

**KARLA VELOSO GONÇALVES RIBEIRO**

**ECOFAGO 017 ATUA NA PREVENÇÃO E DEGRADAÇÃO DE BIOFILME DE  
*Escherichia coli***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2012**

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

R484e  
2012

Ribeiro, Karla Veloso Gonçalves, 1982-  
Ecofago 017 atua na prevenção e degradação de biofilme de  
*Escherichia coli* / Karla Veloso Gonçalves Ribeiro. – Viçosa,  
MG, 2012.  
ix, 54f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Leandro Licursi de Oliveira.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f. 42-54

1. Bactérias. 2. *Escherichia coli*. 3. Bacteriófagos.  
4. Microscopia. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 579.3

KARLA VELOSO GONÇALVES RIBEIRO

ECOFAGO 017 ATUA NA PREVENÇÃO E DEGRADAÇÃO DE BIOFILME DE  
*Escherichia coli*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 06 de agosto de 2012.



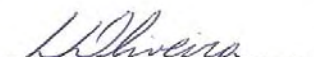
---

Sérgio Oliveira de Paula



---

Wendel Batista da Silveira



---

Leandro Licursi de Oliveira  
(Orientador)

Dedico este trabalho aos meus pais LILICO E DORINHA, ao meu marido CLEBERSON e a minha filha ANA JÚLIA.

## AGRADECIMENTOS

Finalmente, após muita dedicação e força de vontade, apresento-lhes o trabalho de mestrado concluído com a prazerosa sensação de alívio e convicção de mais um dever cumprido.

No decorrer destes dois anos, senti Deus sempre presente, iluminando meu caminho e guiando meus passos. Obrigada por me manter perseverante e forte.

O mestrado foi realizado nos intervalos das minhas atividades no Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM). Dediquei-me as duas tarefas, e em alguns momentos de muito cansaço, excesso de exigência própria e cobranças alheias, pensei em desistir. Entretanto, nos momentos difíceis, a família e os verdadeiros amigos estavam ao meu lado e, de forma incansável, impediram que eu fracassasse.

Primeiramente, *agradeço* à Professora e amiga Maria Catarina M. Kasuya o incentivo desde o início, reiterando a importância da minha capacitação para o NMM. Obrigada pelos conselhos, ensinamentos, apoio e amizade.

*Agradeço* ao Gilmar Valente, o ser humano mais incrível que conheci na Universidade Federal de Viçosa (UFV) e que tenho grande prazer em conviver todos os dias. Obrigada por ter aguentado firme no NMM para que eu pudesse ir mais tranquila para as aulas e para o Laboratório de Imunovirologia Molecular (LIVM) realizar meus experimentos. Obrigada pelos ensinamentos e pelo carinho! Obrigada por perceber e entender minhas angústias, por ouvir meus desabafos e por me acolher em seu coração! Jamais esquecerei o que fez por mim!

*Agradeço* ao meu orientador e amigo, Professor Leandro Licursi, o exemplo de profissionalismo, competência e, principalmente, por compreender minha necessidade de dividir a dedicação entre o trabalho e o mestrado.

*Agradeço* à banca examinadora a disponibilidade e considerações.

*Agradeço* aos Professores membros do colegiado do NMM o apoio.

*Agradeço* aos amigos do LIVM, em especial a Lorena, Monise, Robertinh, Sílvia e Elis e ao Artur do NMM o incentivo e as estudantes Graci e Cynthia o apoio na realização dos experimentos.

*Agradeço* ao meu marido Cleber, amigo e companheiro de todas as horas, o apoio, a dedicação e as sugestões. Obrigada por me ajudar a superar os obstáculos e vencer cada novo desafio.

*Agradeço* a minha filha Ana Júlia por ser minha inspiração em todos os momentos e por me mostrar os verdadeiros valores da vida! Obrigada pela companhia, em silêncio ou dizendo a mágica palavra “mamãe”, e pelas suas demonstrações de carinho. Você me fez ver que a luta não seria em vão. Obrigada por ser esta criança meiga e independente, permitindo-me tranquilidade para realizar este trabalho. *Mamãe te ama muito!*

*Agradeço* aos meus pais Lilico e Dorinha o exemplo de vida. Obrigada por acreditarem em mim e por terem abdicado de seus desejos para que eu e minhas irmãs pudéssemos sonhar com dias melhores. A missão foi cumprida com muita sabedoria, portanto é hora de curtirem a vida e ser cada dia mais felizes!

*Agradeço* as minhas irmãs Kamila e Karine o incentivo e o pensamento positivo. Vocês são as melhores irmãs e amigas que eu poderia desejar!

*Agradeço* ao meu sobrinho Gabriel que chegará em breve para aumentar a felicidade da nossa família!

*Agradeço* aos meus cunhados Talles, Fred e Juninho e a minha cunhada Keila a torcida. Em especial aos padrinhos da Ana Júlia, Keila, Karine e Talles, por terem recebido esta missão com tanto amor e carinho.

*Agradeço* aos meus sogros Marilda e Cleber a torcida e as orações.

*Agradeço* aos que cuidaram com muito zelo da Ana Júlia para que eu pudesse me desdobrar entre trabalho e mestrado.

*Agradeço* a todos familiares e amigos a compreensão da minha ausência e a torcida, em especial tia Cláudia, Cláudio, Matheus, tio Arlindo, Renata, tio Paulo e as minhas eternas amigas Janaina, Robertta e Jaqueline.

*Agradeço* também a UFV, em especial ao NMM do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde e ao LIVM do Departamento de Biologia Geral - Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, a oportunidade de desenvolver este trabalho. Agradeço ainda as agências financiadoras CNPq, Capes e Fapemig.

## **BIOGRAFIA**

KARLA VELOSO GONÇALVES RIBEIRO, filha de Sérvulo Carlos de Oliveira Gonçalves e Nair das Dores Veloso Gonçalves, nasceu no dia 5 de maio de 1982, em Viçosa, Minas Gérias.

Na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, em 2006, graduou-se em Farmácia e Bioquímica (Análises Clínicas), obtendo ainda habilitação em Homeopatia.

Em 2008 foi aprovada no concurso público para o cargo de Farmacêutico-Bioquímico da Universidade Federal de Viçosa (UFV), atuando como Técnica de Nível Superior no Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM).

Em agosto de 2010, iniciou o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural na UFV.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	vii
RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	ix
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Biofilmes.....	1
1.2. <i>Escherichia coli</i> .....	8
1.3. Bacteriófagos.....	10
2. OBJETIVOS .....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	15
3.1. Bactéria .....	15
3.2. Bacteriófago .....	16
3.3. Análises quantitativas colorimétricas .....	17
3.4. Análises microscópicas.....	19
3.5. Análise estatística.....	22
4. RESULTADOS .....	23
4.1. Propagação e titulação do bacteriófago .....	23
4.2. Análises quantitativas colorimétricas .....	24
4.3. Análises microscópicas.....	27
5. DISCUSSÃO .....	34
6. CONCLUSÕES.....	41
7. REFERÊNCIAS.....	42



## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- Abs - Absorbância
- Als - Autoindutores
- CV - Cristal violeta
- FDA - Food and Drug Administration
- FITC - Isotiocianato de fluoresceína
- IP - Iodeto de propídeo
- LB - Lúria-Bertani
- LIVM - Laboratório de Imunovirologia Molecular
- LPS - Lipopolissacarídeo
- MEC - Matriz extracelular
- MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura
- MOI - Multiplicidade de infecção
- NMM - Núcleo de Microscopia e Microanálise
- PIA - Polysaccharide intercelular adhesin
- QS - Quorum-sensing
- SEM - Desvio padrão da média
- SPE - Substância polimérica extracelular
- UFC - Unidades formadoras de colônia
- UFP - Unidades formadoras de placa

## RESUMO

RIBEIRO, Karla Veloso Gonçalves, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2012. **Ecofago 017 atua na prevenção e degradação de biofilme de *Escherichia coli***. Orientador: Leandro Licursi de Oliveira.

