



Microscopia de força atômica para o estudo da formação de biofilmes da bactéria *Escherichia coli* em soluções aquosas.

Juliana A. F. Burguim*, Paula S. Casagrande, David M. Soares
DFA – Laboratório de Nanoestrutura e Interfaces
Instituto de Física “Gleb Wataghin”, Universidade Estadual de Campinas

Resumo

O objetivo deste trabalho foi estudar a formação de biofilmes da bactéria *Escherichia coli*, em amostras secas e aquosas, utilizando-se a técnica de microscopia de força atômica (AFM). Esta técnica nos permite obter imagens topográficas da superfície de uma amostra permitindo a visualização de detalhes sobre o biofilme formado pela *E. coli*. O estudo com bactérias iniciou-se utilizando a técnica de não-contato para a observação da bactéria *Bacillus velezensis* (anteriormente conhecida como *bacillus amyloliquefaciens*). Devido a pandemia de Covid-19, os estudos foram interrompidos não permitindo a conclusão deste trabalho utilizando a bactéria *E. coli*, principal objetivo deste trabalho.

Palavras-chave:

AFM, *Escherichia coli*, biofilme

Introdução:

As bactérias são microrganismos vivos unicelulares (formado de uma única célula), pois estão em todos os lugares, podendo ser benéficas ou não.^[1] A maioria das bactérias formam biofilme muito resistente, difícil de eliminar, permitindo sua proteção em condições desfavoráveis, restringindo a penetração de substâncias nocivas às elas, como antibióticos, o que as tornam mais resistentes. Além disso, o biofilme admite à troca de nutrientes e formação das colônias de bactéria. Entender o controle de comunidades microbianas e seus biofilmes fornece vários benefícios em diferentes aplicações, como pesquisadores nas áreas de ciências e engenharia de materiais, incluindo biomedicina, odontologia, ecologia, agricultura e processamento industrial.^{[2][3]}

Para análises da superfície do biofilme, utilizamos a técnica do AFM, as forças de coesão (atração e repulsão) entre a amostra e uma sonda do microscópio de força atômica, resultam em uma imagem topográfica do biofilme.^[4]

A bactéria escolhida para visualização desses biofilmes foi a *E. coli*, encontrada normalmente no trato gastrointestinal inferior dos organismos de sangue quente.^[5] Alguns sorotipos (linhagem de bactérias que se diferenciam causando diferentes sintomas) causam inflamações. O contágio provém da falta de higiene e o contaminante presente na água e alimentos.^{[6][7][8][9]}

Materiais e Métodos:

O equipamento utilizado para a Microscopia de Força Atômica foi AutoPro-CP. Seu esquema simplificado está na figura 1. No AFM a amostra a ser analisada encontra-se presa ao piezoelétrico que faz movimentos nos eixos x, y e z (fig.2). Na ponta do cantilever há uma sonda, que se movimenta pela força de coesão entre a sonda e a amostra. Um laser de baixa potência incide na ponta do cantilever, que reflete o movimento para o receptor. O software do AFM nos mostra a imagem que é formado por linhas (fig.2).^{[4][10]}



Fig. 1 Esquema representativo do funcionamento do AFM.^[11]

A figura 2 mostra alguns dados do software do AFM do modelo AutoPro-CD. O quadro verde quadriculado corresponde os picos e vales da amostra no eixo z e comprimento da área no eixo y. Nessa leitura o eixo z é representado por cada lateral 50nm por divisão e no eixo y cada parte corresponde 200nm por divisão. Usamos a opção no software “Slope” para deslocar a amostra mais plana, quando esta apresenta alguma inclinação. A opção “Size” irá demarcar a área a ser varrida pela sonda. É necessário ter o conhecimento do que se está estudando, pois a varredura desse equipamento abrange de 1 Å a 100 µm, ou seja, antes de visualizar a bactéria pode-se visualizar uma pequena parte de sua capsula. A opção “Rate” determina a velocidade para fazer a varredura da amostra. Em leituras atômicas costuma-se usar baixa velocidade entre 0,5 a 0,3 Hz, mas precisa cautela, pois os átomos da sonda podem interagir com os átomos da mostra. A opção “Set Point” está na unidade de nN que representa a força aplicada na sonda pra que se aproxime mais da amostra, é necessário avaliar bem a topografia pois se aproximar demais a sonda pode tocar a amostra danificando-a. A opção “Gain” permite a elevação da sonda (eixo z). Se elevar demais a sonda oscila o sistema e forma os “ruídos”, que são esses riscos brancos na imagem maior dourada figura1. O AFM é um equipamento sensível, ao levantar a sonda para fazer outras medidas posteriormente, todos seus parâmetros mudam, levando bastante tempo para ajusta-lo novamente.^[10]

