



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

RAQUEL GIRARDELLO

**ESTUDO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME POR CEPAS DE
Pseudomonas aeruginosa ISOLADAS DE INFECÇÃO
URINÁRIA**

Londrina
2007

RAQUEL GIRARDELLO

**ESTUDO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME POR CEPAS DE
Pseudomonas aeruginosa ISOLADAS DE INFECÇÃO
URINÁRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Jacinta Sanchez Pelayo

Londrina
2007

RAQUEL GIRARDELLO

**ESTUDO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME POR CEPAS DE
Pseudomonas aeruginosa ISOLADAS DE INFECÇÃO
URINÁRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Jacinta Sanchez Pelayo

Prof. Dr. Emerson José Venâncio

Profa. Dra. Maria Cristina Bronharo Tognin

Londrina, 30 de março de 2007.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Valcir Girardello e Maria Rossi Girardello e meu irmão Ricardo Girardello pelo apoio, carinho, incentivo e dedicação em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Dr.^a Jacinta Sanchez Pelayo, pela oportunidade em desenvolver este trabalho, pela paciência e dedicação na realização desta dissertação, além da grande amizade, carinho e companheirismo em diversos momentos durante estes dois anos de convivência.

À Professora Dr.^a Halha Ostrensky Saridakis, pelos vários e valiosos ensinamentos dentro e fora do laboratório, pelo carinho e cuidado.

Ao Professor Dr. Emerson José Venâncio, pelos vários esclarecimentos e grande ajuda neste trabalho.

À Professora Msc. Floristher Elaine Carrara por ceder as amostras para a realização do trabalho e pela disponibilidade em ajudar.

À Professora Dr.^a Célia Guadalupe Tardele de Jesus Andrade, pelo suporte na realização da Microscopia Eletrônica de Varredura.

À amiga Claudia Ross pelos vários momentos de ajuda na realização dos experimentos e pela dedicação, carinho e amizade.

A Rafael Osti de Melo e Eduardo Pinheiro Góis Feniman pela grande ajuda na edição das figuras e pela amizade em todos os momentos.

À Alessandra Cristina Soares dos Santos e Leandro Pereira de Godoy, pela amizade, carinho e companheirismo em todos os momentos.

Aos amigos do Laboratório de Bacteriologia do Centro de Ciências Biológicas da UEL, Ariane Saito Bertão, Alessandra Valério Nimtz, Eliana Caroline Vespero, Juliana Resende, Karen de Castro Bauab, Kathelin Melo e Silva Lascowski, Lígia Maira Rogeri, Maria Rachel Pena Firme Brito, Paula Ignez Barbosa, Rafael Elias da Silva Penha, Sílvia Cestari e Tatiane

Yumi Ishikawa, pela amizade, carinho, companheirismo e pela ajuda em diversos momentos na realização deste trabalho e, em especial, Carlos Alfredo Salci Queiroz pela ajuda na bioinformática.

Aos colegas de turma, Alessandra Cristina Soares dos Santos, Alessandra Marega Mota, Ariane Donatti, Érika Izumi, Fernando Bizerra, Kathelin Melo e Silva Lascowski, Leandro Pereira de Godoy, Letícia Muratte, Luiz Gustavo Morelo, Marcelo Carneiro, Marcelo Tempesta de Oliveira, Mariana Minari, Nádia Hizuru Kamiji e Paulo Roberto Correa, pela amizade e companheirismo.

À coordenação e aos professores do Programa de Mestrado/Doutorado em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina.

Ao secretário José Alexandre Lopes do Programa de Mestrado/Doutorado em Microbiologia.

A todos os funcionários do Interlaboratório do Centro de Ciências Biológicas, pelo suporte técnico.

GIRARDELLO, Raquel. **estudo da formação de biofilme por cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de infecção urinária**. 2007. 40f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

RESUMO

A infecção do trato urinário é uma das infecções hospitalares mais frequentes. A formação de biofilme é um grande problema em pacientes que necessitam a utilização de cateter vesical. *Pseudomonas aeruginosa* é um microrganismo que consegue aderir ao cateter após poucas horas de inserção e formar um biofilme. Este, por sua vez, promove vantagens de sobrevivência aos microrganismos que o compõe como resistência a antibióticos, a biocidas, proteção contra o sistema imunológico do hospedeiro, entre outros. Sendo assim, o microrganismo permanece no paciente causando a infecção. O objetivo deste trabalho foi estudar a formação de biofilme em 111 cepas de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes com infecção urinária, internados ou atendidos no Hospital Universitário e no Ambulatório do Hospital das Clínicas de Londrina no período de 2003 a 2005. Através da PCR foi possível verificar a presença do gene *algC*, um dos genes responsável pela síntese do alginato, em todas as 111 cepas testadas. Noventa e um por cento (91%) das cepas aderiram na microplaca de poliestireno. Em células Vero, as amostras apresentaram um modelo de adesão agregativo semelhante ao de *Escherichia coli* enteroagregativa. As cepas testadas apresentaram uma superfície celular altamente hidrofílica. Este fato pode ser explicado pela produção do alginato que é um polissacarídeo e conseqüentemente deixa a superfície da bactéria hidrofílica. *P. aeruginosa* demonstrou, através da Microscopia Eletrônica de Varredura, grande capacidade de formar biofilme na superfície de cateter vesical.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*. Biofilme. Cateter. Infecção urinária.

GIRARDELLO, Raquel. **estudo da formação de biofilme por cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de infecção urinária**. 2007. 40f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

ABSTRACT

Urinary tract infections are one of the most frequent hospital infections. The development of biofilm is a serious problem in patients who require vesical catheter use. *Pseudomonas aeruginosa* is a microorganism that can adhere to the catheter a few hours after its insertion and form a biofilm. The biofilm provides survival advantages to the microorganisms that it is consisted of, such as antibiotics and biocides resistance, protection against the host's immune system, amongst others. That way, the microorganism stays in the patient causing the infection. The objective of this work was to study the biofilm's formation in 111 strains of *P. aeruginosa* isolated in patients with urinary tract infections, who were either hospitalized or received care at Hospital Universitário and at Ambulatório do Hospital das Clínicas of Londrina from 2003 to 2005. It was possible to verify the presence of the algC gene through the PCR, one of the genes responsible for alginate synthesis, in all 111 tested strains. Ninety one percent (91%) of strains adhered to the polyethylene micro plaque. In Vero cells, the samples presented a collective adhesion model similar to the *Enteroaggregative Escherichia coli*. The tested strains presented highly hydrophilic cell surface. This fact can be explained by the production of alginate, which is a polysaccharide and consequentially leaves the cell surface hydrophilic. *P. aeruginosa* demonstrated, through a Scanning Electron Microscope, great capacity of developing biofilm in vesical catheter surfaces.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*. Biofilm. Catheter. Urinary tract infection.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	9
OBJETIVOS	17
GERAL	17
ESPECÍFICOS	17
MATERIAL E MÉTODOS	18
AMOSTRAGEM	18
PESQUISA DO GENE <i>ALGC</i>	18
CURVA DE CRESCIMENTO	19
QUANTIFICAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME EM MICROPLACA DE POLIESTIRENO	19
MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	20
REFERÊNCIAS	21
 BIOFILM PRODUCTION BY <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> STRAINS ISOLATED FROM URINARY INFECTION	
INTRODUCTION	25
MATERIAL AND METHODS	27
Sampling	28
PCR amplification	28
Growth curve of <i>P. aeruginosa</i>	29
Phenotypic detection of biofilm formation by polystyrene microplate assay	29
Scanning Electron Microscopy	30
RESULTS	31
DISCUSSION	32
LITERATURE CITED	33

INTRODUÇÃO

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo Gram-negativo, móvel pela presença de um único flagelo e é caracterizado por não utilizar carboidratos como fonte de energia, possuindo metabolismo oxidativo. Esse microorganismo é considerado aeróbio estrito, ou seja, se desenvolve somente na presença de oxigênio. Entretanto, segundo Werner *et al.* (2004), em alguns ambientes anaeróbios, essa bactéria consegue se desenvolver na presença do nitrato, utilizando-o como aceptor final de elétrons, substituindo o oxigênio na respiração anaeróbia.

Segundo Borriello *et al.* (2004), o nitrato reduz a eficácia de muitos antibióticos contra *P. aeruginosa* em biofilmes. A ação do nitrato, alterando a fisiologia e crescimento da bactéria ainda não está totalmente elucidada. Além disso, na ausência de nitrato, esta bactéria pode utilizar a arginina.

Microorganismos dessa espécie são ubiqüitários, sendo encontrados no solo, na água, nos alimentos, nos animais e no homem, além do ambiente hospitalar (SOBERÓN-CHÁVEZ *et al.*, 2005). Podem causar infecções em humanos e em plantas, mas também, são utilizados na biorremediação pela sua capacidade em degradar componentes orgânicos, incluindo componentes tóxicos (ZHANG; MILLER, 1992; ZHANG; MILLER, 1994). Raramente causam infecções em indivíduos imunocompetentes, entretanto, possuem vários fatores de virulência, como adesinas, toxinas, exoenzimas, lipopolissacarídeo, pigmentos, entre outros, e, no ambiente hospitalar, são consideradas patógenos oportunistas e um dos principais agentes causadores de infecção hospitalar, principalmente em pacientes imunocomprometidos (HAHN, 1997; SCHAİK *et al.*, 2005).