As bactérias são comumente encontradas aderidas a superfícies formando comunidades microbianas densas chamadas biofilmes. A formação do biofilme tem sido documentada como estratégia de sobrevivência dos micro-organismos conferindo resistência a antimicrobianos, desinfetantes, biocidas e ao sistema imune do hospedeiro. O objetivo deste trabalho foi investigar a capacidade do bacteriófago lítico Ecofago 017 em prevenir a formação de biofilme por *Escherichia coli* e degradar biofilmes já estabelecidos. As condições de crescimento e desenvolvimento de biofilmes foram avaliadas e padronizadas. Diferentes concentrações de fagos foram testadas a fim de definir as melhores para prevenção da formação de biofilme e para degradação de biofilmes estabelecidos. Análises por Microscopia Eletrônica de Varredura e Microscopia Confocal foram realizadas para dar suporte a tais resultados. Observamos que cepas de *E. coli* 30 formaram biofilme na interface líquido-ar nas condições testadas, com maior produção após 48 h. Os experimentos de prevenção e degradação revelaram que praticamente todas as concentrações do bacteriófago Ecofago 017 reduziram tanto o crescimento bacteriano, quanto a quantidade de biofilme formado. A dose mínima capaz de reduzir significativamente o biofilme foi  $10^2$  UFP/mL (Multiplicidade de infecção, MOI, de  $10^{-5}$ ), bem inferior a descrita na literatura. Os experimentos de degradação exibiram redução de até 85% na massa do biofilme após exposição ao fago, sugerindo que este é capaz de reduzir significativamente biofilmes já estabelecidos de *E. coli* 30 e indicando sua habilidade em acessar o biofilme e infectar bactérias em seu interior, causando morte celular. Portanto, os resultados indicam que o Ecofago 017 pode ser usado tanto para reduzir a fixação bacteriana quanto para lisar células associadas a biofilmes de *E. coli*, gerando potenciais aplicabilidades biotecnológicas para este fago.

## ABSTRACT

RIBEIRO, Karla Veloso Gonçalves, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2012. **Ecophage 017 acts in the *Escherichia coli* biofilm prevention and degradation.** Adviser: Leandro Licursi de Oliveira.

The bacteria are usually found attached to surfaces forming dense microbial communities called biofilms. The formation of biofilms has been documented as a survival strategy of microorganisms conferring resistance to antibiotics, disinfectants, biocides and the host immune system. The aim of this study at investigating the ability of the lytic bacteriophage Ecophage 017 to prevent the biofilm formation by *Escherichia coli* and degrade established biofilms. The conditions for growth and development of biofilms were evaluated and standardized. Different concentrations of phage were tested to define the optimal to prevention of biofilm formation and degradation. Analysis by Scanning Electron Microscopy and Confocal Microscopy was performed to support these results. We observed that strains of *E. coli* 30 biofilm have formed in air-liquid interface in the conditions tested, with higher production after 48 h. The experiments showed that virtually all concentrations of bacteriophage Ecophage 017 reduced both bacterial growths, as the amount of biofilm formed. The minimum dose able to significantly reduce the biofilm was  $10^2$  PFU / mL (Multiplicity of infection, MOI,  $10^{-5}$ ), lower than described in literature. Experiments of degradation showed up to 85% reduction in biofilm mass after exposure to the phage, suggesting this is able to significantly reduce established *E. coli* 30 biofilms, indicating its ability to access and infect bacteria on the inside, causing cell death. Therefore the results show that the Ecophage 017 could be used both to reduce the fixing as to lyse bacterial cells associated with biofilms, generating biotechnological potential applicabilities to this phage.

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Biofilmes**

As bactérias podem ser encontradas na forma sésil ou planctônica. Na forma sésil, as células encontram-se aderidas formando comunidades densas e multicelulares chamadas biofilmes, enquanto na forma planctônica encontram-se livres e individualizadas (DONLAN e COSTERTON, 2002; OH et al., 2007). A formação de biofilmes é uma característica universal das bactérias (LÓPEZ et al., 2011) e representa o tipo de crescimento bacteriano predominante na natureza (O'TOOLE et al., 2000). Estima-se que 80% da biomassa microbiana do planeta encontram-se no estado de biofilmes (RICHARDS e MELANDER, 2009).

Em 1674, Antony van Leeuwenhoek, com auxílio de um microscópio simples, observou micro-organismos na superfície de dentes, atribuindo-se a ele a descoberta dos biofilmes (DONLAN, 2002).

Segundo Suh et al. (2010) e Abee et al. (2011), os biofilmes são comunidades microbianas complexas estabelecidas sobre diferentes superfícies e geralmente encapsuladas por uma matriz extracelular protetora composta de vários tipos de biopolímeros. Outros autores definem biofilmes como comunidades mono ou polimicrobianas complexas ou microcolônias aderidas a superfícies bióticas ou abióticas e embebidas numa matriz extracelular, sintetizada pelas próprias células, onde interagem umas com as outras e com o meio ambiente (SAWHNEY e BERRY, 2009; LÓPES et al., 2010). Em diversas definições encontradas na literatura, os micro-organismos, a matriz extracelular e a superfície são considerados componentes essenciais do biofilme.

Simões et al. (2010) e Kay et al. (2011) referem-se aos biofilmes como um modo de crescimento que protege os micro-organismos e os permitem sobreviver em ambientes hostis, e cujas células apresentam expressão gênica, metabolismo, fisiologia e comportamento diferentes das células planctônicas correspondentes.

Os biofilmes podem conter uma ou, mais comumente, várias espécies de micro-organismos, sendo chamados de simples ou mistos, respectivamente. Os biofilmes simples, em geral, originam-se do crescimento de um único clone formando populações clonais, entretanto, diferenças na expressão gênica

(STEWART e FRANKLIN, 2008) podem resultar em subpopulações fenotipicamente distintas (LÓPEZ et al., 2011). Em biofilmes mistos, os micro-organismos encontram-se organizados de forma a obter a melhor relação mutualística (WATNICK e KOLTER, 2000).

A matriz extracelular é constituída, principalmente, de substância polimérica extracelular (SPE) e, adicionalmente, pode conter cristais, partículas de corrosão, argila ou limo, componentes do sangue, entre outros (DONLAN, 2002). Alguns fatores determinam a quantidade e composição da matriz, entre eles o tipo de micro-organismo, as condições ambientais, como disponibilidade de nutrientes, temperatura, umidade (DANESE et al., 2000; LÓPEZ et al., 2011) e a idade do biofilme (LERICHE et al., 2000).

A SPE é produzida pelos micro-organismos do biofilme, sendo constituída de polissacarídeos, ácidos nucléicos, proteínas, lipídeos, fosfolipídios e substâncias húmicas (DAVEY e O'TOOLE, 2000; SUTHERLAND, 2001; DONLAN, 2002). Segundo Tsuneda et al. (2003), 75 a 89% da SPE são compostos por polissacarídeos e proteínas, elementos estruturais fundamentais da matriz que determinam sua estabilidade mecânica (WINGENDER et al., 1999). Além desses componentes, moléculas de água podem interagir com a SPE através de ligações de hidrogênio prevenindo a dessecação do biofilme.

Várias funções têm sido atribuídas a SPE incluindo aumento na habilidade de adquirir nutrientes (JURCISEK, et al., 2011), proteção contra condições adversas, como tratamento com antimicrobianos e bacteriófagos (DONLAN e COSTERTON, 2002; SIMÕES et al., 2010) e ataque do sistema imune do hospedeiro (ADBI-ALI et al., 2006), adesão à superfície e suporte para a arquitetura tridimensional do biofilme (LEWANDOWSKI, 2000; PAI et al., 2009).

Os biofilmes são formados em múltiplas etapas que, de forma geral, incluem motilidade para a superfície, adesão, formação de microcolônias, desenvolvimento de diferentes estruturas e dispersão (WOOD et al., 2011).