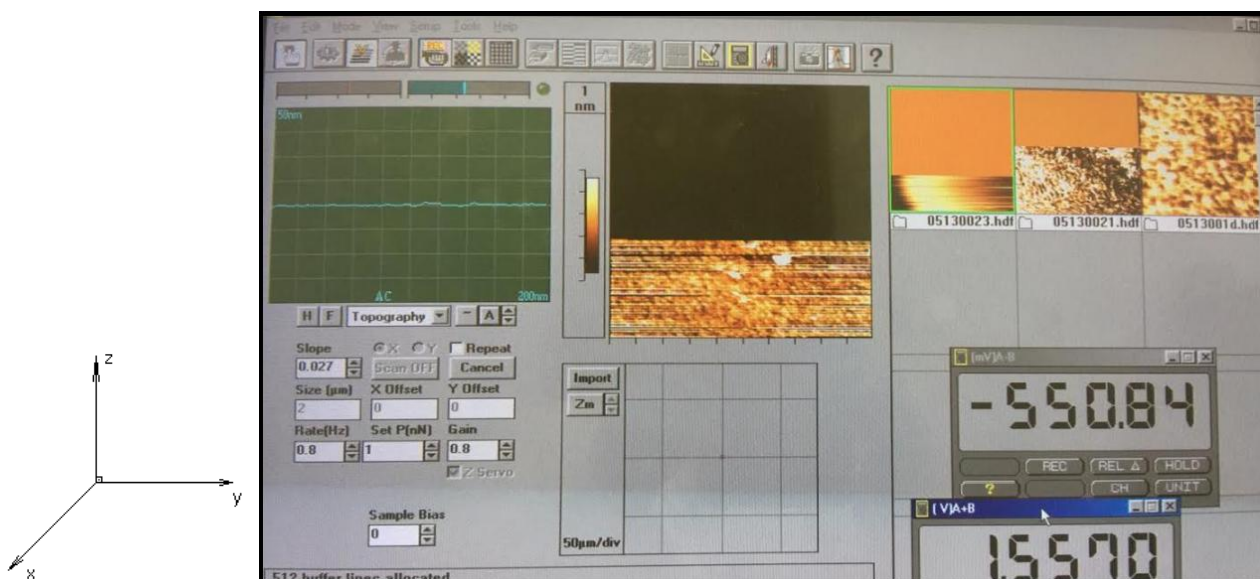


Fig. 2 À esquerda eixo mostrando direção e sentido dos eixos de movimentação do piezoelétrico e a direita Foto software do AFM AutoPro-CD.

Modos de operação do AFM

O **Modo Contato em meio seco** é para amostras rígidas. Modo onde a sonda se aproxima mais da amostra. Para a prática foram utilizadas superfícies de ouro, mica, silício e algumas desconhecidas. A figura 3 mostra a leitura feita de uma amostra desconhecida sobre nanofilme de ouro, com os parâmetros: size 2µm; rate 1,5 Hz; set p 0,80 nN; gain 1.