A infecção do trato urinário é uma das infecções mais frequentemente adquiridas em hospitais (nosocomiais). *P. aeruginosa* é bastante conhecida por desencadear infecção urinária crônica em pacientes, em uso ou não de cateter urinário, pela capacidade de viver em comunidade, conhecida como biofilme (KONEMAN *et al.*, 2001; TRAUTNER; DAUROICHE, 2004).

Em geral, o trato urinário consegue eliminar os microorganismos de forma eficiente devido ao seu pH, componentes químicos e o próprio fluxo urinário. Entretanto, alguns pacientes apresentam alguma dificuldade na eliminação da urina e por isso necessitam usar sonda vesical. A interrupção do fluxo urinário normal e a permanência de urina na bexiga são fatores que predispõem o desenvolvimento da infecção. Por outro lado, o cateterismo é um procedimento invasivo que propicia o aparecimento da infecção urinária (MIMS *et al.*, 2005).

A inserção do cateter é um ponto crítico no tratamento, pois bactérias podem ser introduzidas no interior da bexiga por meio do lúmen ou na superfície externa do cateter. Esse, por sua vez, torna-se um local propício para a aderência de bactérias e formação de biofilme. Além disso, facilitadas pela inserção do cateter, bactérias entram na bexiga e podem aderir, também, no epitélio, dificultando o tratamento, já que, torna-se muito mais difícil remover microorganismos pertencentes a um biofilme do que bactérias planctônicas (livres) (MIMS *et al.*, 2005).

O tempo de cateterismo também é um fator importante para o desenvolvimento de infecção urinária. Com poucas horas de permanência no paciente, *P. aeruginosa* já consegue aderir e iniciar a formação de biofilme (MIMS *et al.*, 2005).

Como medidas profiláticas, deve-se evitar o uso do cateter sempre que possível. Quando necessário o uso desse, técnicas corretas de assepsia no momento da inserção e a permanência do cateter por um tempo mínimo no paciente são pontos importantes na prevenção de infecções no trato urinário (MIMS *et al.*, 2005).

É importante citar que, além de infecção urinária, *P. aeruginosa* também é causador de infecções em pacientes com fibrose cística, doença genética associada a defeito na secreção de cloreto, que deixa o muco muito mais espesso. Sendo assim, não conseguindo, o pulmão, expelir o microorganismo, ele permanece causando infecções (ZIELINSKI *et al.*, 1991; COSTERTON *et al.*, 1999; HENTZER *et al.*, 2001). *P. aeruginosa* também provoca infecções em pacientes com queimaduras ou outros ferimentos que rompem as barreiras físicas de proteção. Nesses casos, este microorganismo inibe a proliferação da camada celular, impedindo a cicatrização.

A formação de biofilme é a principal causa de infecção no trato urinário associada a cateter (TRAUTNER; DAUROICHE, 2004). O biofilme é uma comunidade de bactérias aderidas em uma superfície biótica e/ou abiótica, que vivem em uma matriz polimérica produzida por elas mesmas (KLAUSEN *et al.*, 2006; CLUTTERBUCK *et al.*, 2007). Essa associação promove vantagens de sobrevivência aos microorganismos, como resistência a antimicrobianos, proteção contra anti-sépticos, desinfetantes, bacteriófagos, proteção contra o sistema imunológico do hospedeiro, entre outros. A maioria dos antimicrobianos não consegue penetrar na matriz extracelular do biofilme. Bactérias planctônicas (livres) estão muito mais susceptíveis ao sistema imunológico do hospedeiro, aos antimicrobianos e outros agentes, do que as bactérias pertencentes ao biofilme (células sésseis) (CLUTTERBUCK *et al.*, 2007).

O mecanismo responsável pela resistência do biofilme aos antimicrobianos não está bem esclarecido ainda. Entre as possíveis causas está a de que há limitação na difusão do antimicrobiano dentro do biofilme ou que as bactérias que compõe o biofilme produzem enzimas que degradam as drogas (FINELLI *et al.*, 2003). Borrielo *et al.* (2004) observaram que a limitação de oxigênio é um fator importante na tolerância do biofilme de *P. aeruginosa* a antimicrobianos, mas, ressalta que esse, provavelmente, não seja o único fator. Já, Trautner e Dauroiche (2004) afirmam que a justaposição das células no biofilme facilita a transferência de genes de resistência de uma bactéria para outra, por meio de plasmídios, outro fator importante no desenvolvimento de resistência a antimicrobianos pelas bactérias pertencentes ao biofilme.

É importante deixar claro que, além da formação de biofilme, *P. aeruginosa* possui outros mecanismos de resistência a antimicrobianos, entre eles, bomba de efluxo, alteração de porinas de membrana, enzimas que degradam o antimicrobiano como Metallo β -lactamases, entre outros (DRISCOLL *et al.*, 2007).

Para iniciar a formação do biofilme, células planctônicas migram, por meio de interações eletrolíticas e hidrofóbicas, forças de van der Waals, temperatura e forças hidrodinâmicas, até uma superfície na qual irão se aderir (DUNNE, 2002). *P. aeruginosa* possui um único flagelo que promove sua locomoção até a superfície para que haja a aderência. Por meio de fímbrias tipo IV e até mesmo, o próprio flagelo, estas bactérias irão se aderir à superfície para formar um filme de microcolônias, que sofrerão maturação, constituindo o biofilme. As primeiras bactérias começam a se multiplicar, e ao mesmo tempo, novas bactérias planctônicas vão aderindo para formar a comunidade completa (HENTZER *et al.*, 2001; TRAUTNER; DAUROICHE, 2004). A fímbria tipo IV é considerada a principal adesina de *P. aeruginosa*, responsável pela aderência inicial tanto em material abiótico como na superfície de células epiteliais (HAHN, 1997). Essa fímbria é composta por milhares de subunidades protéicas de 15kDa. A aderência é mediada pela região C-terminal da subunidade estrutural da fímbria (HAHN, 1997; SCHAİK *et al.*, 2005).

Segundo Cheung *et al.* (2007), dependendo da natureza da superfície, diferentes proteínas e fatores celulares são produzidos no processo de adesão de *P. aeruginosa*.

O próximo estágio na formação do biofilme é a produção da matriz extracelular. Essa matriz é formada por substâncias polissacarídicas, produzidas pelas próprias bactérias que fazem parte do biofilme. As bactérias associadas à formação de

biofilme no sistema urinário podem utilizar componentes da urina, como proteínas, eletrólitos e outras moléculas orgânicas, para formar sua matriz (TRAUTNER; DAUROICHE, 2004).

A matriz possui pequenos poros, também chamados de canais, por onde passam nutrientes e oxigênio (COSTERTON, *et al.*, 1999; TRAUTNER; DAUROICHE, 2004).

O último estágio da formação do biofilme é o destacamento de células. Este é o processo menos estudado. Depois da maturação, alguns clusters de células são liberados e estas bactérias podem se disseminar, causando bacteremia (STOODLEY *et al.*, 2001; HUNT *et al.*, 2004). Segundo Hunt *et al.* (2004), entre as possíveis causas do destacamento, estariam a falta de nutrientes no meio, enzimas que degradam a matriz ou, ainda, a lise celular, porém, esse estágio do biofilme ainda precisa ser estudado para entender melhor os fatores responsáveis pelo destacamento (Figura 1).

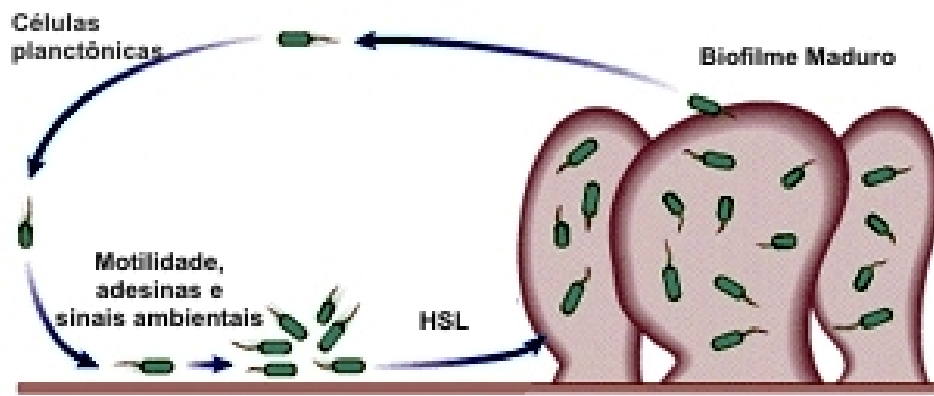


Figura 1 – Formação de biofilme em uma superfície. Fonte: Kolter e Losick, 1998.