Inicialmente, as bactérias movem-se livremente, impulsionadas pelo fluxo ou com auxílio dos flagelos, e, quando encontram uma superfície adequada, associam-se de forma transitória com a mesma e/ou com um micro-organismo previamente fixado por meio de interações fracas como atrações de van der Waals

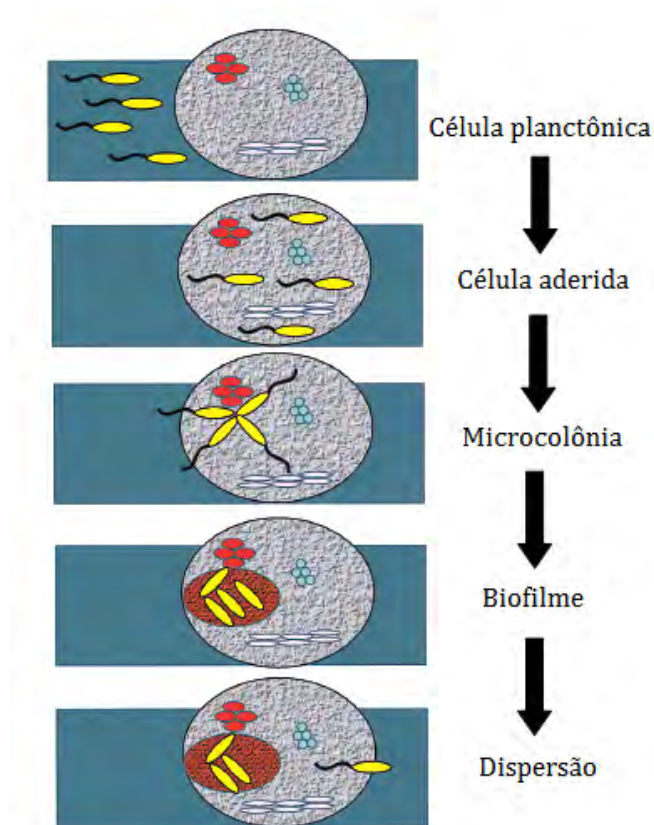
e atrações eletrostáticas. Em seguida, apêndices extracelulares, como as fímbrias (KARATAN e WATNICK, 2009; SIMÕES et al., 2010), proteínas e polissacarídeos associados a superfície, lipopolissacarídeos (LPS) e flagelos ligam-se ao substrato por meio de interações físico-químicas superando as forças de repulsão e atuando como adsorvente ou adesivo permitindo a adesão irreversível a superfície (DONLAN, 2002; BELOIN, et al., 2008).

A superfície de adesão pode ser inerte, biótica ou abiótica (DONLAN, 2001). Geralmente, micro-organismos aderem mais facilmente em superfícies hidrofóbicas, como teflon e outros plásticos, do que em materiais hidrofílicos como vidro ou metais, uma vez que, o número de interações hidrofóbicas varia diretamente com a natureza apolar das superfícies envolvidas (BENDINGER, 1993; DONLAN, 2002). As fímbrias, encontradas em bactérias gram-negativas (SIMÕES et al., 2010), outras proteínas com grandes proporções de aminoácidos hidrofóbicos (ROSENBERG e KJELLEBERG, 1986), e componentes de bactérias gram-positivas, como os ácidos micólicos das micobactérias, favorecem a adesão inicial a substratos hidrofóbicos, enquanto SPE e LPS são mais importantes na fixação a materiais hidrofílicos. A rugosidade, assim como a hidrofobicidade, também influencia diretamente na formação do biofilme (CHARACKLIS et al., 1990).

As bactérias aderidas irreversivelmente multiplicam-se e progridem de uma monocamada para uma microcolônia ou tornam-se membros da microcolônia já existente. Entre as microcolônias formam-se lacunas intersticiais (canais aquosos) que permitem o fluxo de líquido, e conseqüentemente, a difusão de nutrientes, oxigênio e agentes antimicrobianos (LEWAANDOWSKI, 2000; SUH et al., 2010). Durante as etapas de formação do biofilme, além de crescimento microbiano e transporte de nutrientes e metabólitos, há produção de moléculas de sinalização célula-célula e SPE (FLEMMING e WINGENDER, 2010), resultando, finalmente, na estrutura tridimensional do biofilme.

Os biofilmes são dinâmicos e, ocasionalmente, uma bactéria pode se destacar (WATNICK e KOLTER, 2000; BREYERS e RATNER, 2004) e mover-se livremente até encontrar uma nova superfície. As células podem se dispersar de forma ativa ou passiva, processos mediados, respectivamente, pela própria bactéria e por forças externas, como tensão do fluido e abrasão (KAPLAN, 2010). A dispersão

do biofilme é importante para a sobrevivência das espécies (WOOD et al., 2011), bem como para a transmissão de patógenos dos reservatórios ambientais para hospedeiros humanos, transmissão entre hospedeiros e para a exacerbação e disseminação da infecção dentro de um hospedeiro (KAPLAN, 2010).



**Etapas de formação do biofilme**  
Adaptado de Watnick & Kolter, 2000.

**Representação esquemática das etapas de formação de biofilme sobre uma superfície previamente colonizada com várias espécies bacterianas.** A bactéria aquática (amarela) desloca-se utilizando flagelos polares e forma associações aleatórias frouxas com a superfície. Interações físico-químicas permitem associação irreversível (célula aderida) com a superfície e a bactéria inicia a formação de uma microcolônia. Finalmente, a bactéria produz exopolissacarídeos formando a arquitetura tridimensional do biofilme. Quando as condições do ambiente tornam-se desfavoráveis, uma bactéria pode se destacar e mover-se para encontrar uma superfície mais favorável.

A formação do biofilme tem sido documentada como estratégia de sobrevivência dos micro-organismos conferindo resistência a muitos antimicrobianos, desinfetantes e biocidas (PROSSER et al., 1987; STEWART et al., 2004; IYAMBA et al., 2011) e proteção contra as defesas do organismo, como

anticorpos, fagócitos e Sistema Complemento (ANDERSON e O'TOOLE, 2008; SUH et al., 2010; CHIBEU et al., 2012).

Pesquisas têm revelado que concentrações de antibióticos suficientes para inativar células livres são, em geral, inadequadas para inativar células no interior de biofilmes, principalmente aquelas situadas em regiões mais profundas, e que uma bactéria no interior do biofilme pode ser mil vezes mais resistente ao tratamento antimicrobiano (HOYLE e COSTERTON, 1991; DONLAN, 2001; DONLAN e COSTERTON, 2002, HOIBY et al., 2010). Assim, infecções que cursam com ou decorrem da formação de biofilmes são mais difíceis de serem tratadas (CARSON et al., 2010), constituindo um importante problema de saúde pública (DONLAN, 2001). Além da resistência a antimicrobianos e proteção contra o sistema imune do hospedeiro, outras características dos biofilmes podem ser importantes no processo infeccioso de uma doença, incluindo destacamento de células ou de agregados que pode resultar em infecções na corrente sanguínea, trato urinário ou em embolia; troca de plasmídeos de resistência a antimicrobianos e produção de endotoxinas por bactérias gram-negativas associadas (Donlan, 2002).

Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar a maior resistência dos biofilmes a antibióticos, entre eles a menor taxa de crescimento microbiano (EVANS et al., 1990) resultante da compressão espacial que impede a divisão celular (WATNICK e KOLTER, 2000; STEWART e FRANKLIN, 2008) e/ou da difusão limitada de nutrientes, vitaminas e cofatores (LÓPEZ et al., 2011); a impenetrabilidade do biofilme; indução de mecanismos de resistência (DONLAN e COSTERTON, 2002; STEWART et al., 2004) e ainda a expressão de sistemas antitoxina-toxina que bloqueiam os antibióticos (LEWIS, 2005). A difusão limitada de moléculas antimicrobianas no biofilme tem sido relacionada à interação direta do antibiótico com proteínas e polissacarídeos da SPE (DONLAN, 2000; MAH e O'TOOLE, 2001) e à barreira física formada pela matriz (HALL-STOODLEY e STOODLEY, 2009). Considerando-se a indução de resistência, o microambiente do biofilme facilita a transferência de material genético (elementos genéticos extracromossomais, como os plasmídeos), entre as bactérias estimulando a variabilidade e mutações adaptativas (SUH et al., 2010). Hausner e Wuertz (1999) já haviam demonstrado



que a taxa de conjugação entre células do biofilme é maior que em células planctônicas.

Embora os mecanismos reguladores da formação de biofilmes dependam das condições do ambiente e variam grandemente entre diferentes espécies e até mesmo entre diferentes cepas de uma mesma espécie (LÓPEZ et al., 2011), alguns aspectos são comuns a regulação (MONDS e O'TOOLE, 2009). De modo geral, a formação do biofilme é um processo ordenado e regulado por genes específicos, cuja expressão é dependente da resposta da célula aos sinais externos.

