

VALIDAÇÃO DE MODELO GERAL DE ADESÃO DA BACTÉRIA *Xylella fastidiosa*

Palavras-chave: adesão bacteriana, *Xylella fastidiosa*, modelo geral de adesão.

Andressa Batori Rocha IFGW- Unicamp

Profa. Mônica A. Cotta IFGW– Unicamp

OBJETIVOS DA PESQUISA

O objetivo geral deste projeto foi obter informações quantitativas sobre o processo de adesão bacteriana em seus estágios iniciais, usando a bactéria *Xylella fastidiosa* como modelo e permitindo a validação experimental de um modelo bioquímico de adesão.

Para isso, foi realizada a análise de imagens de microscopia óptica, com o uso de softwares de processamento de imagens, para correlacionar indicadores de adesão celular com as condições físico-químicas da cultura bacteriana.

A pesquisa se baseou nas seguintes etapas:

- Explorar a adesão da *Xylella fastidiosa* em condições diversas através da mudança do pH, variações da composição do meio líquido e da presença de cátions divalentes no meio de cultura.
- Identificar sob que condições a adesão bacteriana da *Xylella fastidiosa* é mais favorecida, através da quantificação de células aderidas nas amostras com diferentes condições físico-químicas, já disponíveis.
- Correlacionar as condições para a adesão com o modelo proposto pelo LNB.

INTRODUÇÃO

Um biofilme consiste em uma comunidade de microrganismos que pode ser relacionada a atividades biológicas tais como infecções bacterianas e à resistência contra antibióticos. Diferentemente do que se observa em células planctônicas, as bactérias dentro de um biofilme se acumulam de maneira interativa, e desta maneira, apresentam características diferentes das que são conhecidas em relação a células individuais.¹

O modelo mais aceito para o desenvolvimento do biofilme assume que sua formação começa com a adesão reversível de uma única célula a uma superfície. Com a produção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), a adesão torna-se irreversível, e o *cluster* de células cresce, até que a produção de matriz do biofilme é iniciada.²

Essa matriz hidratada de EPS é formada principalmente por polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos; ela proporciona

estabilidade mecânica do biofilme e auxilia na sua adesão à superfície, ao mesmo tempo que protege as células em seu interior das defesas do hospedeiro.³

A bactéria *Xylella fastidiosa*, de natureza fitopatogênica, habita dois ambientes: o seu vetor de transmissão (inseto) ou seu hospedeiro (planta). Ela é responsável por doenças em plantas em todo o mundo, causando grande prejuízo econômico. Sua patogenicidade decorre de biofilmes formados no xilema, que causam o bloqueio da passagem de água e nutrientes no interior das plantas infectadas.

Essa bactéria, por ser de crescimento lento (tempo de duplicação entre 6 e 24h), pode ter seu ciclo de vida acompanhado por experimentos de microscopia que permitiram a observação da adesão de célula à superfície por um dos polos até a formação do biofilme, e sua arquitetura flutuante.⁴ Observamos também o efeito da mudança da composição química da superfície nas características fenotípicas do biofilme formado.⁵

Experimentos mais recentes, com um meio de cultura específico e com um número mínimo de componentes químicos, mostram a dependência da adesão da *Xylella fastidiosa* em uma superfície;⁶ além de depender das características específicas da própria bactéria, como a presença de adesinas, a adesão é determinada por fatores extrínsecos como as propriedades do meio líquido e a natureza físico-química da superfície⁶. É claro, portanto, que entender os fatores que intermediam a adesão bacteriana, passo essencial para o desenvolvimento subsequente do biofilme, é um ponto essencial para encontrarmos mecanismos de impedir sua formação. Deste modo, este tipo de estudo pode contribuir com o entendimento da dinâmica de doenças em plantas infectadas.