Em *P. aeruginosa* a matriz exopolissacarídica é composta por alginato (Figura 2), um polímero de ácido manurônico e ácido glicurônico que forma uma camada viscosa ao redor da célula bacteriana, protegendo-a de antimicrobianos, desinfetantes e outros fatores (ZIELINSKI *et al.*, 1991; KIPNIS *et al.*, 2006).

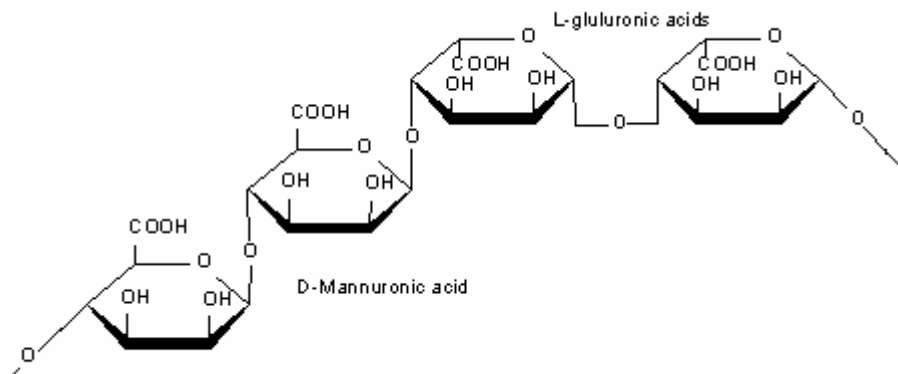


Figura 2 – Estrutura do alginato.

O cluster gênico *algACD* é responsável pela síntese do alginato e sua expressão depende de condições ambientais como alta osmolaridade, alta tensão de oxigênio e limitação de nitrogênio (DAVIES; GEESEY, 1995; O'TOOLE *et al.*, 2000; DUNNE, 2002). O gene *algC* codifica a enzima fosfomanomutase, que, por sua vez, converte manose 6-fosfato em manose 1-fosfato, sendo essencial para a produção do alginato. O alginato é o composto primário da matriz de polímeros orgânicos, matriz essa que envolve o biofilme em *P. aeruginosa* (DAVIES; GEESEY, 1995). Essa matriz é considerada, por alguns autores, responsável pela resistência a antimicrobianos, observada em biofilmes, promovendo, assim, a infecção crônica do trato urinário (TRAUTNER; DAUROICHE, 2004; CLUTTERBUCK *et al.*, 2007).

Davies e Geesey (1995) observaram que, a ativação do gene *algC* não é necessária para que haja aderência inicial das bactérias à superfície. Entretanto, para formar a matriz e conseqüentemente, para que haja maturação do biofilme esse gene é necessário, sendo que, sua inativação provoca, posteriormente, o destacamento das células da superfície. Isso porque a aderência inicial é mediada por adesinas, produzidas por *P. aeruginosa*, como fímbrias tipo IV ou até mesmo o flagelo. Somente após esta aderência é que o alginato passa a ser essencial para o biofilme. Segundo Hahn (1997), a fímbria tipo IV é responsável pelo contato inicial entre a bactéria e a superfície da célula epitelial do hospedeiro.

O gene *algC* é controlado pelo regulador transcricional *algR*. Lizewsky *et al.* (2002) observaram que a inativação do *algR*, implica na redução em até cinco vezes da expressão do *algC*. O *algR*, também desempenha papel na ação da fimbria tipo IV.

A proteína produzida pelo gene *algC* é bifuncional. Além da atividade fosfomanomutase, ela também possui atividade fosfoglicomutase, convertendo glicose 6-fosfato em glicose 1-fosfato, produzindo, assim, o lipopolissacarídeo (LPS), que é outro fator de virulência desta bactéria, responsável pelo choque tóxico, também podendo agir como adesina não fimbrial (DAVIS; GEESEY, 1995).

Além da produção do alginato, o gene *algC* também participa na síntese de outro fator de virulência da *P. aeruginosa*, o ramnolipídio (Figura 3) que, como um surfactante, tem a função de modificar as estruturas químicas ou físicas de superfícies bióticas ou abióticas para facilitar a aderência do microorganismo.

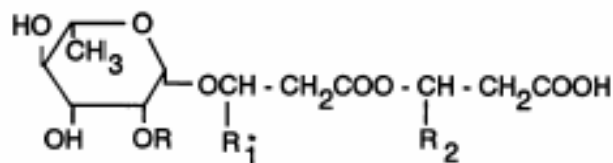


Figura 3 – Estrutura do ramnolipídio

Fonte: Zhang e Miller (1992)

Além disso, Davey *et al.* (2003) mostraram que o ramnolipídio participa da manutenção da arquitetura do biofilme. O ramnolipídio mantém os canais, que existem na matriz do biofilme, abertos para que o fluido circule levando água, nutrientes e oxigênio para todos os microorganismos pertencentes ao biofilme. Esses mesmos autores constataram que quando o gene *rhlA*, que codifica a produção do ramnolipídio, era inativado, havia a produção do biofilme, mas esse apresentava-se como uma estrutura uniforme e densa de bactérias, não possuindo os canais característicos do biofilme produzido pelas amostras que sintetizavam ramnolipídio. Também observaram que, apesar de, inicialmente, haver a formação dos canais ao redor das macrocolônias, sem a produção do ramnolipídio, o biofilme não conseguia manter estes canais abertos, formando assim, a estrutura densa de células bacterianas.

Já em 2007, Pamp e Tolker-Nielsen constataram que, além de manter os canais dentro do biofilme abertos, biosurfactantes também promovem a formação de microcolônias na fase inicial e facilitam o desenvolvimento estrutural que depende da

migração de células. Diferente de Davey *et al.* (2003), eles observaram que a amostra de *P. aeruginosa* mutante em *rhlA* não foi capaz de formar microcolônias na fase inicial da formação do biofilme. As amostras tipo selvagem e *rhlA* mutante mostraram-se diferentes na formação da comunidade, dependendo da habilidade de migração e produção do ramnolipídio.

A produção do ramnolipídio acontece, em maior quantidade, na fase exponencial ou estacionária de crescimento, onde a densidade populacional é maior. Essa produção é controlada por sinais do sistema *quorum-sensing*, devido ao aumento da população (DAVEY *et al.*, 2003).

Existe uma heterogeneidade química dentro do biofilme, fazendo com que haja, dentro de uma mesma comunidade, diferentes estágios de crescimento e de atividade metabólica (SAUER *et al.*, 2002). As diferenças nas concentrações de oxigênio, devido à limitação na penetração no biofilme, também influenciam no desenvolvimento diferente das bactérias pertencentes à comunidade (WERNER *et al.*, 2004). Esses autores também observaram que a atividade de síntese protéica é proporcional à quantidade de oxigênio que consegue penetrar naquele espaço do biofilme.

Bactérias utilizam o sistema *quorum-sensing* como mecanismo para perceber a densidade populacional ao seu redor e isso resulta na regulação de vários dos seus genes. Bactérias Gram-negativas produzem Homoserinas Lactonas Acetiladas (AHLs: Acylated Homoserine Lactones) como moléculas sinalizadoras (SMITH; IGLEWSKI, 2003).

P. aeruginosa possui dois sistemas *quorum-sensing* relacionados, *las* e *rhl*. Essa bactéria produz moléculas sinalizadoras, que se acumulam quando aumenta a densidade da população bacteriana, resultando na ativação de alguns reguladores transcricionais e modificando a expressão de genes controlados pelo *quorum-sensing* (SMITH; IGLEWSKI, 2003; McGRATH *et al.*, 2004). Ambos sistemas *quorum sensing* de *P. aeruginosa*, *las* e *rhl*, consistem em uma proteína transcricional regulatória a proteína R (LasR e RhlR). Além disso, cada sistema produz um sinal molecular autoindutor, N-(3 oxododecanoil) homoserina lactona (3O-C₁₂-HSL), produzido pela LasI sintase, no sistema *las* e, N-butilil homoserina lactona (C₄-HSL), produzido pela RhlI sintase, no sistema *rhl* (WAGNER *et al.*, 2007).

Quando aumenta a densidade populacional, há um acúmulo intracelular dos sinais moleculares autoindutores. A proteína R, então, se liga a estes sinais formando um complexo. Esse complexo, por sua vez, controla a expressão de genes alvo, pela sua ligação com elementos do DNA conhecidos como *las* box ou *rhl* box (WAGNER *et al.*, 2007).

Em *P. aeruginosa*, o *quorum-sensing* regula genes importantes do metabolismo, síntese protéica e de virulência, como os genes do biofilme.

MacLehose *et al.* (2004) testaram a importância das moléculas sinalizadoras do *quorum-sensing* na resistência a antimicrobianos e constataram que bactérias mutantes na formação destes sinais moleculares não desenvolviam um biofilme como as outras, estando mais susceptíveis à ação dos antimicrobianos. Shrouf *et al.* (2006) afirmam que o *quorum-sensing* depende de condições nutricionais como fontes de carbono para controlar a formação do biofilme.