Os sinais externos podem ser produzidos e secretados pela própria comunidade bacteriana, sendo chamados de autoindutores (AIs) (LÓPEZ et al., 2011). Os AIs acumulam-se extracelularmente e ligam-se a receptores de superfície disparando cascatas de transdução de sinal que resultam em mudanças na regulação de vários genes. Em bactérias, este mecanismo de comunicação célula-célula é chamado "*quorum-sensing*" (QS) e controla um grande número de processos, incluindo biossíntese enzimática extracelular, biossíntese de antibióticos, produção de biosurfactantes, síntese de SPE e de fatores de virulência em bactérias gram-negativas, resultando no desenvolvimento de um fenótipo específico do biofilme (FUX et al., 2005; SUH et al., 2010).

Em adição as moléculas QS, uma diversidade de outros sinais induzem a formação de biofilmes, como os metabólitos secundários, incluindo antibióticos, pigmentos e sideróforos (peptídeos de síntese não ribossômica e com alta afinidade por ferro produzidos por micro-organismos) (LÓPEZ et al., 2011).

Os biofilmes podem interferir em diversas atividades humanas. O crescimento indesejado dos biofilmes tem impacto negativo na indústria, com ocorrência de danos a equipamentos e contaminação de produtos (SIMÕES et al., 2010) e na saúde, estando relacionado a várias doenças infecciosas, tais como, fibrose cística, endocardite e periodontite e, também, a contaminação de dispositivos médicos, como cateteres urinários e venosos, tubos endotraqueais, válvulas cardíacas sintéticas, marca-passos e agulhas, após a inoculação de poucas células provenientes da pele ou mucosas do paciente durante a introdução (SAWHNEY e BERRY, 2009; YE-JIN e DOUGLAS, 2009; CARSON et al., 2010; SUH et al., 2010). Estes problemas são intensificados pelo aumento da resistência dos

micro-organismos ao sistema imune (ADBI-ALI et al., 2006), a antimicrobianos (HOIBY et al., 2010) e a métodos de desinfecção e limpeza (IYAMBA et al., 2011). Além disso, biofilmes maduros encontram-se fortemente aderidos a superfícies e são resistentes ao fluxo, servindo como uma fonte persistente de contaminação e infecção (ABEE et al., 2011).

Estima-se que a formação e persistência dos biofilmes estejam associadas a, no mínimo, 65% das infecções humanas, incluindo cárie dentária, periodontite, fibrose cística, osteonecrose, infecções musculoesqueléticas, infecções do trato urinário e dos olhos, otite média, endocardite e prostatite crônica (SAWHNEY e BERRY, 2009; SUH et al., 2010). Além disso, biofilmes estão envolvidos em cerca de 80% das doenças bacterianas inflamatórias crônicas e doenças infecciosas (SAUER et al., 2007).

No entanto, a formação de biofilmes em superfícies do corpo humano pode ser benéfica. Diversas espécies de micro-organismos encontradas nos biofilmes formadores da placa dentária antagonizam a colonização da superfície do dente por organismos patogênicos (KRETH et al., 2008).

Na natureza e na indústria os biofilmes também têm aplicações importantes, com destaque para os processos de biorremediação e os sistemas eletroquímicos nos quais os micro-organismos são usados para remover contaminantes do ambiente, como metais pesados (SINGH et al., 2006) e para produzir energia (KIELY et al., 2010), respectivamente.

Uma vez que os biofilmes são resistentes à remoção, ao tratamento com antimicrobianos e ao ataque do sistema imune do hospedeiro, torna-se necessário o desenvolvimento de novas estratégias para facilitar sua remoção ou impedir sua formação. Idealmente, prevenir a formação do biofilme é mais vantajoso que tratá-lo, entretanto, ainda não existe técnica capaz de prevenir ou controlar com sucesso a formação de biofilmes indesejáveis sem causar efeitos colaterais. Até o momento algumas metodologias têm sido usadas para tentar controlar ou remover biofilmes sobre superfícies (SIMÕES et al., 2010) incluindo a modificação das propriedades físico-químicas (ROSMANINHO et al., 2007); incorporação ou revestimento das superfícies com antibióticos (PARK et al., 2004; SIMÕES et al., 2010), enzimas (LEE et al., 2008; CARO et al., 2009; IZANO et al., 2009; SIMÕES et al., 2010), prata

(AHEARN et al., 2000; HASHIMOTO, 2001) e fagos (DONLAN, 2009; SIMÕES et al., 2010).

## **1.2. *Escherichia coli***

*Escherichia coli* é a espécie mais comum e clinicamente mais importante do gênero *Escherichia*. Pertencentes à família Enterobacteriaceae, as bactérias desta espécie apresentam-se como bastonetes Gram-negativos, aeróbios facultativos, não esporulados e móveis (YOUN et al., 2010). Além disso, são micro-organismos com necessidade nutricional simples, fermentadores de glicose e lactose e redutores de nitrato (MURRAY et al., 2006).

Assim como as demais bactérias Gram-negativas, *E. coli* possui LPS, também denominado endotoxina, associado a membrana externa (RAKHUBA et al., 2010). Este polímero glicolipídico é formado por três componentes: o lipídeo A (componente tóxico), um polissacarídeo central comum as enterobactérias e o polissacarídeo somático O ou antígeno O (componente mais externo). De acordo com os antígenos O, H (flagelar) e K (capsular), as cepas de *E. coli* são classificadas em sorotipos O:H:K (BELOIN et al., 2008).

Esta bactéria é um dos principais componentes da flora normal do trato intestinal humano ou animal (HOLT, 1994; CROXEN e FINLAY, 2010; YOUN et al., 2010). Apesar de normalmente inofensiva, algumas cepas são patogênicas devido à habilidade em adquirir fatores de virulência através de plasmídeos, transposons e/ou ilhas de patogenicidade (BELOIN et al., 2008; KAPER et al., 2008; CROXEN e FINLAY, 2010; YOUN et al., 2010). As doenças relacionadas a *E. coli* variam de gastroenterites a infecções extra-intestinais do trato urinário, sangue e sistema nervoso central (CROXEN e FINLAY, 2010). Em animais, é o agente mais importante e mais frequentemente isolado de casos clínicos de mastite ambiental bovina (BRADLEY e GREEN, 2009) que traz sérios prejuízos à pecuária incluindo redução na produção de leite até morte do animal, que ocorre em 10% dos casos mais severos (CHANETON et al., 2008).

As cepas patogênicas podem ser classificadas em patovares, cepas ou conjunto de cepas com características muito semelhantes diferindo quanto à patogenicidade e especificidade pelo hospedeiro. Os oito patovares de seres

humanos e seus mecanismos de doença têm sido extensamente estudados e foram divididos em dois grupos: *E. coli* diarreioagênica e *E. coli* extra-intestinal (ExPEC). Os patovares *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* que adere difusamente (DAEC) são diarreioagênicos e os patovares *E. coli* uropatogênica (UPEC) e *E. coli* da meningite neonatal (NMEC) são os isolados extra-intestinais mais comuns. Outros patovares têm sido identificados, mas seus mecanismos de patogênese ainda não são bem definidos (YOUN et al., 2010, CROXEN e FINLAY, 2010).

Sob determinadas condições, *E. coli* pode aderir e interagir com superfícies vivas ou inertes iniciando o crescimento celular. Este crescimento resulta na formação de colônias microbianas e quando a massa celular é suficiente para captar nutrientes, resíduos e outros micro-organismos forma-se o biofilme (FLINT et al., 2011). Fatores de virulência do tipo adesinas, incluindo fímbria tipo I ou pili, fímbria curli ou fímbria agregativa e pilus conjugativo, contribuem para a adesão irreversível a superfícies (BELOIN et al., 2008) favorecendo a formação de biofilme. Outras adesinas incluindo fatores de aderência, intimina, pili P, “bundle-forming pilus” já foram descritas (MURRAY et al., 2006).

Os biofilmes de *E. coli* crescem sob condições estáticas e dinâmicas, consistindo de uma camada densa de células envolvidas por matriz complexa contendo polissacarídeos, lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos e polímeros de N-acetilglicosamina denominados adesina polissacarídica intercelular (*polysaccharide intercellular adhesin*, PIA) (GOLLER et al., 2006; ABEE et al., 2011; PATEL et al., 2011). A PIA está ancorada na parede celular e serve para manter as células unidas, provavelmente por interagir com outras proteínas de superfície de células vizinhas (LÓPEZ et al., 2011).