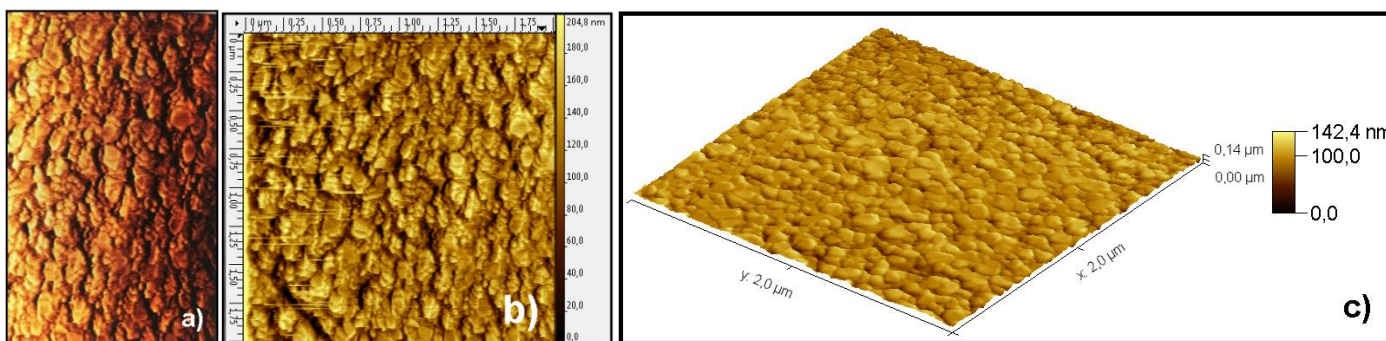


Fig.3 Amostra desconhecida sobre nanofilme de ouro a)foto da amostra no software AutoPro-CD, b) imagem 2D tratada no editor Gwyddion, c) imagem 3D no editor Gwyddion

O **Modo Não-Contato** é recomendado para amostra gelatinosa. A distância entre sonda e a superfície da amostra é de 50 a 100 Å.^[10] A figura 4 corresponde leitura feita da bactéria *Bacillus velezensis*, no meio Landy por 24hs na estufa na temperatura de 37°C, diluída na proporção de 4 gotas da bactéria no meio Landy em 4 ml de água Mili-Q, ficando muito concentrado (fig.6-c). Houve a necessidade de uma nova diluição, feita com 2 gotas da solução 4 ml de água Mili-Q (fig.6-d). Nessa leitura os parâmetros foram: size 20µm; rate 0,5 Hz; set p -0,15 nN; gain 0,3.

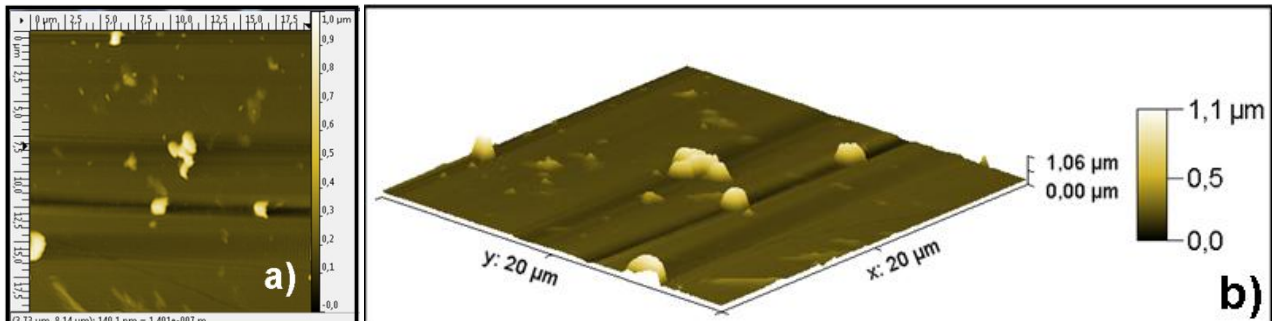


Fig.4 Imagem *B.velezensis* (seca) feita no AFM pelo Modo Não-Contato editada no Gwyddion a) 2D b)3D

O **Modo Contato em meio líquido.** Este modelo AutoPro-CD as amostras devem ser sólidas e presas em superfície sólida, este modelo não faz Não-Contato em meio líquido. Tentativa em fazê-lo fez com que as bactérias *bacillus velezensis* ficassem em suspensão (fig.6-a). Nesse Modo forma-se microbolhas, que ficam entre a superfície do líquido e o vidro do cartucho (fig. 5-b e 6-b). Essas microbolhas espalham o laser, não sendo possível a leitura. Para retirar as microbolhas é necessário colocar uma gota no vidro do cartucho (fig.5-c). Por causa da tensão superficial da água a gota permanece no vidro quando viramos o cartucho para encaixar no AFM (fig. 5-d).