A formação de biofilme por *P. aeruginosa* é um fator de virulência de grande importância, que necessita de diversos estudos para melhor entender seu funcionamento. As vantagens de sobrevivência que o biofilme proporciona aos microorganismos dificultam muito o tratamento de infecções, tornando-se uma das grandes preocupações em pacientes imunocomprometidos ou pacientes que necessitem utilizar cateter ou outro dispositivo médico. Muito ainda tem pra se pesquisar e entender sobre a formação e manutenção do biofilme, visando descobrir maneiras de controlar sua formação ou mecanismos efetivos para a sua remoção, evitando assim, a infecção crônica e bacteremias.

OBJETIVOS

GERAL

Estudar a capacidade de formação de biofilme por amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de pacientes com infecção urinária.

ESPECÍFICOS

- Investigar a presença do gene *algC*, responsável pela síntese da matriz do biofilme, nas amostras testadas.
- Determinar a curva de crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*.
- Testar a capacidade de aderência das amostras em microplaca de poliestireno.
- Realizar Microscopia Eletrônica de Varredura para observar a formação de biofilme por *P. aeruginosa* na superfície de um cateter vesical.

MATERIAL E MÉTODOS

AMOSTRAGEM

Foram selecionadas 111 cepas de *P. aeruginosa* isoladas da urina de pacientes atendidos e/ou internados no Hospital Universitário e no Ambulatório do Hospital das Clínicas de Londrina, no período de março de 2003 a março de 2005. As cepas foram isoladas em TSA (Tryptic Soy Agar) (Difco, USA) e identificadas bioquimicamente pelo sistema automatizado MicroScan Walkaway (Dade-Behring). Provas complementares como o teste da oxidase, teste de motilidade e crescimento a 42°C foram realizadas.

PESQUISA DO GENE *ALGC* ATRAVÉS DA PCR

A técnica da PCR foi realizada com os oligonucleotídeos iniciadores (*algC1*- CAATACCGGTACCATCATCT e *algC2*- TGACGGTGATGTTGATTTC) específicos para o gene *algC*, que codifica a produção de alginato (ZIELINSKI *et al.*, 1991). Estes oligonucleotídeos foram desenhados, neste trabalho, a partir da seqüência de nucleotídeos do gene *algC* da *P. aeruginosa*, depositada no banco de dados GenBank sob o número NC 002516, amplificando um fragmento de 386 pares de bases. Culturas crescidas em agar Luria-Bertani (LB) (Oxoid, Inglaterra) foram ressuspendidas em 300µL de água Milli-Q (Millipore) e fervidas por 10 minutos para desnaturação do DNA bacteriano. A reação de amplificação do DNA bacteriano foi feita em um volume final de 25µL, contendo 10µL do DNA bacteriano, 200µM de dNTP, 1.5 mM de MgCl₂, 20 pmol de cada primer e 1.5 U de *Taq* DNA polimerase (todos Gibco-BRL). A PCR constou de 50 ciclos de 30 segundos a 94°C para desnaturação do DNA, seguido por 30 segundos a 60°C para anelamento dos primers e 30 segundos a 72°C para extensão do DNA. Foi realizada uma desnaturação inicial do DNA a 94°C por 5 minutos e uma extensão final do DNA a 72°C por 7 minutos. O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Difco, USA), corado com brometo de etídio (Gibco-BRL) e visualizado sob luz ultra-violeta.

CURVA DE CRESCIMENTO DE *P. AERUGINOSA*

Esse experimento foi realizado para comparar o crescimento da bactéria com sua capacidade em aderir em cateter vesical. Uma cepa de *P. aeruginosa* foi crescida em 5mL de TSB (Tryptic Soy Broth) (Difco, USA) a 37°C, sob agitação, overnight. Esta cultura foi padronizada com o tubo 0,5 da escala de MacFarland. Um mililitro desta cultura foi, então, colocado em 149mL de TSB em um frasco Erlenmayer. Logo após, 500µL desta cultura foi retirado neste momento e foi considerado o Tempo 0 (T₀). A cultura foi incubada a 37°C sob agitação por 30 horas. A alíquota foi diluída até 10⁻⁴ e as diluições foram plaqueadas em TSA (Tryptic Soy Agar) (Difco, USA) em duplicata. De hora em hora até o T₆ foi retirada uma alíquota de 500µL. No T₁ foram plaqueadas as diluições de 10⁻¹ a 10⁻⁴. Nos tempos T₂ e T₃ foram plaqueados as diluições de 10⁻² a 10⁻⁵. No tempo T₄, foram utilizadas as diluições 10⁻³ a 10⁻⁶. Nos tempos T₅, T₆, T₇ e T₈ foram plaqueadas as diluições de 10⁻⁴ a 10⁻⁸. A partir do T₉ até o T₃₀, as diluições utilizadas foram de 10⁻⁴ a 10⁻⁹. A partir do T₆, as alíquotas foram retiradas de 2 em 2 horas até o T₃₀. A cada retirada de alíquota, era retirada outra de 2mL para que fosse medida a absorbância em espectrofotômetro (UV – 1650 PC Shimadzu) a 600nm.

Passadas as 24h de incubação das placas de TSA, realizou-se a contagem de colônias para determinar as UFC/mL.

QUANTIFICAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME EM MICROPLACA DE POLIESTIRENO

Foi utilizada a técnica descrita por Stepanovic *et al.* (2000), com algumas modificações. As cepas de *P. aeruginosa* foram cultivadas em TSB (Tryptic Soy Broth) adicionado de 1% de glicose (TSBG) durante 24 horas a 37°C. Em seguida, 200µl da suspensão bacteriana foi inoculada em placas de poliestireno de 96 poços em triplicata. Como controle foi utilizado caldo TSB suplementado com glicose 1% (TSBG). As placas foram, então, incubadas a 37°C durante 24 horas. Transcorrido esse período, a suspensão bacteriana foi aspirada e cada poço lavado por 3 vezes com 250µl de solução fisiológica a 0,9%, estéril. Após, foi realizada a fixação com 200µl de metanol p.a por 15 minutos. O metanol foi removido, as placas secas em temperatura ambiente, e coradas com 200µl de solução de cristal violeta de Hucker 2% durante 5 minutos. A seguir, as placas foram lavadas em água

corrente e, secas em temperatura ambiente. Após foi realizada a leitura da absorbância em leitor de ELISA (MultiScan EX, Labsystem, Uniscience) a 550nm. Na leitura, foi utilizado um controle com caldo TSBG.

O valor da absorbância de cada amostra (DO_a) foi obtido da média aritmética dos valores dos 3 poços. Esse valor foi comparado com a absorbância do TSBG (DO). Para determinar o grau de aderência foi utilizada a seguinte classificação: não aderente: $DO_a \leq DO$; fracamente aderente: $DO < DO_a \leq 2.DO$; moderadamente aderente: $2.DO < DO_a \leq 4.DO$ e fortemente aderente: $4.DO < DO_a$.

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Foi utilizada uma cepa de *P. aeruginosa*, positiva para o gene *algC* e que aderiu fortemente a microplaca de poliestireno, para a realização da Microscopia Eletrônica de Varredura e verificar sua capacidade de formar biofilme na superfície do cateter vesical. A cepa foi crescida em 3mL de TSB por 4, 16 e 24 horas a 37°C, sob agitação. Um centímetro de cateter vesical de 2,7mm de diâmetro foi incubado junto em cada tubo. Após o crescimento, os cateteres foram lavados 3 vezes com PBS (Solução Salina Tamponada com fosfato 0,01M) e realizou-se a fixação do material com 1,5mL de glutaraldeído 2,5% e tampão cacodilato de sódio 0,1M por 5 horas. Passado este tempo, realizou-se 3 banhos de 10 minutos cada com 1,5mL de tampão cacodilato de sódio 0,1M. Logo após, os cateteres receberam tratamento com 1,5mL de Tetróxido de Ósmio (OsO_4) por 1 hora, no escuro. Retirou-se, então, o tetróxido de ósmio e repetiram-se os 3 banhos de 10 minutos cada com tampão cacodilato de sódio 0,1M. Após as lavagens, adicionou-se 1mL de etanol 70% sobre os cateteres e estes permaneceram em temperatura ambiente overnight para iniciar a desidratação do material. Transcorrido este tempo, o etanol foi retirado e realizou-se um banho com etanol 70% por 10 minutos, 2 banhos em etanol 80% por 15 minutos, 3 banhos com etanol 90% por 10 minutos e, finalmente, 4 banhos com etanol 100% por 10 minutos cada. Após a desidratação completa com etanol 100%, as amostras foram colocadas no ponto crítico (Bal-Tec CPD 030 Critical Point Dryer), para retirada completa do etanol das amostras e substituição por CO_2 . As cepas foram coladas em stubs com fita de carbono e levadas para a metalização (Bal-Tec SCD 050 Sputter Coater). Deu-se, então, um banho de carbono e um banho de ouro por 190 segundos. As amostras foram observadas em Microscópio Eletrônico de Varredura (Philips, FEI Quanta 200).