*E. coli* pode formar biofilme em tecidos vivos, dispositivos médicos (DONLAN, 2001) e superfícies de alimentos e equipamentos de estocagem (KERKSIEK, 2008). Biofilmes crescidos em dispositivos médicos originam-se, geralmente, da microflora da pele do paciente ou dos assistentes de saúde e de orifícios expostos à água contaminada (DONLAN, 2001) e podem levar a infecções persistentes devido à liberação contínua da bactéria (SAWHNEY e BERRY, 2009).

Além disso, estas comunidades microbianas podem bloquear o lúmen destes dispositivos cujo único tratamento efetivo, até o momento, é a remoção cirúrgica (CARSON et al., 2010). Embora existam dispositivos médicos com diferentes composições (silicone, poliuretano e materiais cobertos com hidrogel), não existe diferença na eficiência dos mesmos em prevenir a colonização por micro-organismos (TUNNEY et al., 1999).

Considerando a importância da formação de biofilme de *E. coli* na saúde, a prevenção da formação ou remoção do biofilme de forma eficiente e bem tolerada pelo organismo consiste um importante alvo terapêutico.

### **1.3. Bacteriófagos**

Bacteriófagos ou fagos são parasitas bacterianos geneticamente e estruturalmente simples, apresentando o material genético (DNA ou RNA) encapsulado por um envoltório protéico ou lipoprotéico denominado capsídeo (DONLAN, 2009).

Fagos são ubíquos na natureza, sendo encontrados em mais de 140 gêneros de bactérias e na flora microbiológica natural dos alimentos (PATEL et al., 2011). Alguns autores consideram os fagos como a entidade biológica mais abundante (O'FLAHERTY et al., 2009; SIMÕES et al., 2010), com estimativas de  $10^{31}$  partículas de fago no mundo (WHITMAN et al., 1998).

As interações fago-bactéria têm um papel essencial na reciclagem de nutrientes na natureza, na regulação de ecossistemas microbianos e na transferência de genes entre populações bacterianas (SUTTLE, 2007). Além disso, considerando que os fagos líticos infectam bactérias seletivamente e provocam sua lise, podem prover uma técnica natural, altamente específica, não tóxica e viável para controlar vários micro-organismos envolvidos na formação de biofilmes (CARSON et al., 2010).

Os fagos possuem dois tipos de ciclo de vida, o ciclo lítico usado por fagos temperados e virulentos e o ciclo lisogênico usado apenas por fagos temperados. As etapas iniciais dos ciclos são semelhantes e envolvem ligação do fago a um receptor de superfície da bactéria e inserção do material genético. Em enterobactérias, proteínas localizadas na membrana externa e sítios presentes no LPS servem como

receptores para bacteriófagos (RAKHUBA et al., 2010). No ciclo lítico a maquinaria da célula hospedeira é utilizada para replicação e síntese das proteínas virais. Ocorre então montagem dos fagos intracelularmente, cujo acúmulo resulta em lise da bactéria e liberação das partículas virais. Em contraste, no ciclo lisogênico, o material genético viral é incorporado ao genoma da célula hospedeira e o vírus, denominado neste caso de profago, replica-se junto com a bactéria (SHARMA et al., 2005; ROAD, 2007; O'FLAHERTY et al., 2009). Os ciclos de vida virais são curtos, variando de 20 a 60 minutos (O' FLAHERTY et al., 2009).

No início do século passado, bacteriófagos começaram a ser usados no tratamento de infecções bacterianas (D'HERELLE, 1931). Entretanto, a descoberta e a comercialização de antibióticos a partir da década de 40, bem como o surgimento de antibióticos de amplo espectro, além da má qualidade dos produtos terapêuticos a base de fagos e o pouco entendimento da sua biologia resultaram na interrupção das pesquisas e no declínio do uso de fagos no ocidente, principalmente Europa Ocidental e América do Norte (SULAKVELIDZE et al., 2001; ROAD, 2007).

Atualmente o uso generalizado, indiscriminado e subótimo de antibióticos têm limitado sua eficiência (CARSON et al., 2010) e aumentado a incidência de patógenos resistentes, incluindo *E. coli* (SAENZ et al., 2004). Além disso, houve redução do investimento das indústrias farmacêuticas na descoberta de novos antibióticos principalmente devido ao menor retorno (NORRBY et al., 2005) justificando o renascimento do interesse em avaliar o uso de fagos como agentes antibacterianos para aplicações médicas e veterinárias (FLAHERTY et al., 2009).

Bacteriófagos têm sido usados no tratamento de infecções em feridas diabéticas, na desinfecção e limpeza tópica, na indústria alimentícia, na prevenção da obstrução de cateteres urinários e de sistemas de tubulação de estações de tratamento e em muitos outros processos (GOLDMAN et al., 2009). Um dos maiores avanços no uso de fagos ocorreu em 2006 quando a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou um coquetel de seis fagos para controle de *Listeria monocytogenes* em carne (O'FLAHERTY et al., 2009). Na Polônia, preparações com fagos têm sido administradas em pacientes cujas infecções não responderam a terapia com antibióticos com média de 85% de sucesso (FLAHERTY et al., 2009). Para prevenção

da formação de biofilme fagos têm sido adsorvidos a superfícies ou incorporados dentro de coberturas de superfície (DONLAN, 2009).

Acreditava-se que o uso de fagos para tratar infecções relacionadas com biofilmes poderia ser limitado pela baixa penetração na matriz extracelular (HANLON et al., 2001), entretanto, estudos têm mostrado que o fago é capaz de penetrar no biofilme (LACROIX-GUEU, 2005) e lisar as bactérias (CURTIN e DONLAN, 2006; CHIBEU et al., 2012). Além disso, muitos fagos sintetizam enzimas associadas à superfície chamadas depolimerases capazes de hidrolisar polissacarídeos bacterianos, permitindo seu acesso aos receptores específicos das bactérias (SUTHERLAND et al., 2004; DONLAN, 2009; KAY et al., 2011) e facilitando a destruição do biofilme. Como diferentes bactérias possuem SPE com diferentes polissacarídeos e como os fagos são cepa-específicos, várias enzimas e vários tipos de fagos provavelmente são requeridos para degradar biofilmes mistos (WOOD et al., 2011).

A especificidade do fago para um micro-organismo limita a possibilidade de perturbação da flora normal e sua habilidade para propagar no sítio da infecção distingue-o de outros antimicrobianos como os antibióticos (CAMPBELL, 2003; CARSON et al., 2010). Os fagos podem ser específicos para uma única cepa ou ser de amplo espectro e infectar muitas cepas bacterianas de uma única espécie ou até mesmo de múltiplas espécies relacionadas (DONLAN, 2009).

É importante ressaltar que os fagos são antigênicos, podendo induzir resposta imune celular e produção de anticorpos pelo organismo (DONLAN, 2009). Porém estudos têm mostrado que os fagos podem se associar a SPE protegendo-se da depuração e inativação pelo sistema imune e que a produção de anticorpos em resposta ao fago é muito fraca, exceto nos casos em que anticorpos já estavam presentes antes do tratamento (DONLAN, 2009). Considerando ainda que seres humanos são expostos a fagos do ambiente desde o nascimento e que fagos têm sido isolados do seu trato gastrointestinal e cavidade oral (GORSKI e WEBER-DABROWSKA, 2005) tratamentos terapêuticos com fagos devem ser bem tolerados (DONLAN, 2009).

Além de ativar o sistema imune, preparações de fagos podem conter endotoxinas que em quantidades suficientes podem causar febre, hipotensão e choque (RIETSCHER et al., 1982).

Recentemente, Flaherty et al. (2009) listou as principais vantagens e desvantagens do uso de fagos. Dentre as vantagens pode-se destacar: (1) fácil isolamento e propagação; (2) capacidade de destruir patógenos resistentes; (3) atuação sinérgica em mistura de fagos ou em combinação com antibióticos; (4) efeito sobre organismos gram-positivos e gram-negativos; (5) aplicação em diversos ambientes (ser humano, animais, alimentos, biofilmes, dispositivos médicos, entre outros); (6) manipulação genética fácil; (7) alta especificidade; (8) método profilático ou para tratamento e (9) certificado de segurança de alguns produtos pela FDA. Dentre as desvantagens foram listados: (1) necessidade de selecionar fagos não virulentos e não-lisogênicos; (2) surgimento de cepas bacterianas resistentes; (3) variedade limitada de hospedeiros e (4) necessidade de aceitação dos consumidores e regulação específica.