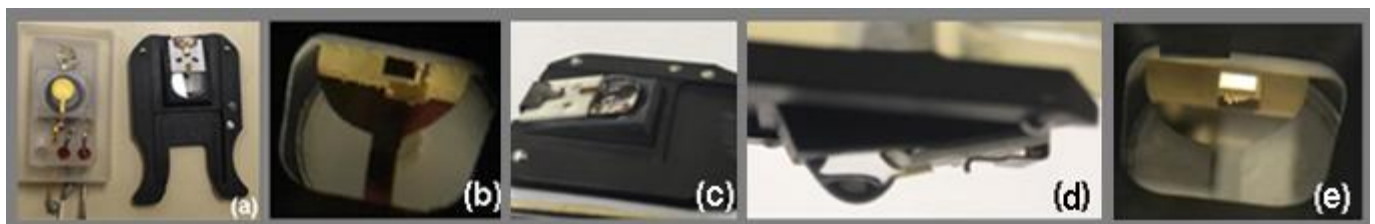


Fig.5 Foto componentes para leitura em líquido no AFM modelo AutoPro-CD a) célula e cartucho b) microbolhas c) gota no cartucho d) cartucho voltado para baixo com a gota de água e) cartucho sem microbolhas

O AFM possui um microscópio que projeta as amostras em um monitor (fig.6), podendo assim orientar a melhor região para fazer a varredura e a área com melhor concentração da amostra (fig.6-c e 6-d)

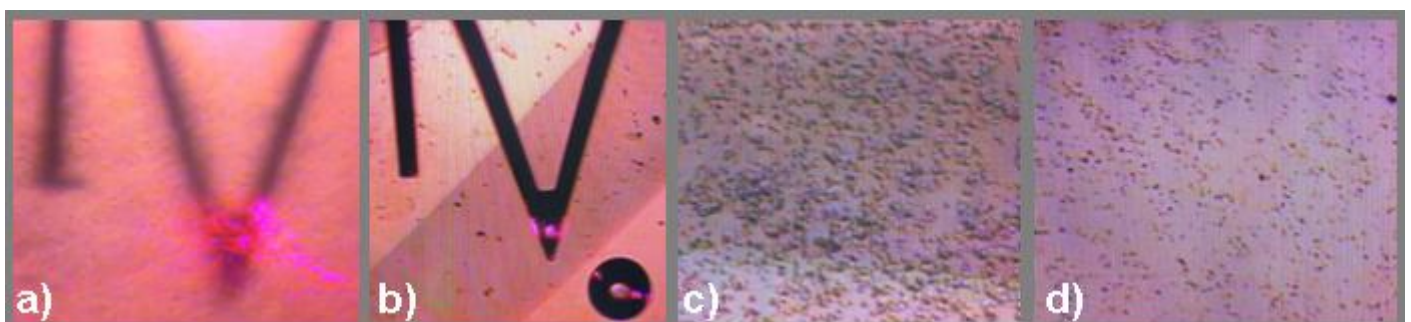


Fig.6 Fotos das amostras microscópicas projetada no monitor a) *B. velezensisem* em suspensão no meio líquido b) lipossomo em meio líquido e a microbolha espalhando o laser c) *B. velezensisem* muito concentrada d) *B. velezensisem* diluída da solução da imagem anterior.