REFERÊNCIAS

- BORRIELLO, G.; WERNER, E.; ROE, F.; KIM, A. M.; EHRLICH, G. D.; STEWART, P. S. Oxygen Limitation Contributes to Antibiotic Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in Biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004; v. 48, n. 7, p. 2659-2664.
- CHEUNG, H. Y.; CHAN, G. K.; CHEUNG, S. H.; FONG, W. F. Morphological and chemical changes in the attached cells of *Pseudomonas aeruginosa* as primary biofilmes develop on aluminium and CaF(2) plates. *Journal of Applied Microbiology*. 2007; v. 102, n. 3, p. 701-710.
- CLUTTERBUCK, A. L.; COCHRANE, C. A.; DOLMAN, J.; PERCIVAL, S. L. Evaluating antibiotics for use in medicine using a poloxamer biofilm model. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2007; v. 15, n. 6, p. 2.
- COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science*. 1999; v. 284, p. 1318-1322.
- DAVEY, M. E.; CAIAZZA, N. C.; O'TOOLE, G. Rhamnolipid Surfactant Production Affect Biofilm Architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology*. 2003; v. 185, n. 3, p. 1027-1036.
- DAVIES, D. G.; GEESEY, G. G. Regulation of the Alginate Biosynthesis Gene *algC* in *Pseudomonas aeruginosa* during Biofilm Development in Continuous Culture. *Applied and Environmental Microbiology*. 1995; v. 61, n. 3, p. 860-867.
- DRISCOLL, J. A.; BRODY, S. L.; KOLLEF, M. H. The Epidemiology, Pathogenesis and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Drugs*. 2007; v. 67, n. 3, p. 351-368.
- DUNNE, W. M. Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately? *Clinical Microbiology Reviews*. 2002; v. 15, n. 2, p. 155-166.
- FINELLI, A.; GALLANT, V. C.; JARVI, K.; BURROWS, L. L. Use of In-Biofilm Expression Technology to Identify Genes Involved in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Development. *Journal of Bacteriology*. 2003; v. 185, n. 9, p. 2700-2710.
- HAHN, H. P. The type-4 is the major virulence-associated adhesin of *Pseudomonas aeruginosa* – a review. *Gene*. 1997; v. 192, p. 99-108.

HENTZER, M.; TEITZEL, G. M.; BALZER, G. J.; HEYDORN, A.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M.; PARSEK, M. R. Alginate Overproduction Affects *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Structure and Function. *Journal of Bacteriology*. 2001; v. 183, n. 18, p. 5395-5401.

HUNT, S. M.; WERNER, E. M.; HUANG, B.; HAMILTON, M. A.; STEWART, P. S. Hypothesis for the Role of Nutrient Starvation in Biofilm Detachment. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004; v. 70, n. 12, p. 7418-7425.

KIPNIS, E.; SAWA, T.; WIENER-KRONISH, J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 2006; v. 36, n. 2, p. 78-91.

KLAUSEN, M.; MORTEN, G.; KREFT, I.; TOLKEN-NIELSEN, T. Dynamics of development and dispersal in sessile microbial communities: examples from *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* model biofilms. *FEMS Microbiology Letters*. 2006; v. 261, p. 1-11.

KOLTER, R.; LOSICK, R. One for all and all for one. *Science*. 1998; v. 280, p. 226-227.

KONEMAN, E. W.; ALLERN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR, W.C. Bacilos Gram-negativos não fermentadores. *In: Diagnóstico microbiológico*. 5th ed Rio de Janeiro. 2001; p. 263-329.

LIZEWSKI, S. E.; LUNDBERG, D. S.; SCHURR, M. J. The Transcriptional Regulator AlgR is Essential for *Pseudomonas aeruginosa* Pathogenesis. *Infection and Immunity*. 2002; v. 70, n. 11, p. 6083-6093.

MacLEHOSE, H. G.; GILERT, P.; ALLISON, D. G. Biofilms, homoserina lactones and biocide susceptibility. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2004; v. 53, p. 180-184.

McGRATH, S.; WADE, D.; PESCI, E. C. Dueling quorum-sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa* control the production of the *Pseudomonas* quinolone signal (PQS). *FEMS Microbiology Letters*. 2004; v. 230, p. 27-34.

MIMS, C.; DOCKRELL, H.M.; GOERING, R. V.; ROITT, I.; WAKELIN, D.; ZUCKERMAN, M. *Microbiologia Médica*. Rio de Janeiro: Elsevier, 3^a ed, 2005.

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm Formation as Microbial Development. *Annu. Rev. Microbiol.* 2000; v. 54, p. 49-79.

- PAMP, S. J.; TOLKER-NIELSEN, T. Multiple Role of Biosurfactants in Structural Biofilms Development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*. 2007; v. 189, n. 6, p. 2531-2539.
- SCHAIK, E. J. van; GILTNER, C. L.; AUDETTE, G. F.; KEIZER, D. W.; BAUTISTA, D. L.; SLUPSKY, C. M.; SYKES, B. D.; IRVIN, R. T. DNA Binding: a Novel Function of *Pseudomonas aeruginosa* Type IV Pili. *Journal of Bacteriology*. 2005; v. 187, n. 4, p. 1455-1464.
- SAUER, K.; CAMPER, A. K.; EHRLICH, G. D.; COSTERTON, J. W.; DAVIES, D. *Pseudomonas aeruginosa* Displays Multiple Phenotypes during Development as a Biofilm. *Journal of Bacteriology*. 2002; v. 184, n. 4, p. 1140-1154.
- SHROUT, J. D.; CHOPP, D. L.; JUST, C. L.; HENTZER, M.; GIVSKOV, M.; PARSEK, M. R. The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional. *Molecular Microbiology*. 2006; v. 62, n. 5, p. 1264-1277.
- SMITH, R. S.; IGLEWSKI, B. H. *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Current Opinion in Microbiology*. 2003; v. 6, p. 56-60.
- SÓBERON-CHÁVEZ, G.; LÉPINE, F.; DÉZIL, E. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2005; v. 68, p. 718-725.
- STEPANOVIĆ S, VUKOVIĆ D, DAKIĆ I, SAVIĆ B, SVABIĆ-VLAHOVIĆ M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods*. 2000; p. 40, p. 175-179.
- STOODLEY, P.; WILSON, S.; HALL-STOODLEY, L.; BOYLE, J. D.; LAPPING-SCOTT, H. M.; COSTERTON, J. W. Growth and Detachment of Cell Clusters from Mature Mixed-Species Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001; v. 67, n. 12, p. 5608–5613.
- TRAUTNER, B. W.; DAROUICHE, R. O. Role of biofilm in catheter-associated urinary tract infection. *American Journal of Infection Control*. 2004; v. 32, n. 3, p. 177-183.
- WAGNER, V. E.; LI, L. L.; ISABELLA, V. M.; IGLEWSKI, B. H. Analysis of the hierarchy of quorum sensing regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Anal Bioanal Chem*. 2007; v. 387, n. 2, p. 469-479.

WERNER, E.; ROE, F.; BUGNICOURT, A.; FRANKLIN, M. J.; HEYDORN, A.; MOLIN, S.; PITTS, B.; STEWART, P. S. Stratified Growth in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004; v. 70, n. 10, p. 6188-6196.

ZHANG, Y.; MILLER, R. M. Enhanced Octadecane Dispersion and Biodegradation by a *Pseudomonas* Rhamnolipid Surfactant (Biosurfactant). *Applied and Environmental Microbiology*. 1992; v. 58, n. 10, p. 3276-3282.

ZHANG, Y.; MILLER, R. M. Effect of a *Pseudomonas* Rhamnolipid Biosurfactant on Cell Hydrophobicity and Biodegradation of Octadecane. *Applied and Environmental Microbiology*. 1994; v. 60, n. 6, p. 2101-2106.

ZIELINSKI, N.; CHAKRABARY, A. M.; BERRY, A. Characterization and Regulation of the *Pseudomonas aeruginosa algC* Gene Encoding Phosphomannomutase. *Journal of Biological Chemistry*. 1991; v. 266, n. 15, p. 9754-9763.

**BIOFILM PRODUCTION BY *Pseudomonas aeruginosa* STRAINS ISOLATED FROM
URINARY INFECTION**

Raquel Girardello¹, Floristher E. Carrara², Claudia Ross¹, Emerson J. Venâncio³, Jacinta S.
Pelayo¹

¹Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brazil.

²Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brazil.

³Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brazil.

Abbreviated Title: Biofilm production by *P. aeruginosa*

* Corresponding author. Address: Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia, Campus Universitário, CEP: 86051-970, Londrina, Paraná, Brazil. Caixa postal: 6001. Tel.: (43) 3371-4494, Fax: (43) 3371-4207.