Terapias com fagos têm tido resultados variados, com sucesso e fracasso (FLAHERTY et al., 2009). As falhas têm sido atribuídas a diversos fatores incluindo falta de conhecimento sobre a biologia dos fagos e sobre as causas fundamentais da doença, técnicas experimentais insatisfatórias e má qualidade das preparações. Conhecendo-se a biologia do fago, é possível manipulá-lo geneticamente de modo a obter fagos com maior resistência à depuração pelo sistema imune (DONLAN, 2009) ou que expressem depolimerases apropriadas (FLAHERTY et al., 2009) que facilitem a prevenção e a remoção dos biofilmes.



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Estudar o efeito de bacteriófago lítico na prevenção da formação de biofilme por *Escherichia coli* e na degradação de biofilmes estabelecidos.

### **2.2. Objetivos específicos**

2.2.1. Avaliar a formação do biofilme;

2.2.2. Avaliar o efeito de bacteriófago lítico sobre:

(a) o crescimento de células livres;

(b) a quantidade de biofilme;

(c) a morfologia dos biofilmes.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Bactéria**

##### **3.1.1. Linhagem**

A linhagem bacteriana *Escherichia coli* 30, utilizada neste trabalho, pertence à coleção de patógenos do Laboratório de Imunovirologia Molecular (LIVM) do Departamento de Biologia Geral - Universidade Federal de Viçosa (UFV). Trata-se de um isolado de animais com mastite, cedido pela Embrapa Gado de Leite.

##### **3.1.2. Ativação**

Para a ativação e obtenção de colônias bacterianas isoladas, as cepas de *E. coli* foram estriadas em placas de cultura contendo meio Luria-Bertani (LB), composto por triptona 1%, extrato de levedura 0,5% e NaCl 1%, pH 7,2, suplementado com 1,5% de agar bacteriológico (LB sólido), e incubadas em estufa incubadora a 37°C por 16h.

##### **3.1.3. Obtenção de estoques bacterianos**

A obtenção de estoques bacterianos de *E. coli* 30 para o plaqueamento e titulação de bacteriófagos seguiu a metodologia descrita por Sambrook e Russell (2001) com modificações. Inicialmente, uma colônia isolada, obtida como descrito no item 3.1.2, foi cultivada em 30 mL de LB sem suplementação com agar (LB) sob agitação a 180 rpm a 37°C até atingir absorbância igual a 0,7 no comprimento de onda de 600 nm ( $Abs_{600}$ ), quando a cultura foi centrifugada a 4000 g por 10 min. O precipitado foi ressuspenso e a  $Abs_{600}$  foi ajustada para 2,0 com  $MgSO_4$  10 mM. Os estoques foram mantidos sob refrigeração a 4°C até sua utilização.

##### **3.1.4. Obtenção de cultura bacteriana para avaliação do efeito do bacteriófago**

Uma colônia isolada, obtida como descrito no item 3.1.2, foi transferida para 10 mL de LB e incubada sob agitação a 180 rpm a 37°C por cerca de 2 h. Após incubação, a  $Abs_{600}$  foi lida e ajustada para 0,1, correspondente a aproximadamente  $10^8$  Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por mL (Sambrook e Russell, 2001; Izutani et al., 2011; Kannan et al., 2012), com LB, se necessário.

## **3.2. Bacteriófago**

### **3.2.1. Ecofago**

O bacteriófago Ecofago 017, isolado de amostras da rede de esgoto de Viçosa-MG pelo LIVM, foi utilizado em todos os experimentos de prevenção e degradação do biofilme de *E. coli* 30.

### **3.2.2. Propagação**

Para propagação dos bacteriófagos foi utilizada a metodologia adaptada de Chan et al. (2007). Alíquotas de 100 µL do estoque bacteriano ( $Abs_{600}$  igual a 2,0) foram adicionadas a igual volume de fago em estoque, a mistura foi incubada a 37°C por 30 min para adsorção do fago ao hospedeiro. A mistura foi então adicionada a 4 mL de LB acrescido de 0,75% de agar bacteriológico (LB semi-sólido), fundido e mantido a 55°C, e vertida sobre placa de cultura contendo LB sólido. Após solidificação, as placas foram invertidas e incubadas a 37°C por 24 h. No dia seguinte, as placas foram avaliadas quanto ao grau de lise, adicionadas de 5 mL de tampão SM (5,8 g de NaCl, 2,0 g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 50 mL Tris-HCl 1M pH 7,5, 5 mL gelatina 2% e água suficiente para 1 L), e incubadas sob agitação a 50 rpm a 4°C por 4 h para extração dos fagos. O tampão SM foi recuperado, acrescido de NaCl 1 M e mantido a 4°C por 1 h. A suspensão contendo os bacteriófagos foi filtrada em membrana de 0,22 µm e estocada a 4°C para os experimentos seguintes.

### **3.2.3. Titulação**

Na determinação do título de bacteriófagos, a suspensão obtida na etapa de propagação foi diluída em série decimal utilizando tampão SM a fim de obter entre 10 e 100 Unidades Formadoras de Placas (UFP) por mL de suspensão (CARRILLO et al., 2005). Foram feitas 20 diluições em microtubos de 1,5 mL. Em seguida, alíquotas de 100 µL de bactéria de propagação ( $Abs_{600}$  igual a 2,0) foram adicionadas a quantidade equivalente de fago nas diferentes diluições e a mistura foi incubada a 37°C por 30 min. Após incubação, a mistura foi adicionada a 4 mL de LB semi-sólido, fundido e mantido a 55°C, e vertida sobre placa de cultura contendo LB sólido, que foi então incubada a 37°C por 24 h. As placas foram avaliadas para verificar grau de

lise e aquela com contagem de UFP entre 10 e 100 foi utilizada para determinar o título do fago a partir da equação:

$$\text{UFP/mL} = \frac{\text{Número de placas de lise} \times \text{Fator de diluição}}{\text{Volume de fago (mL)}}$$

### **3.3. Análises quantitativas colorimétricas**

A quantificação de biofilmes foi realizada em microplacas de poliestireno de 96 poços de fundo chato.

#### **3.3.1. Avaliação do tempo sobre a formação de biofilme**

A cultura bacteriana com Abs<sub>600</sub> igual a 0,1 (10<sup>8</sup> UFC/mL) foi obtida conforme descrito no item 3.1.4. Imediatamente, 20 µL de cultura bacteriana foram adicionados a 180 µL de LB contido em poços de três placas de poliestireno de 96 poços (concentração final da cultura bacteriana igual a 10<sup>7</sup>UFC/mL). As placas foram incubadas em atmosfera úmida em estufa a 37°C por 24, 48 e 72 h. O tratamento controle consistiu de LB apenas (WEISS-MUSZKAT, 2010 com modificações).

Após os respectivos tempos de incubação, a Abs<sub>600</sub> (medida da densidade populacional bacteriana) foi determinada em leitor de microplacas, marca Molecular Device<sup>®</sup>, modelo VersaMax. Imediatamente, a cultura bacteriana foi removida vertendo a placa rapidamente e colocando-a em contato com papel absorvente. Os poços foram lavados 2 vezes com PBS 0,2 M pH 7,2 para remoção das células não aderidas. Imediatamente após a última lavagem, as células aderidas foram coradas com cristal violeta (CV) conforme metodologia de O'Toole (2011) modificada. Brevemente, 250 µL de CV 0,1% (p/v) em água foram adicionados aos poços e as placas foram incubadas a temperatura ambiente por 30 min. Então, o corante foi removido como descrito anteriormente e os poços foram lavados 4 vezes com 250 µL de água destilada e secos ao ar por 1 h. Os poços com biofilme formados em 48 h foram fotografados para visualização do biofilme. Em seguida, 250 µL de mistura etanol-acetona 80:20 foram adicionados aos poços e as placas foram mantidas a temperatura ambiente por 30 min para completa dissolução do corante. Então, 200 µL de solução corada de cada poço foram transferidos para

uma nova placa e a absorbância foi medida a 590 nm ( $Abs_{590}$ ) no leitor de microplacas (quantidade de biofilme).

### **3.3.2. Avaliação do efeito do bacteriófago na prevenção da formação do biofilme**

As etapas descritas a seguir foram realizadas segundo metodologia de Kelly et al. (2012) modificada.