Após esse aprendizado com a bactéria *B. velezensis* iniciou-se as medidas de *E. coli* não produtoras de biofilme no Caldo Tripitona Soja como meio de cultura, com objetivo de compararmos com as bactérias da mesma espécie produtoras de biofilme. Quando caldos são utilizados como

meio de cultura as bactérias crescem por dispersão sem a formação de colônias.^[12] A solução da amostra foi feita com 10 gotas de água Mili-Q e 4 gotas da bactéria no caldo. Começamos com a leitura no Modo Não-Contato, mas a amostra possui uma secagem rápida. A amostra seca é rígida, portanto mudamos para o Modo Contato. Nesse Modo a sonda se aproxima mais da superfície da amostra. A figura 7 mostra a imagem do aglomerado da bactéria *E. coli*. Os parâmetros utilizados foram size 17 μm ; rate 0,3 Hz; set p -0,5 nN; gain 0,5.

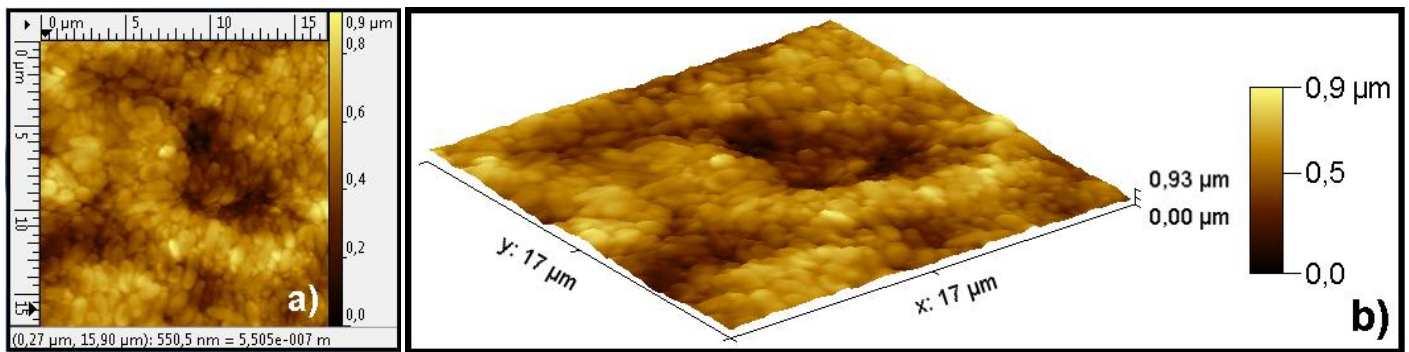


Fig.7: Imagens da *E.coli* sem biofilme aberta no Gwyddion a) 2D b)3D

As imagens da figura 8 mostram os bacilos da *E.coli* para a comparação das imagens feita no AFM. A *E. coli* possui um tamanho 1.1-1.5 μm por 2.0-6.0 μm vivas, 0.4-0.7 μm por 1.0-3.0 μm secas.^[13]

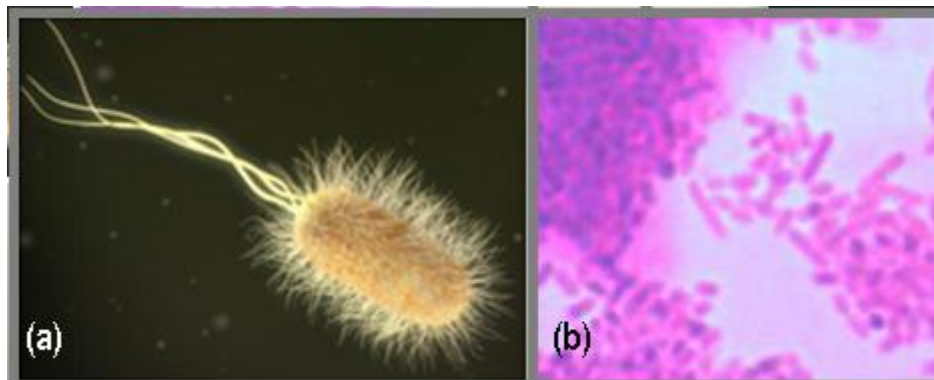


Fig.8 Bactéria *E. coli* a) Ilustração em 3D^[14] b) foto microscópica feita no laboratório de biologia da Unicamp

Devido à pandemia de Covid-19 tivemos atrasos no estudo de bactéria e até o momento ainda não foi possível realizar as medidas de biofilme formada pela *E. coli* que é o nosso objetivo principal.