E-mail address: jspelayo@sercomtel.com.br

ABSTRACT

The production of biofilm is one of the main problems in the treatment of various infections, among them, urinary infection. *Pseudomonas aeruginosa* is a microorganism that has the capacity to form biofilm and is responsible for chronic urinary infections, associated or not with catheters. The treatment of urinary infection becomes more difficult when the bacteria are associated with biofilm. Planktonic bacteria are more susceptible to antibiotics than sessile cells that make up biofilm. The aim of this work was to study the capacity of *P. aeruginosa*, isolated from urine, to form biofilm. In the genotypic study, all the strains examined were found to possess the *algC* gene associated with biofilm formation. In the phenotypic assays, this microorganism demonstrated a high capacity to adhere to polystyrene and to form biofilm on the surface of a bladder catheter, visualized by scanning electron microscopy.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, urinary infection, biofilm, catheter.

INTRODUCTION

Pseudomonas aeruginosa is a non-fermenting Gram-negative bacillus, which has an oxidative metabolism. It is considered a strict aerobic microorganism, while according to Werner et al. (21), in some anaerobic environments, this bacteria is able to grow in the presence of nitrate, which it uses as the final electron acceptor. These bacteria are found in soil, water, foods, animals and humans (16). They are also found in the hospital environment, where they are considered opportunistic pathogens which frequently cause chronic urinary infection in patients, catheterized or not, because of their capacity to form biofilm (9, 20).

Biofilm is a community of bacteria adhered to a biological or non-biological surface, which live in a polymeric matrix which they synthesize. This association provides survival advantages such as resistance to antibiotics and to antiseptics and protection against the immune system of the host (1, 8). The majority of antibiotics cannot pass through extracellular matrix produced by the microorganisms that are part of the biofilm and consequently are not capable of reaching the target structures. Planktonic bacteria are more susceptible to the host's immune system, antibiotics and other agents, compared to sessile bacteria of biofilm (1).

To initiate the formation biofilm, planktonic cells migrate through electrolytic and hydrophobic interactions, van der Waals forces, temperature and hydrodynamic forces, until they reach a surface to which they adhere (5). *P. aeruginosa* possesses a single flagellum which it uses for locomotion until reaching a surface on which adherence occurs. The type IV fimbriae and even the flagellum cause adherence of the bacteria to the surface (6). The first bacteria begin to multiply, and at the same time, new planktonic cells continue to adhere forming the complete community (20).

The next step is the maturation of the biofilm, where the formation of the matrix occurs, composed of polysaccharides produced by these bacteria, which comprise part of the biofilm (20). The matrix has small pores, also called channels, through which nutrients and oxygen pass (2, 20).

The last stage in the formation of biofilm is the detachment of cells. After maturation, some clusters of cells are released and these bacteria can be disseminated and cause bacteremias (7, 18). Biofilm formation occurs due to increase in population density, a process controlled by the *quorum-sensing* system (11, 15).

In *P. aeruginosa*, the exopolysaccharide matrix is formed by alginate, composed of a polymer of manuronic acid and glucuronic acid, which forms a viscous layer around the bacterial cell, protecting it (4, 22). The gene cluster *algACD* is responsible for the synthesis of alginate and its expression depends on environmental conditions such as osmolarity, high oxygen tension and nitrogen limitation (4, 5, 14). The *algC* gene codes for the enzyme phosphomannomutase, which converts mannose 6-phosphate into mannose 1-phosphate, this being essential for the production of alginate.

The aim of this paper was to study the biofilm production of *P. aeruginosa* strains isolated of urinary infection.

MATERIAL and METHODS

Sampling

The sample comprised 111 strains of *P. aeruginosa* isolated from the urine of patients seen at and/or admitted to the Hospital Universitário and Ambulatório do Hospital das Clínicas of Londrina, during the period of March, 2003 to March, 2005. The strains were isolated in TSA (Tryptic Soy Agar) (Difco, Detroit, Michigan, USA) and identified

biochemically by the automated system MicroScan Walkaway (Dade-Behring). Complementary tests including the oxidase test and motility test were performed.

PCR amplification

PCR was carried out with the primers (*algC1*- CAATACCGGTACCATCATCT and *algC2*- TGACGGTGATGTTGATTTC), specific for the *algC* gene which codes for the production of alginate (22). These primers were designed in this work based on the nucleotide sequence of the *algC* gene of *P. aeruginosa* deposited in the databank GenBank under number NC 002516, and amplified a fragment of 386 base pairs (bp). Amplification reactions were performed as follows: Luria-Bertani agar (LB) (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) cultures were suspended in 300 μ L Milli-Q water (Millipore) and boiled for 10 minutes to release and denature the bacterial DNA. Amplification of bacterial DNA was carried out in a volume of 25 μ L, containing 10 μ L bacterial lysate, 200 μ M dNTP, 1.5mM MgCl₂, 20pmol of each primer and 1.5U *Taq* DNA polymerase (all from Gibco-BRL). PCR involved 50 cycles of 30 seconds at 94°C for denaturation of DNA, followed by 30 seconds at 60°C for annealing of the primers and 30 seconds at 72°C for extension of DNA. An initial DNA denaturation step at 94°C for 5 minutes and final extension of DNA at 72°C for 7 minutes were performed. The PCR product was submitted to 1.5% agarose gel electrophoresis (Difco, Detroit, Michigan, USA), stained with ethidium bromide (Gibco-BRL) and visualized using UV light.

Growth curve for *P. aeruginosa*

This experiment was performed to compare the development of *P. aeruginosa* with the biofilm production capacity.

The *P. aeruginosa* strain was grown in 5mL of TSB (Tryptic Soy Broth) (Difco, Detroit, Michigan, USA) at 37°C, with agitation, overnight. This culture was adjusted to tube 0.5 of the MacFarland scale. One milliliter of this culture was then placed in 149mL of TSB in an Erlenmeyer

flask. A 500 μ L aliquot of this culture was then removed and was considered time 0 (T_0). The culture was incubated at 37°C with agitation for 30 hours. The aliquot was diluted up 10^4 times and the dilutions were plated in TSA (Tryptic Soy Agar) (Difco, Detroit, Michigan, USA) in duplicate. At each hour up to T_6 an aliquot of 500 μ L was removed. At T_1 dilutions of 10^{-1} to 10^{-4} were plated. At times T_2 and T_3 dilutions of 10^{-2} to 10^{-5} were plated. At T_4 , dilutions of 10^{-3} to 10^{-6} were used. At times T_5 , T_6 , T_7 and T_8 , dilutions of 10^{-4} to 10^{-8} were used. From T_9 to T_{30} , the dilutions were 10^{-4} to 10^{-9} . After T_6 , aliquots were removed every 2 hours up to T_{30} . At each sampling, an additional aliquot of 2mL was removed to measure absorbance in a spectrophotometer (UV – 1650 PC Shimadzu) at 600nm. Colony count was performed after incubation time.

Phenotypic detection of biofilm formation by the polystyrene microplate assay (PM)

Adhesion to an inert surface was assayed employing the method described by Stepanovic et al. (17). Bacterial isolates were grown overnight at 37°C in Tryptic Soy Broth (TSB) (Difco, Detroit, Michigan, USA) supplemented with 1% glucose (Difco, Detroit, Michigan, USA) (TSBG). The cultures were diluted 1:200 in TSBG, and 200 μ L of this suspension were added to sterile 96-well polystyrene plates (NUNC, USA), and incubated for 24 hours at 37°C. TSBG alone was used as the negative control. After this period, the content of each well was aspirated, and the wells were washed three times with 250 μ L of sterile saline. The attached bacteria were fixed with 200 μ L of 99% methanol (Merck, Frankfurter, Darmstadt, Germany) per well, and after 15 minutes, the plates were emptied and allowed to dry. The plates were stained for 5 minutes with 200 μ L of 2% Hucker crystal violet per well. Excess stain was rinsed off by placing the plate under running tap water. The plates were air-dried, and the optical density (OD) of each well was measured at 550nm with a Micro-ELISA Autoreader (MultiScan EX, LabSystem, Uniscience, Finland). All the assays were performed in triplicate, and the mean OD (ODa) was used to determine the degree of adherence. This value was compared with the OD of TSBG after the same procedure. To determine the degree

of adherence, the following classification was used: non-adherent ($ODa \leq OD$), weakly adherent ($OD < ODa \leq 2 \times OD$), moderately adherent ($2 \times OD < ODa \leq 4 \times OD$) and strongly adherent ($4 \times OD < ODa$).

