados de *P. aeruginosa*, Kalicińska, A.; Tyski, S. (2009); Perez, L.; Barth, A. (2011), utilizando metodologia semelhante ao do presente estudo, também reportaram maior capacidade de formação de biofilme sob superfícies inertes, em concentrações mais elevadas de nutrientes.

Segundo Donlan (2002), o processo de ligação do micro-organismo a superfície sólida para formação do biofilme é um processo complexo regulado por diversas características como substrato, superfície celular e meio de crescimento, estando este último ainda pouco compreendido e, de acordo, com Shrout et al. (2006, 2011), uma possível explicação para a influência no desenvolvimento do biofilme de *P. aeruginosa* pode estar relacionada a determinantes genéticos e ambientais, no qual ambiente nutricional é capaz de modular a arquitetura do biofilme de acordo com a fonte de carbono utilizada para crescimento, descrevem também outro fator ligado a essas condições nutricionais para controlar a formação do biofilme, o sistema *quorum-sensing*, sendo este importante por regular genes essenciais ao metabolismo, síntese proteica e de virulência, como os genes do biofilme.

Considerações Finais

A partir da análise dos resultados obtidos pode se observar que a disponibilidade de nutrientes é determinante para uma maior formação de biofilme. Estudos mostram que a formação de biofilme é induzida em condições limitadas de



nutrientes. Sendo assim, a disponibilidade de nutrientes desempenha um papel importante na transição a partir de um modo de vida planctônico para um modo sésil.

Embora tendo sido documentada por muitos anos a existência de biofilmes, somente nas últimas décadas que tem se destacado as ferramentas para estudar seus aspectos relacionados a formação e desenvolvimento, isto graças a novas descobertas genéticas e moleculares, assim como o desenvolvimento de novas técnicas de detecção da adesão bacteriana, por exemplo, as técnicas de microscopia e de placa, permitindo avaliar o crescimento e adesão de um biofilme em uma dada área de superfície, e como estas técnicas são normalizadas, possibilitam uma fácil reprodução e posterior comparação em outros trabalhos (TOUTAIN; CAIAZZA; O'TOOLE, 2004; GARRETT; BHAKOO; ZHANG, 2008).

Portanto o desenvolvimento de métodos sensíveis para a formação de biofilmes revela-se uma questão importante pois permite detalhar com mais precisão sobre sua estrutura e propriedades, além de ajudar a desenvolver métodos eficazes de erradicação do biofilme (HANEY, E. et al, 2018).

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Plínio Lázaro Faleiro Naves, pela oportunidade. Ao Técnico do laboratório de microbiologia Osvaldo G. Pinto pela ajuda, atenção, e apoio à realização desse trabalho e a UEG pelo investimento financeiro

Referências

DONLAN, R. M. **Biofilms: microbial life on surfaces**. *Emerging Infection Diseases*, Atlanta, v. 8, n. 9, p. 881-890, 2002.

GARRETT, T. R.; BHAKOO, M.; ZHANG, Z. **Bacterial adhesion and biofilms on surfaces**. *Progress in Natural Science*, v. 18, n. 9, p. 1049-1056, 2008.

HANEY, E. F. et al. **Critical Assessment of Methods to Quantify Biofilm Growth and Evaluate Antibiofilm Activity of Host Defence Peptides**. *Biomolecules*, v. 8, n. 2, p. 29, 2018.



KALICIŃSKA, A.; TYSKI, S. **Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm production in relation to cultivation media and biofilm staining methods.** Medycyna doświadczalna i mikrobiologia, v. 61, n. 3, p. 243-252, 2009.

KASNOWSKI, M. C, et al. **Formação de biofilme na indústria de alimentos e métodos de validação de superfícies.** Revista científica eletrônica de medicina veterinária, v. 8, n. 15, p.103-126, 2010.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock.** 14^a ed. Porto Alegre: Artmed, cap. 7, p. 230, 2016.

MALAFAIA, C. B. **Formação de biofilme, atividade antibiofilme de extratos vegetais e avaliação de métodos de extração de proteínas em fitobactérias.** 2016. 98 f. Tese (Doutorado em ciências biológicas)-Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Pernambuco, 2016.

MASÁK, J. et al. **Pseudomonas biofilms: possibilities of their control.** FEMS microbiology ecology, v. 89, n. 1, p. 1-14, 2014.

MOLINARO, E. M. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde.** v. 1 Rio de Janeiro: EPSJV. 2009.

MULCAHY, L. R.; VINCENT, I.M.; LEWIS, K. **Pseudomonas aeruginosa biofilms in disease.** Microbial ecology, v. 68, n. 1, p. 1-12, 2014.

NAVES, P. L. F. **Formación de biopelículas por “*Escherichia coli*” y su correlación com factores de virulência: Prevención y actividad de antimicrobianos frente a organismos.** Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, 2009.

NAVES, P.; et al. **Correlation between virulence factors and in vitro biofilm formation by *Escherichia coli* strains.** Microb.Pathogen, v.45, p.88-91, 2008.

O'TOOLE, G. A. **Microtiter dish biofilm formation assay.** Journal of visualized experiments: JoVE, n. 47, 2011.

PEREZ, L. R. R.; BARTH, A. L. **Biofilm production using distinct media and antimicrobial susceptibility profile of *Pseudomonas aeruginosa*.** Brazilian Journal of Infectious Diseases, v. 15, n. 4, p. 301-304, 2011.

PITON, M. A. J. et al. **Formação de biofilmes e produção de moléculas sinalizadoras de *quorum sensing* por cepas de *Salmonella spp.* isoladas de processamento de frango,** 2012. Tese Doutorado - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP 2012.

RASAMIRAVAKA, T. et al. **The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: a review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms.** BioMed research international, v. 2015, 2015.



SHROUT, J. D. et al. **The contribution of cell-cell signaling and motility to bacterial biofilm formation.** MRS bulletin, v. 36, n. 5, p. 367-373, 2011.

SHROUT, J. D. et al. **The impact of quorum sensing and swarming motility on Pseudomonas aeruginosa biofilm formation is nutritionally conditional.** Molecular microbiology, v. 62, n. 5, p. 1264-1277, 2006.

SILVA, J. O. et al. **Manutenção de leveduras por congelamento a – 200C.** RBAC, v. 40, n. 01, p.73-74, 2008.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de Métodos de Análise microbiológica de Alimentos.** 2. ed. São Paulo (S.P.): Livraria Varela, 2001. p. 41-58.

STEPANOVIC, S. et al. **A modified microtiterplate test for quantification of staphylococcal biofilm formation.** Journal of Microbiological Methods, Amsterdam, v. 40, n. 2, p. 175–179, 2000.

STEPANOVIC, S. et al. **Biofilm Formation by Salmonella spp. and Listeria monocytogenes on plastic surface.** Letters in Applied Microbiology, v. 38, n. 5, p. 428-432, 2004.

TOUTAIN, C. M.; CAIAZZA, N. C.; O'TOOLE, G. A. **Molecular basis of biofilm development by pseudomonads.** In: Microbial biofilms. American Society of Microbiology, p. 43-63, 2004.

TRENTIN D.S, GIORDANI R. B, MACEDO A. J. **Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate.** Revista Liberato, Novo Hamburgo, v. 14, n. 22, p. 113-238, 2013.

ZERAIK, A. E.; NITSCHKE, M. **Influence of growth media and temperature on bacterial adhesion to polystyrene surfaces.** Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 55, n. 4, p. 569-576, 2012.