Resultado/Conclusão

Os resultados obtidos com este trabalho foram o aprendizado da técnica nos três diferentes modos e os conhecimentos adquiridos sobre bactérias, em especial a *E. coli*. Infelizmente o projeto foi prejudicado devido a pandemia de Covid-19 e, portanto, os resultados finais de medidas realizadas com a *E. coli* não puderam ser apresentados, mas o projeto continua em andamento com o objetivo de realizarmos as medidas com a *E. coli*. Esperamos identificar as possíveis diferenças nas amostras que produzem e não produzem biofilme.

Agradecimentos:

Agradecemos a CAPES pela bolsa de doutorado da aluna Paula S. Casagrande (IFGW) e Marina Rodrigues Pinto Garcia (IB). Ao SAE-UNICAMP pelo financiamento da aluna Juliana A. F. Burguim. A PUCCampinas Pós-doutorado Wyllerson E. Gomes e ao Prof. Augusto Etchegaray Jr. Ao Prof. Dr. Domingos da Silva Leito do Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes do Instituto de Biologia da Unicamp. E ao PIBIC por supervisionar este projeto.

Bibliografia

- [1] Limoli, D. H., Jones, C. J., Wozniak, D. J. & Cruz, S. Bacterial Extracellular Polysaccharides in Biofilm Formation and Function. *Microbiol Spectr.* **3**, 1–30 (2015)
- [2] Higa, S. J. Biofilmes bacterianos: vivendo em comunidade
<http://microbiologia.icb.usp.br/cultura-e-extensao/textos-de-divulgacao/bacteriologia/bacteriologia-oral/biofilmes-bacterianos-vivendo-em-comunidade/>
- [3] Renner, L. D. & Weibel, D. B. Physicochemical regulation of biofilm formation. *MRS Bull* **36**, 347–355 (2011).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3224470/>
- [4] Giessibl, Frazz. J. Advances in atomic force microscopy. Augsburg, ano 2003, n. 3, Vol. 75, p. 949-983
- [5] Araguaia, M. "Escherichia coli"; *Brasil Escola*
- [6] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC99016/#B56> Acessado fevereiro 2020
- [7] Wright, C. J., Shah, M. K., Powell, L. C., & Armstrong, I. (2010). Application of AFM from microbial cell to biofilm. *Scanning*, 32(3), 134–149.
<https://doi.org/10.1002/sca.20193>
- [8] <https://www.msmanuals.com/pt/casa/infec%C3%A7%C3%B5es/infec%C3%A7%C3%B5es-bacterianas-bact%C3%A9rias-gram-negativas/infec%C3%A7%C3%B5es-por-escherichia-coli> Acessado fevereiro 2020
- [9] <https://www.msmanuals.com/pt/casa/infec%C3%A7%C3%B5es/infec%C3%A7%C3%B5es-bacterianas-bact%C3%A9rias-gram-negativas/infec%C3%A7%C3%B5es-por-escherichia-coli> Acessado setembro 2020
- [10] M. ThermoMicroscopes User' Guide To AutoProbe-CB Part I
- [11] https://www.researchgate.net/figure/Schematical-representation-of-the-AFM-The-image-was-reproduced-with-permission-of-C_fig1_235346071
Acessado 22/10/2019
- [12] <https://www.ufjf.br/microbiologia/files/2013/05/ROTEIRO-PARA-AULAS-PR%c3%81TICAS-bacteriologia-2018-vers%c3%a3o-02-2018.pdf> Acessado outubro 2020
- [13] <https://naturdata.com/especie/escherichia-coli/39451/0/> Acessado setembro 2020
- [14] <https://microbiologysociety.org/why-microbiology-matters/what-is-microbiology/bacteria.html> Acessado outubro 2020