Scanning electron microscopy (SEM)

A strain of *P. aeruginosa* that was positive for *algC* gene and that adhered firmly to a polystyrene microplate was used for SEM to determine its capacity to form biofilm on the surface of a bladder catheter. The strain was grown in 3mL of TSB (Difco, Detroit, Michigan, USA) for 4, 16 and 24 hours at 37°C, with agitation. One centimeter of bladder catheter of 2.7mm diameter was added to each culture tube incubated. After growth, the catheters were washed 3 times with PBS (0.01M phosphate-buffered saline) and the material fixed with 1.5mL 2.5% glutaraldehyde and 0.1M sodium cacodylate for 5 hours. Afterward, the catheters were washed in 3 baths of 0.1M sodium cacodylate for 10 minutes each. Afterward, the catheters were treated with 1.5mL osmium tetroxide (OsO_4) for 1 hour in the dark. The catheters were then washed for 10 minutes each with 3 baths of 0.1M sodium cacodylate for 10 minutes each. The catheters were then placed in 1mL 70% ethanol and left standing overnight at room temperature to initiate dehydration of the material. Next, the ethanol was removed and the material dehydrated further in a bath of 70% ethanol for 10 minutes, 2 baths of 80% ethanol for 15 minutes, 3 baths of 90% ethanol for 10 minutes and finally 4 baths of 100% ethanol for 10 minutes each. After complete dehydration with 100% ethanol, the strains were critical point dried (Bal-Tec CPD 030 Critical Point Dryer), to remove ethanol completely from the strains and substitute with CO_2 . The strains were placed on carbon stubs and prepared for metallization (Bal-Tec SCD 050 Sputter Coater). The strains were then submitted to carbon and gold coating for 190 seconds and observed in scanning electron microscope (Philips, FEI Quanta 200).

RESULTS

Growth curve

According to the growth curve, *P. aeruginosa* has a short lag phase of 1 to 2 hours before entering a log or exponential growth phase. After 10 hours, this microorganism enters the stationary phase of growth. After 30 hours growth, *P. aeruginosa* is still in stationary growth (Figure 1).

PCR amplification

All of the 111 strains tested showed the presence of the *algC* gene, which participates of the synthesis of alginate, the principal compound of the matrix produced by bacteria associated with biofilm. It was possible to observe by agarose gel electrophoresis, a fragment of approximately 386bp, as expected (Figure 2).

Quantification of biofilm formation in polystyrene microplates

Of the 111 strains tested, only 10 (9%) were non-adherent on polystyrene by this assay. Of the 101 (91%) strains that adhered to polystyrene, 33 (29.7%) were found to be strongly adherent, 31 (27.9%) moderately adherent and 37 (33.3%) weakly adherent. Adherence is the first step in the formation of biofilm. *P. aeruginosa* showed a strong capacity to adhere to non-biological material, where is a major problem in the treatment of patients who require a catheter or other medical device on which this microorganism can form biofilm.

SEM

By means of SEM, it was possible to see that after 4 hours growth, the bacteria had already adhered to the surface of the catheter through their fimbriae and the production of

extracellular had already started. At this time, the bacteria were in the log growth phase. With 16 hours growth, already in stationary growth phase, the matrix was already forming a network that adhered firmly to bacteria at the surface of the catheter. At 24 hours growth, still in the stationary phase, the bacteria were completely covered by extracellular matrix, which appeared as a dense layer of polysaccharide (Figure 3).

DISCUSSION

All of the 111 strains tested showed the presence of the *algC* gene. This gene is very important to *P. aeruginosa* biofilm formation. It encoding the enzyme AlgC witch has phosphomannomutase activity, converting mannose-6-phosphate into mannose-1-phosphate, this being essential for the production of alginate, the primary component of the matrix of organic polymers that comprise the biofilm in *P. aeruginosa* (4). Davies & Geesey (4) observed that, the *algC* gene activation isn't necessary to initial adherence of bacteria in the surface. However, this gene is necessary to matrix formation and biofilm maturation. Besides, the enzyme AlgC has phosphoglucomutase activity, witch converts glucose-6-phosphate into glucose-1-phosphate to lipopolysaccharide (LPS) production. LPS is a virulence factor responsible for toxic shock and acts as a non-fimbrial adhesin, on the initial steps of biofilm formation (4). Olvera et al. (13), reported that Glucose-1-phosphate, synthesized by phosphoglucomutase activity of AlgC, is the precursor of dTDP-glucose and ultimately of dTDP-L-rhamnose, confirming the hypothesis that *algC* gene product participates in rhamnolipid biosynthesis. Rhamnolipid is a surfactant that maintain open channels of biofilm matrix to circulate water, nutrients and oxygen (3).

According to the Growth Curve, we observed that *P.aeruginosa* have a lag phase relatively short, with only 1 hour, already entering in the exponential phase of approximately

9 hours. In this paper, was not possible to observe the decline phase, because at 30 hours of growth, *P. aeruginosa* still was in stationary phase. This long growth curve is due to the fact that *P. aeruginosa* can utilize secondary metabolism to survive, thereby being able to remain viable longer even after the initial source of nutrients has been depleted (19).

Ninety one per cent of tested strains in this paper adhered in polystyrene substrate. It's showed different intensities in the adhesion at polystyrene. The adherence in abiotic substrate is influenced of various environmental factors and factors produced from microorganism. Attractive and repulsive forces as electrostatic interactions, van der Waals forces, dipole interactions, hydrophobic interactions are important to the initial adherence of *P. aeruginosa* to abiotic surface (10). Factors of microorganisms as the presence or absence of type IV pilus or the rhamnolipid production can influence in the adherence of bacterial in the surface. This initial adherence is mediated by type IV pilus and flagella and is a reversible adherence. The adherence of microorganisms becomes very firm when the matrix of biofilm is produced (6, 20).

SEM showed that the biofilm was more organized at 16 and 24 hours growth, these times representing the stationary phase of the growth curve. This finding confirmed the observations of Davey et al. (3) who found that the stationary phase, due the higher population density, showed the greatest production of biofilm matrix. Inside a biofilm, there are bacteria in different phases of growth, but the capacity of *P. aeruginosa* to maintain viability for a longer time makes the destruction of the biofilm much more difficult, and it thereby continues to cause infection for a much longer period of time. The urinary tract infections represent about 40% of nosocomial infections. Correct asepsis in the moment of catheter insertion and reduction of permanence time of the catheter are important factors to prevent the catheter-associated tract urinary infection by *P. aeruginosa* (12).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank CAPES for financial support, Dr. A. Leyva for his help in the translation and editing of the manuscript and Dr.^a Célia Guadalupe Tardele de Jesus Andrade, for her help in the Scanning electron microscopy.

LITERATURE CITED

1. Clutterbuck AL, Cochrane CA, Dolman J, Percival SL (2007) Evaluating antibiotics for use in medicine using a poloxamer biofilm model. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 15(6):2
2. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP (1999) Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science* 284:1318-1322
3. Davey ME, Caiazza NC, O'Toole G (2003) Rhamnolipid Surfactant Production Affect Biofilm Architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology* 185(3):1027-1036
4. Davies DG, Geesey GG (1995) Regulation of the Alginate Biosynthesis Gene *algC* in *Pseudomonas aeruginosa* during Biofilm Development in Continuous Culture. *Applied and Environmental Microbiology* 61(3):860-867
5. Dunne WM (2002) Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately? *Clinical Microbiology Reviews* 15(2):155-166
6. Hentzer M, Teitzel GM, Balzer GJ, Heydorn A, Molin S, Givskov M, Parsek MR (2001) Alginate Overproduction Affects *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Structure and Function. *Journal of Bacteriology* 183(18):5395-5401

7. Hunt SM, Werner EM, Huang B, Hamilton MA, Stewart PS (2004) Hypothesis for the Role of Nutrient Starvation in Biofilm Detachment. *Applied and Environmental Microbiology* 70(12):7418-7425
8. Klausen M, Morten G, Kreft I, Tolken-Nielsen T (2006) Dynamics of development and dispersal in sessile microbial communities: examples from *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* model biofilms. *FEMS Microbiology Letters* 261:1-11
9. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC (2001) Bacilos Gram-negativos não fermentadores. *In: Diagnóstico microbiológico*. Rio de Janeiro. 5^a ed.
10. McEldowney S, Fletcher M (1986) Variability of the influence of Physicochemical Factors Affecting Bacterial Adhesion to Polystyrene Substrata. *Applied and Environmental Microbiology* 52(3):460-465
11. McGrath S, Wade D, Pesci EC (2004) Dueling quorum-sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa* control the production of the *Pseudomonas* quinolone signal (PQS). *FEMS Microbiology Letters*. 230:27-34
12. Mims C, Dockrell HM, Goering RV, Roitt I, Wakelin D, Zuckerman M (2005) *Microbiologia Médica*. Rio de Janeiro: Elsevier. 3^a ed.
13. Olvera C, Goldberg JB, Sánchez R, Soberón-Chávez G (1999) The *Pseudomonas aeruginosa* *algC* gene product participates in rhamnolipid biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters* 179:85-90
14. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R (2000) Biofilm Formation as Microbial Development. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:49-79
15. Smith RS, Iglewski BH (2003) *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Current Opinion in Microbiology* 6:56-60