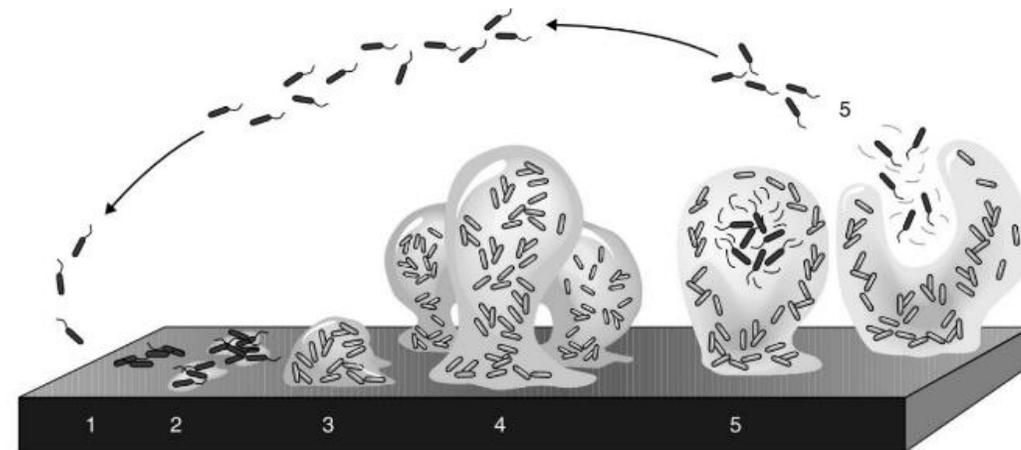


Figura 1: Modelo dos estágios de desenvolvimento de biofilme bacteriano. Imagem adaptada de Sauer et. al⁸

METODOLOGIA DA PESQUISA

Cerca de 120 amostras foram produzidas no LNB (previamente à este projeto). Para sua produção, foram utilizadas superfícies inorgânicas com propriedades conhecidas, tais como silício, titânio, alumínio, níquel, ouro, germânio e fosfeto de índio. Culturas de *Xylella fastidiosa* foram crescidas usando o meio específico mínimo e diferentes condições de pH. Para estas amostras, o tempo de crescimento bacteriano foi limitado de forma que apenas células individuais ou pequenos *clusters* foram formados. Foram, então, observadas por microscopia óptica de campo claro nas ampliações 50x, 20x, 10x, 5x. Neste trabalho foram analisadas todas as imagens de ampliação 50x.

Através do uso do softwares de análise de imagens, ImageJ/Fiji⁷, foram delimitadas as áreas das diferentes amostras nas condições utilizadas do meio de cultura, variando tipo de substrato e pH.

Quanto à utilização do programa ImageJ/Fiji⁷, primeiramente, todas as amostras foram convertidas em imagens binárias, que é um método de segmentação que separa as partes da imagem de forma que grupos de pixels com intensidades parecidas sejam separados de outros. Segundamente, foi analisada a imagem de uma placa sem as bactérias, chamada de branco, pois essa placa apresenta marcas provenientes do caminho óptico do microscópio utilizado. As imagens então passaram por um tratamento inicial para excluir estas marcas da contagem da área de cobertura (como é mostrado na Figura 2). A contagem da área foi feita através de uma ferramenta do próprio programa para todas as imagens com magnificação 50x de cada tipo de amostra, e essa área foi normalizada, ou seja, foi dividida pelo número de imagens de cada amostra, a fim de que essa informação fosse coerente com a área total observada.

