



Estudo da formação de biofilme "in vitro" de *Escherichia coli* isoladas de água.



Denise Quinta Malachias (IC)(1); Fernanda Soares Niemann (PG*)(1); Ana Carolina Amaral Lopes (PG*)(1); Tomomasa Yano (PQ)(1)
(1) Departamento de Microbiologia e Imunologia, IB, UNICAMP

Resumo

Escherichia coli é um bacilo Gram-negativo pertencente à família *Enterobacteriaceae* e está relacionada à gastroenterite humana. Associa-se a produção de biofilmes à virulência destas bactérias. A capacidade de formar biofilmes tem importância clínica, já que estes quando formados sobre ou dentro de aparatos médico-hospitalares podem disseminar infecções nosocomiais, constituindo uma séria ameaça à saúde pública. Este estudo visa observar a produção destes biofilmes por bactérias isoladas de água, correlacionando-os com a patogenicidade destes microrganismos. Para avaliar a formação de biofilmes foram realizados testes de formação de película para as amostras isoladas de água de consumo, em quatro meios de cultura diferentes, sendo: TSB, LB, Muller Hinton e BHI, dos quais o primeiro apresentou os resultados mais significativos. O ensaio em microplaca de 96 cavidades foi realizado para as trinta e oito amostras sendo 21 isoladas de água de consumo, 10 isoladas de água do mar e 7 isoladas de água doce em meios de cultura distintos: TSB, LB, BHI e Müller Hinton. Os ensaios mostraram que as amostras apresentaram formação de biofilme diferenciada alterando-se o meio de cultivo mas não apresentaram diferenças significativas na produção de biofilme mesmo sendo coletadas de ambientes distintos.

Introdução

Escherichia coli é um microrganismo, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, presente no trato gastrointestinal dos animais e do homem, fazendo parte da flora intestinal normal. (Nataro & Kaper, 1998) São bastonetes Gram negativos, não esporulados, anaeróbios facultativos, crescem bem em meio de cultura sintético, contendo nutrientes simples e fermentam açúcares. No entanto, algumas linhagens desse microrganismo podem ser patogênicas e causar doenças, recebendo a denominação genérica de *Escherichia coli* enterovirulenta (EEC). A adesão da bactéria à célula do hospedeiro é um pré-requisito para a colonização e infecção.

Biofilmes são comunidades complexas de microrganismos compostas por densos agregados de células microbianas embebidas em uma matriz viscosa produzida por elas mesmas a anexada a superfícies. As microcolônias que compõem um biofilme podem ser de uma ou várias espécies, dependendo das condições ambientais. Biofilmes bacterianos formam-se em muitos tipos de ambientes e têm sido observados em micrografias eletrônicas dos tratos vaginal, bucal e intestinal. A microbiota residente pode estar organizada em biofilmes e os densos tegumentos que formam podem explicar em parte sua barreira funcional na proteção ao seu hospedeiro.

Os biofilmes têm importância clínica por constituírem um mecanismo de colonização da superfície dos dentes, de cateteres e de implantes plásticos como válvulas cardíacas artificiais, podendo causar doenças graves. (Konobloch et al., 1992) Infecções hospitalares em pacientes com cateteres urinários ou venosos são geralmente precedidas pela formação de biofilmes nas paredes internas dos cateteres: fragmentos liberados do biofilme podem penetrar na bexiga ou na corrente sanguínea. Microrganismos presentes em biofilmes são mais refratários a antibióticos (Dodds et al., 2000) que organismos livres e são parcialmente protegidos da ação destruidora dos fagócitos. (Le Chevalier, Babcock e Lee, 1988) A capacidade de formar biofilmes sobre superfícies plásticas pode ser considerada como um fator de virulência bacteriana.

Materiais e Métodos

As amostras de *Escherichia coli* usadas neste trabalho foram previamente coletadas de água e dezessete delas fornecidas pela CETESB. Todas foram reisoladas no laboratório para a realização dos testes, utilizando os meios de cultura ágar McConkey e TSB. Para os testes realizados foram utilizados meios de cultura: BHI (caldo brain-heart infusion), TSB (caldo tripton de soja), caldo Müller Hinton e LB (caldo Luria Bertani), preparados em laboratório.

Para o teste de formação de película, três colônias de cada amostra foram semeadas em tubos de ensaio com os meios de cultura descritos. Todas as amostras foram semeadas em duplicata e deixadas à temperatura ambiente por 96hs. (Lehner et al., 2005)

Para o teste de biofilme em microplaca, as bactérias foram semeadas em microplacas de 96 cavidades e cultivadas por 18 horas em estufa com agitação à 37°C. A placa foi corada com o corante cristal violeta numa solução alcoólica e lida em leitor de ELISA à 570nm. (Wakimoto et al., 2004)

Apoio financeiro: Pibic/CnPq
*Bolsistas FAPESP

Resultados e discussão

A película é caracterizada pela presença de um halo dividindo o meio de cultura do ar, de coloração esbranquiçada, se o tubo é agitado a película se dissolve. O resultado positivo foi identificado pela presença de halo e o resultado negativo por ausência deste em meio turvo, o que indica crescimento bacteriano. (Lehner et al., 2005)

Meios de cultura	Amostras positivas	Amostras negativas	Porcentagem
TSB	16	5	76,1%
LB	10	11	47,6%
BHI	14	7	66,6%
Müller Hinton	12	9	57,1%

O resultado permite observar que entre os meios de cultura testados a formação de biofilme foi ligeiramente diferenciada em Müller Hinton e TSB, e que amostras obtidas em diferentes ambientes não demonstraram alterações significativas com relação à produção de biofilme. (Wakimoto et al., 2004) As amostras coletadas de água doce e salgada, apresentaram resultado semelhante na produção de biofilme nos ensaios realizados. Uma leitura acima de 0.2 já foi considerada positiva (Wakimoto et al., 2004) os controles foram usados apenas como parâmetros comparativos em cada uma das microplacas.

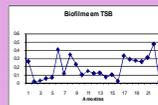


Gráfico 1 - Microplaca de TSB



Gráfico 4 - Microplaca de Muller Hinton



Gráfico 7 - Microplaca de Muller Hinton



Gráfico 2 - Microplaca de BHI



Gráfico 5 - Microplaca de TSB



Gráfico 8 - Microplaca de Luria Bertani

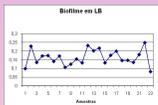


Gráfico 3 - Microplaca de Luria Bertani

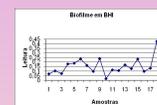


Gráfico 6 - Microplaca de BHI

Conclusão

Através dos resultados obtidos, nos testes de película e microplaca foi verificada a produção de biofilme em amostras de *E.coli* coletadas de diferentes ambientes em diferentes meios de cultivo. Foi possível concluir que o meio de cultura utilizado influencia discretamente na produção de biofilme, e que amostras coletadas de água doce ou salgada tem pouca influência sobre a produção de biofilme.

Referências

- Allison et al. J. Bacteriol. 172:1667-1669.
- Danese et al. J. Bacteriol. 182:3593-3596.
- LeCHEVALIER et al. Appl. Environ. Microbiol., v53. n3, 649-654, 1988
- Wakimoto et al. J. Trop. Med. Hyg., 71(5), 2004, pp. 687-690.
- Knobloch et al. J. Antimicrob. Chemother. (2002) 49, 683-687
- Lehner et al. J. Food Prot., 68 (11), 2287-2294, 2005.