16. Sóberon-Chávez G, Lépine F, Dézil E (2005) Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology Biotechnology* 68:718-725
17. Stepanović S, Vuković D, Dakić I, Savić B, Svabić-Vlahović M (2000) A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal Microbiology Methods* 40:175-179
18. Stoodley P, Wilson S, Hall-Stoodley L, Boyle JD, Lapping-Scott HM, Costerton JW (2001) Growth and Detachment of Cell Clusters from Mature Mixed-Species Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 67(12):5608–5613
19. Trabulsi LR, Alterthum F, Gompertz OF, Candeias JAN (2004) *Microbiologia*. São Paulo: Atheneu. 4° ed
20. Trautner BW, Darouiche RO (2004) Role of biofilm in catheter-associated urinary tract infection. *American Journal of Infection Control* 32(3):177-183
21. Werner E, Roe F, Bugnicourt A, Franklin MJ, Heydorn A, Molin S, Pitts B, Stewart PS (2004) Stratified Growth in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 70(10):6188-6196
22. Zielinski N, Chakrabary AM, Berry A (1991) Characterization and Regulation of the *Pseudomonas aeruginosa algC* Gene Encoding Phosphomannomutase. *The Journal of Biological Chemistry* 266(15):9754-9763

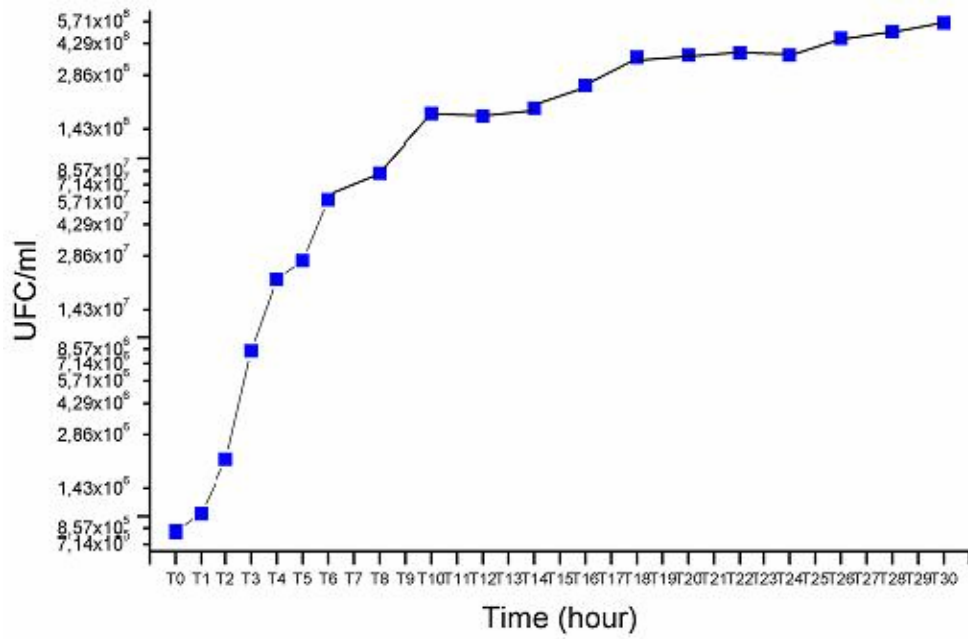


Figure 1 – Growth curve for a *P. aeruginosa* strain.

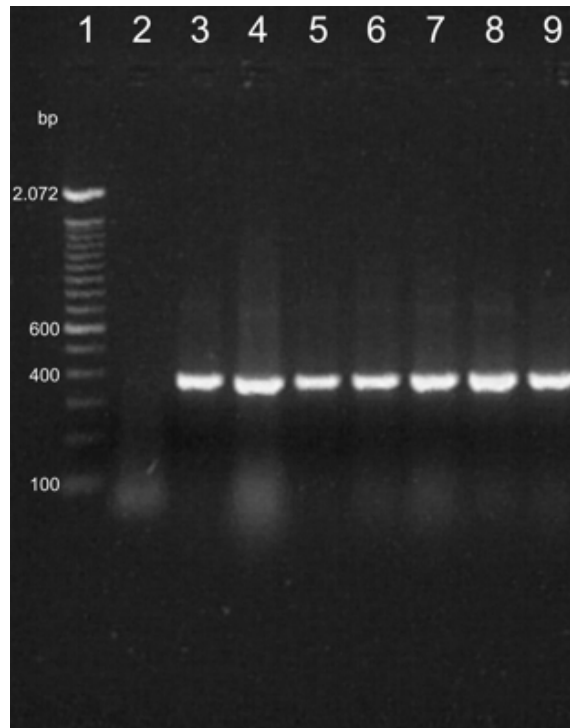


Figure 2 – PCR product of the *algC* gene of *P. aeruginosa*. **1**: 100-bp DNA ladder; **2**: negative control; **3, 4, 5, 6, 7, 8 and 9**: positive strains of *P. aeruginosa* showing the *algC* gene.

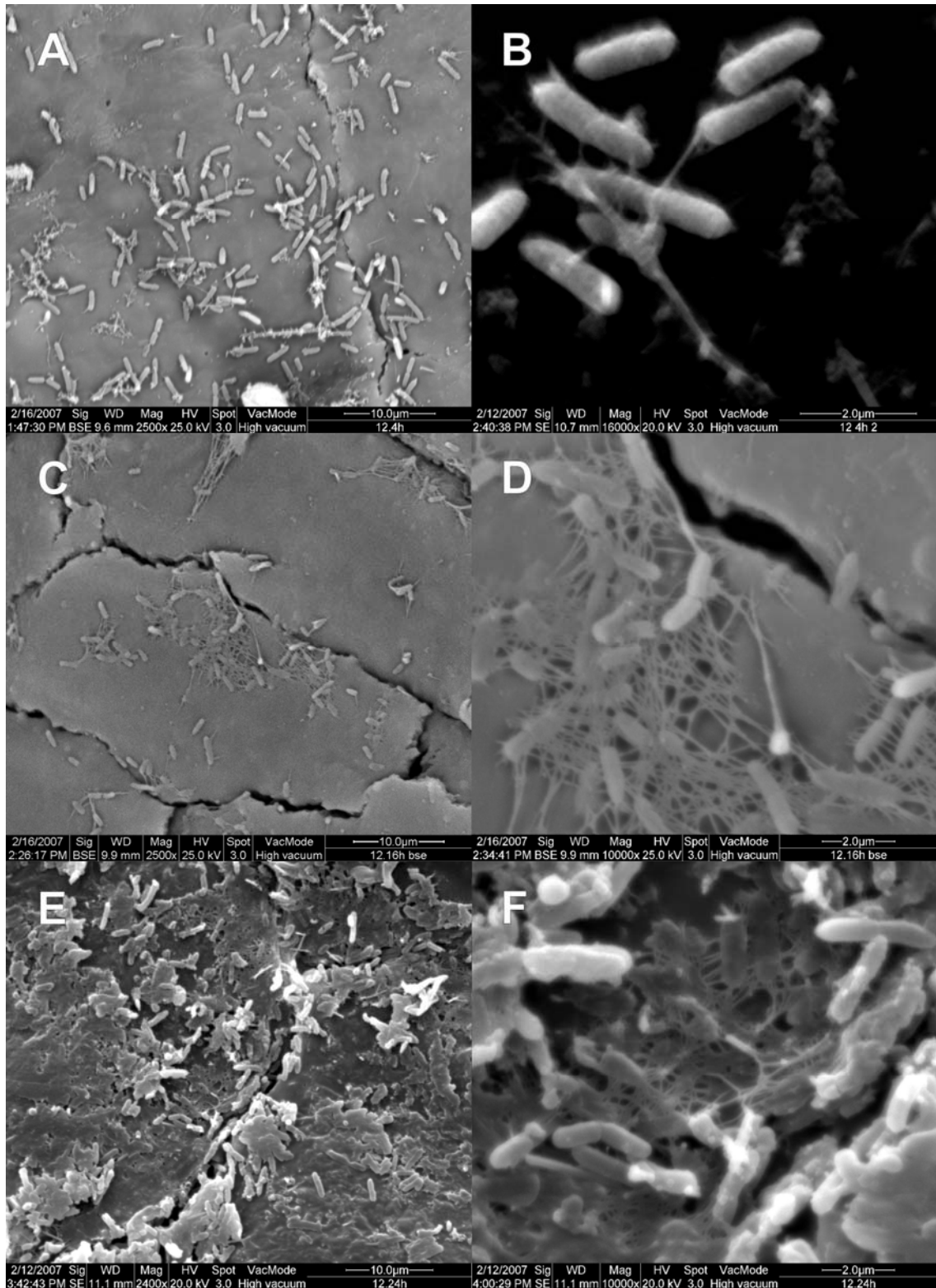


Figure 3 – Scanning electron microscopy of *P. aeruginosa* on the surface of a bladder catheter. **A** and **B**: after 4 h growth, at 2500x and 10000x magnification, respectively. **C** and **D**: after 16 h growth, at 2500x and 10000x magnification, respectively. **E** and **F**: after 24 h growth, at 2500x and 10000x magnification, respectively.