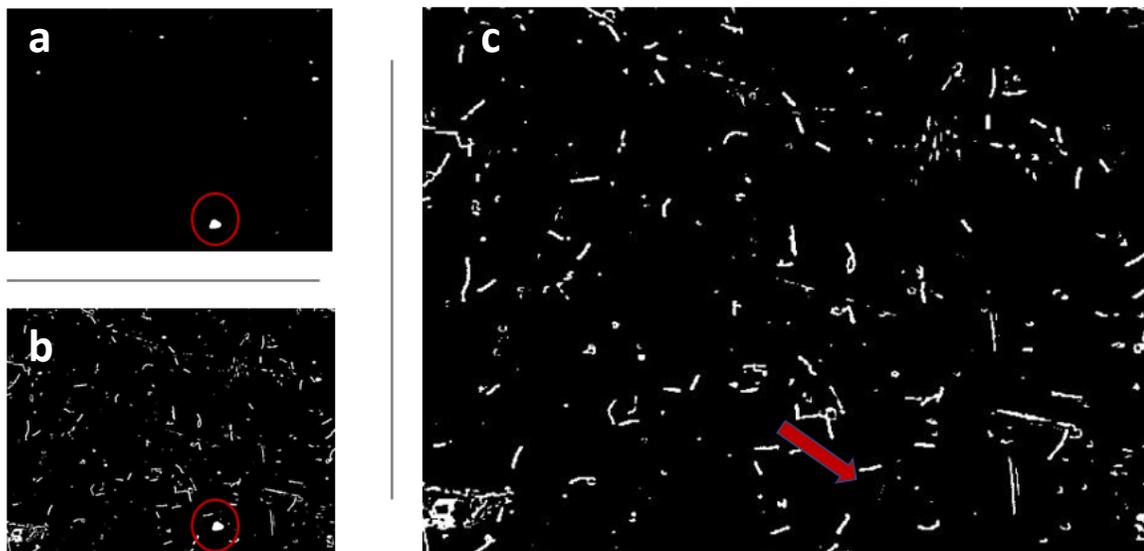


Figura 2: a) O branco; b) Imagem da amostra na placa de Au, pH 4,63, anterior ao tratamento pelo programa ImageJ/Fiji; c) A mesma imagem da amostra na placa de Au, no pH 4,63, após o tratamento inicial.

Na sequência, foi montado um script que rodasse todas essas etapas de maneira automática em todas as amostras de magnificação 50x. Assim, o processo foi realizado com maior velocidade que caso fosse realizado manualmente. Os dados extraídos foram, então, tratados. Foram convertidos a uma escala adequada (μm^2) e foi feita a soma das áreas normalizadas.

Como a área de cobertura da amostra pode ser tomada como um indicador da velocidade de reação célula-superfície no processo de adesão, este indicador foi analisado em função do pH do meio de cultura, e da presença de íons divalentes a ele adicionados. Com estes resultados, obtivemos um mapeamento das condições físico-químicas nas quais ocorre a adesão da *Xylella fastidiosa*. A partir da análise correspondente, será possível refinar as condições de pH e força iônica do experimento, além de alterar a estrutura de membrana da bactéria por tratamentos químicos, afetando por exemplo os antígenos presentes no lipo-polissacarídeo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nessa pesquisa foi analisado o comportamento da adesão bacteriana em função de diferentes pHs e nos substratos: Au (ouro), Ge (Germânio), InP (fosfato de índio), Si (silício tratado com plasma) e Si₂ (silício sem tratamento com plasma).

Foram montados dois tipos de gráficos. Um em que é comparada a soma das áreas de cada *cluster* em cada substrato e em cada pH, e no outro compararemos o tamanho médio de cada contorno feito pelo programa ImageJ/Fiji⁷, que pode ser um *cluster* ou uma célula única aderida de tamanho médio entre $1\mu\text{m}^2$ e $1,6\mu\text{m}^2$. Com essa comparação, podemos trazer para essa discussão o tipo de estrutura formado na superfície.

Podemos observar no Gráfico 1, de maneira clara, que há a tendência do crescimento da área coberta por bactérias conforme o pH se torna mais básico na amostra de Au. Nas outras amostras, a tendência não é tão nítida, não sendo possível no estágio atual da pesquisa afirmar sobre o comportamento delas. Além disso, a validação do que é observado será possível somente após a análise estatística dos dados apresentados.

No Gráfico 2, de média da área de contornos em função do pH, podemos tirar informações sobre a natureza da adesão bacteriana. Sendo que uma média próxima do valor da área ocupada por uma célula única (entre $1\mu\text{m}^2$ e $1,6\mu\text{m}^2$) indicaria a não formação de aglomerados de bactérias.

Na amostra de Au, por exemplo, vemos que mesmo com um aumento gradual na área total recoberta (Gráfico 1) e o tamanho médio de cada *cluster* se mantém. Isso mostra que nessa amostra, apesar do crescimento da área, não