A cultura bacteriana com  $Abs_{600}$  igual a 0,1 foi obtida conforme descrito no item 3.1.4. Imediatamente, quantidades iguais a 20  $\mu$ L de cultura bacteriana e de fago em diferentes diluições (suspensão concentrada e 9 diluições decimais em tampão SM) foram adicionadas a 160  $\mu$ L de LB contido em poços de uma placa de poliestireno de 96 poços (diluição 1:10). Os tratamentos controles consistiram de LB apenas, LB acrescido de fago e LB acrescido de cultura bacteriana. A placa foi incubada em estufa a 37°C por 24 h.

Após os respectivos tempos de incubação, a  $Abs_{600}$  foi determinada (medida da densidade populacional bacteriana) e os poços corados com CV como descrito no item 3.3.1 para quantificação do biofilme. O cálculo da massa relativa do biofilme foi realizado normalizando a absorbância do tratamento controle positivo em 100% (WEISS-MUSZKAT et al., 2010).

### **3.3.3. Avaliação do efeito do bacteriófago na degradação do biofilme**

A cultura bacteriana com  $Abs_{600}$  igual a 0,1 foi obtida conforme descrito no item 3.1.4. Imediatamente, 20  $\mu$ L de cultura bacteriana foram adicionados a 180  $\mu$ L de LB contido em poços de uma placa de poliestireno de 96 poços. Os tratamentos controles consistiram de LB apenas e LB acrescido de cultura bacteriana. As placas foram incubadas em atmosfera úmida em estufa a 37°C por 24h.

Após formação do biofilme, a cultura bacteriana foi descartada vertendo a placa rapidamente e colocando-a em contato com papel absorvente umedecido com etanol 70% para evitar contaminação. Os poços foram lavados 2 vezes com PBS 0,2 M pH 7,2 para remoção das células não aderidas e, imediatamente, acrescidos de 20  $\mu$ L de fago em diferentes diluições (suspensão concentrada e 9 diluições decimais em tampão SM) e 180  $\mu$ L de LB. Aos poços contendo os controles foram adicionados 200  $\mu$ L de LB apenas. As placas foram incubadas em atmosfera úmida

em estufa a 37°C por 24 h (CHIBEU et al., 2012 com modificações). Após incubação, a Abs<sub>600</sub> foi determinada (medida da densidade populacional bacteriana formada a partir de células aderidas) e os poços foram corados com CV como descrito no item 3.3.1.

O cálculo da massa relativa do biofilme foi realizado normalizando a absorbância do tratamento controle em 100% (WEISS-MUSZKAT et al., 2010).

### **3.4. Análises microscópicas**

#### **3.4.1. Preparo de cupons de poliestireno**

Para as análises microscópicas foram utilizados pedaços de poliestireno (cupons) com dimensões de 1 x 1 x 0,1 cm como suporte para a formação do biofilme. Estes cupons foram escovados com detergente líquido e rinsados com água destilada. Para esterilização, os cupons foram imersos em hipoclorito de sódio 1% e etanol 70% por 15 min cada e mantidos sob luz UV por 30 min de cada lado.

#### **3.4.2. Obtenção das amostras**

##### **3.4.2.1. Avaliação do tempo sobre a formação de biofilme**

A cultura bacteriana com Abs<sub>600</sub> igual a 0,1 foi obtida conforme descrito no item 3.1.4. Imediatamente, quantidades iguais a 125 µL de cultura bacteriana e 1,125 mL de LB foram adicionados a tubos Falcon contendo 1 cupom. Os tratamentos controles consistiram de cupons imersos em LB apenas. Os tubos foram incubados sem agitação em estufa incubadora a 37°C por 24, 48 e 72 h. Após os respectivos tempos, os cupons foram preparados para análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

##### **3.4.2.2. Avaliação do efeito do bacteriófago na prevenção da formação do biofilme**

Tendo sido determinado o perfil do efeito do bacteriófago na prevenção da formação do biofilme e sobre o biofilme formado (3.3.2 e 3.3.3), foram definidos três e quatro pontos, respectivamente, para as análises por microscopia confocal e MEV. Para microscopia confocal foram utilizados os tratamentos: controle positivo (sem fago) e dois diferentes títulos de fago (suspensão concentrada e diluição 10<sup>-8</sup>

em SM) e para MEV, além destes 3 tratamentos, foi utilizada também a diluição de fago  $10^{-5}$  em SM. Os tratamentos foram designados como ALTO (suspensão concentrada), MÉDIO ( $10^{-5}$ ) e BAIXO ( $10^{-8}$ ) título.

A cultura bacteriana com  $Abs_{600}$  igual a 0,1 foi obtida conforme descrito no item 3.1.4. Imediatamente, quantidades iguais a 125  $\mu$ L de cultura bacteriana e de fago nos títulos previamente definidos e 1 mL de LB foram adicionados a tubos Falcon contendo 1 cupom. Os tratamentos controles consistiram de cupons imersos em LB apenas, LB acrescido de tampão SM e LB acrescido de cultura bacteriana. Os tubos foram incubados sem agitação a 37°C por 24 h. Após a incubação, os cupons foram preparados para análise por microscopia confocal e MEV.

#### **3.4.2.3. Avaliação do efeito do bacteriófago na degradação do biofilme**

Os tratamentos para realização deste experimento foram definidos conforme descrito no item 3.4.2.2.

A cultura bacteriana com  $Abs_{600}$  igual a 0,1 foi obtida conforme descrito no item 3.1.4. Imediatamente, quantidades iguais a 125  $\mu$ L de cultura bacteriana e 1,125 mL de LB foram adicionados a tubos Falcon contendo 1 cupom. Os tratamentos controles consistiram de cupons imersos em LB apenas, LB acrescido de tampão SM e LB acrescido de cultura bacteriana. Os tubos foram incubados sem agitação a 37°C por 24 h.

Após formação do biofilme, os cupons foram lavados 2 vezes por imersão em PBS 0,2 M pH 7,2 e transferidos para tubos contendo 125  $\mu$ L de fago nos títulos previamente definidos e 1,125 mL de LB e incubados sem agitação em estufa incubadora a 37°C por 24 h. Aos tratamentos controles foram adicionados LB apenas e LB acrescido de tampão SM. Após incubação, os cupons foram preparados para análise por microscopia confocal e MEV.

### **3.4.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

Os cupons obtidos conforme descrito no item 3.4.2 foram lavados 2 vezes por imersão em PBS 0,2 M pH 7,2 e fixados em glutaraldeído 2,5% (v/v) em tampão cacodilato 0,05 M pH 7,2, a temperatura ambiente por 2 h. Em seguida, os cupons foram lavados 3 vezes por imersão em tampão cacodilato 0,05 M pH 7,2 e submetidos a pós-fixação com tetróxido de ósmio 1% (p/v) em tampão cacodilato 0,05 M pH 7,2, a temperatura ambiente por 1 h. Os cupons foram lavados 3 vezes em tampão cacodilato e submetidos a desidratação em série de concentração crescente de etanol (30 a 100% v/v) por 10 min cada, a temperatura ambiente. A desidratação em etanol 100% foi repetida 3 vezes a fim de obter máxima retirada da água. Imediatamente após a última etapa de desidratação, os cupons foram submetidos à secagem no ponto crítico (Critical Point Dryer - CPD<sup>®</sup>, Bal-tec, modelo 030). Em seguida, os cupons foram fixados em porta-espécimes (stubs) com fita dupla face e cobertos com aproximadamente 15 nm de ouro em metalizador (Sputter coater, Balzers, modelo FDU 010). Finalmente os cupons foram examinados no Microscópio Eletrônico de Varredura Leo 1430 VP do Núcleo de Microscopia e Microanálise operando a 20 kV para a obtenção das imagens (WANG, et al., 2012 modificado).

### **3.4.4. Microscopia Confocal de Varredura a Laser**

Os cupons obtidos conforme descrito no item 3.4.2.2 e 3.4.2.3 foram lavados 2 vezes por imersão em PBS 0,2 M pH 7,2 e corados segundo metodologia de Calish et al. (1979) com modificações. Os cupons foram incubados na ausência de luz por 15 min com mistura de iodeto de propídeo (IP) 20 µg/mL e isotiocianato de fluoresceína (FITC) 2 µg/mL em PBS 0,2 M pH 7,2, preparada imediatamente antes do uso. Após incubação os cupons foram lavados por imersão em PBS 0,2 M pH 7,2 e analisados no Microscópio Confocal de Varredura a Laser, marca Zeiss, modelo LSM 510 META utilizando o laser argônio (comprimentos de onda 458 e 514 nm). As células com coloração esverdeada foram consideradas vivas ou viáveis e aquelas que se apresentaram amareladas ou avermelhadas foram consideradas mortas (WANG et al. 2012).