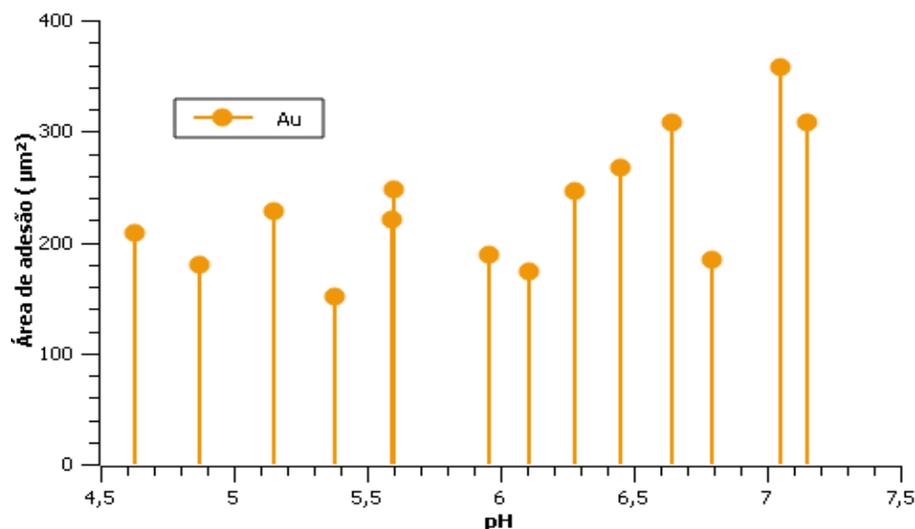


Gráfico 1: Área de cobertura total do Au X pH

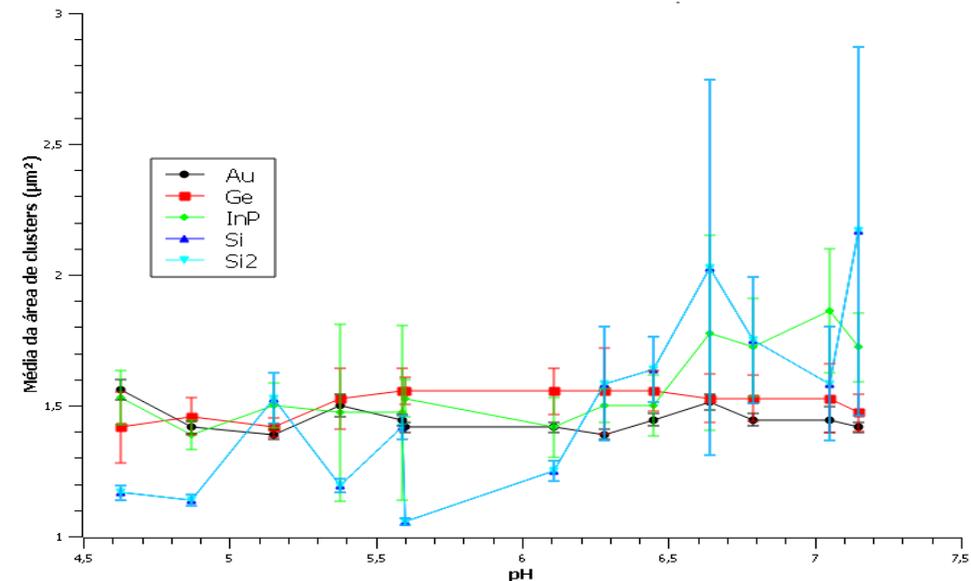


Gráfico 2: Média da área de contornos X pH

há indícios de formação expressiva de *clusters*, pois não há aumento significativo no tamanho dos contornos.

Podemos também analisar a dispersão dos tamanhos de cada contorno. Nas amostras em que a barra de incerteza é bastante expressiva, como em Si2 (silício sem tratamento com plasma), podemos deduzir que há em quantidade expressiva tanto de células únicas aderidas, quanto de *clusters*.

Já no Gráfico 3, é possível observarmos com nitidez que nas amostras de Au e Ge há maior área coberta em pHs básicos, enquanto que nas amostras InP, Si e Si2, as maiores áreas cobertas se encontram em pHs levemente ácidos. Por outro lado, vemos maiores áreas de adesão nos substratos de Au, InP e Si2, do que em relação a Si (com tratamento) e Ge.

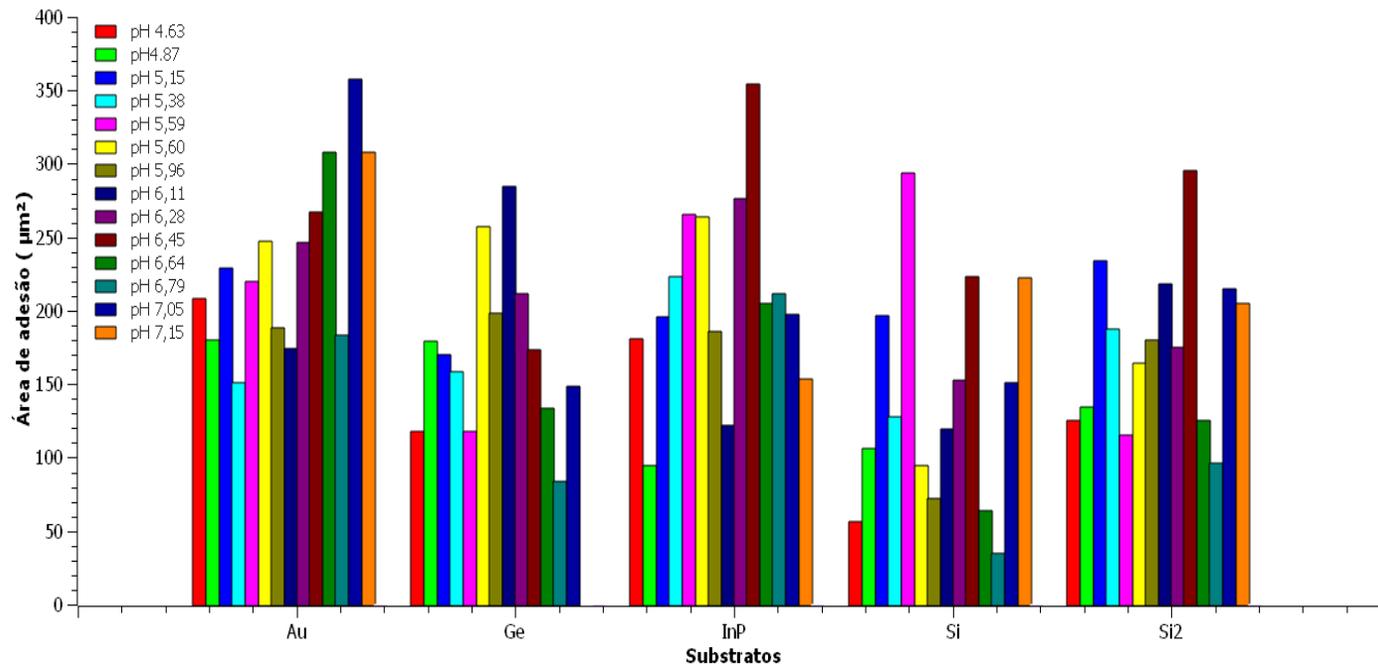


Gráfico 3: Área de cobertura total X pH (amostras separadas)

CONCLUSÕES

Podemos concluir que a adesão apresenta um caráter que varia com o tipo de substrato e pH do meio de cultura. Maiores áreas de adesão são observadas para substratos de Au, InP e Si2, porém no Au a adesão é prioritariamente de célula única, enquanto clusters maiores são observados para o InP e Si2, particularmente para valores de pH mais básicos.

Neste trabalho, os resultados poderão servir como um instrumento para posteriores estudos. Pois conhecendo melhor as condições necessárias para a adesão da bactéria *Xylella fastidiosa*, será possível gerar novos caminhos para inovações em

diversas áreas do conhecimento, entre elas, destacam-se: a criação de antibióticos eficazes e tratamentos para plantas infectadas pela bacteriana, com o foco sendo no impedimento da adesão e, conseqüentemente, na formação de biofilmes.

Além disso, este conhecimento também torna o estudo de bactérias em geral mais propício pois, através do entendimento do mecanismo de adesão estudado, é aberto um caminho de como gerir um meio de cultura para que ele seja mais barato e eficiente.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Wingender, J., Neu, T. & Flemming, H.-C., in *Microbial Extracellular Polymeric Substances* (eds Wingender, J., Neu, T. & Flemming, H.-C., p. 1–19, Springer, Heidelberg, 1999).
- 2) Mayer, C. et al., The role of intermolecular interactions studies on model systems for bacterial biofilms. *Int.J. Biol. Macromol.* 26, 3–16 (1999).
- 3) Flemming, H., Wingender, J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 8, 623–633 (2010).
- 4) Lorite, G. S. et al., Surface physicochemical properties at the micro and nano length scales: role on bacterial adhesion and *Xylella fastidiosa* biofilm development. *PLoS One* 8, e75247 (2013).
- 5) R. Janissen et al., Spatiotemporal distribution of different extracellular polymeric substances and filamentation mediate *Xylella fastidiosa* adhesion and biofilm formation. *Scientific Reports* 5, 9856 (2015)
- 6) Munar, D. M. M. Investigação das características físico-químicas da bactéria *Xylella fastidiosa* e seus biofilmes. Tese de doutorado IFGW-Unicamp (Campinas, 2017).
- 7) <https://imagej.net/ImageJ>, acessado em 25/08/2021.
- 8) Sauer, K. The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome Biol.* 4, 1–5 (2003).