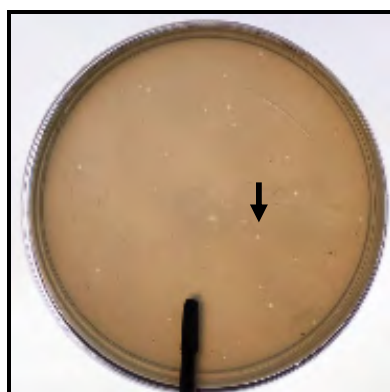
### **3.5. Análise estatística**

Os resultados das análises quantitativas colorimétricas são representativos de 3 experimentos independentes realizados em sextuplicata. Tais resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), com comparação das médias pelo Teste de Tukey, a 5, 1 e 0,1% de probabilidade.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Propagação e titulação do bacteriófago

A propagação do bacteriófago Ecofago 017 em cepas de *E. coli* 30 foi constatada pela presença de placas de lise sobre a superfície do LB sólido (Fig. 1).



**Figura 1.** Meio LB contendo placas de lise (seta) do Ecofago 017 após 24 h de incubação com *E. coli* 30.

A suspensão concentrada, obtida na etapa de propagação, resultou em título viral igual a  $10^{10}$  Unidades Formadoras de Placa por mL (UFP/mL). Os títulos das diluições utilizadas nos experimentos de prevenção da formação e degradação do biofilme foram calculados e encontram-se na tabela 1.

**Tabela 1.** Título viral em Unidades Formadoras de Placas por mL (UFP/mL).

Diluição	Título (UFP/mL)
$10^{-1}$	$10^9$
$10^{-2}$	$10^8$
$10^{-3}$	$10^7$
$10^{-4}$	$10^6$
$10^{-5}$	$10^5$
$10^{-6}$	$10^4$
$10^{-7}$	$10^3$
$10^{-8}$	$10^2$
$10^{-9}$	$10^1$

## 4.2. Análises quantitativas colorimétricas

### 4.2.1. Avaliação do tempo sobre a formação de biofilme

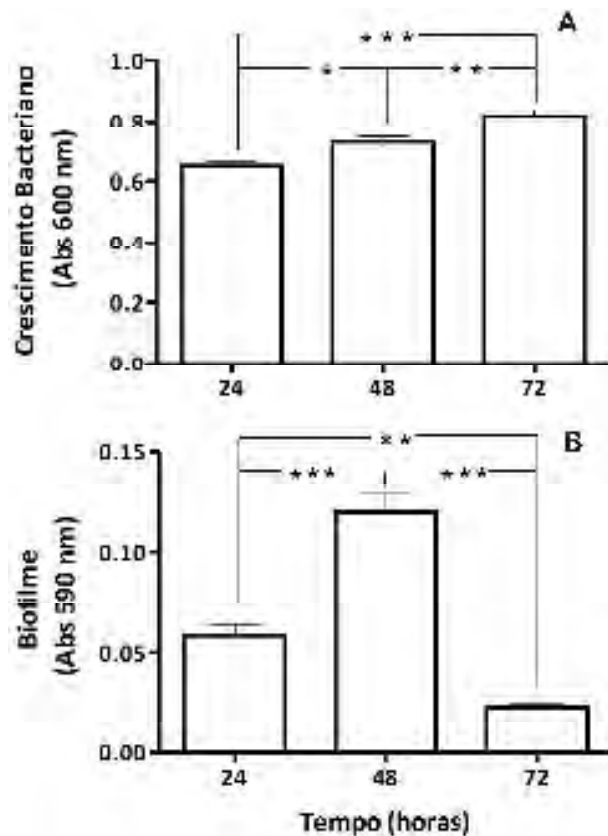
A incubação de *E. coli* 30 a 37°C por 48 h em poços de placas de poliestireno de 96 poços contendo LB e subsequente coloração com cristal violeta 0,1% revelou a formação do biofilme na interface líquido-ar (Fig. 2).



**Figura 2.** Detalhe da formação de biofilme de *E. coli* 30 na interface líquido-ar (seta) em poços da placa de poliestireno de 96 poços contendo LB após 48 h de incubação. Coloração do biofilme com cristal violeta 0,1%.

A leitura da absorbância em 600 nm ( $Abs_{600}$ ) permitiu avaliar o crescimento de *E. coli* 30 em meio LB em diferentes tempos. O crescimento bacteriano diferiu estatisticamente entre os tempos com aumentos de 12,5% a cada 24 h (Fig. 3A).

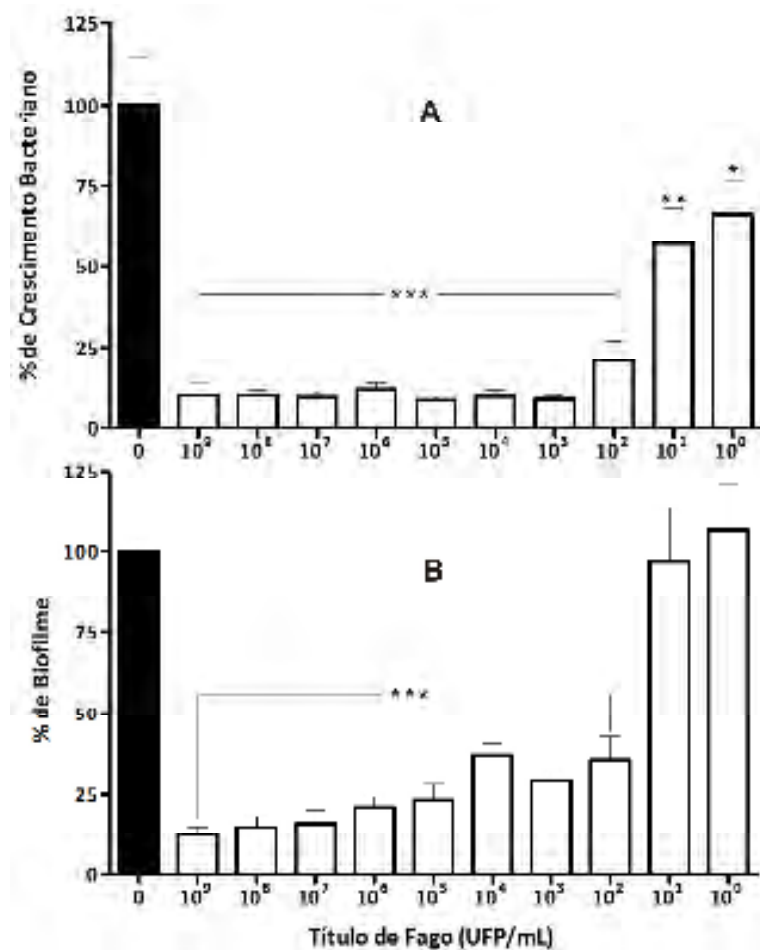
A quantidade de biofilme ( $Abs_{590}$ ) formado pela referida cepa aumentou 2 vezes entre 24 e 48 h. Por outro lado, no tempo de 72 h, houve redução de 5,4 vezes na massa do biofilme em relação ao tratamento de 48 h.



**Figura 3.** Crescimento de *E. coli* 30 (A) e formação de biofilme (B) após incubação em LB por 24, 48 e 72 h. Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média (SEM). Asteriscos denotam diferença significativa em relação ao controle (\*\*\*)  $P \leq 0,001$ ; \*\*  $P \leq 0,01$  e \*  $P \leq 0,05$ ).

#### 4.2.2. Avaliação do efeito do bacteriófago na prevenção da formação do biofilme

O bacteriófago teve efeito na prevenção do crescimento bacteriano (Fig. 4A) e na formação de biofilme (Fig. 4B) após 24 h de incubação. Na ausência de fago (controle), foram observados os maiores valores para crescimento bacteriano e formação de biofilme. Para os tratamentos com título de bacteriófago variando de  $10^9$  a  $10^2$  UFP/mL, o fago induziu redução significativa tanto no crescimento como na formação de biofilme em relação ao controle. Na presença do maior título de fago ( $10^9$  UFP/mL) foi observado redução de 90 e 87,5% no crescimento e na formação de biofilme, respectivamente. Já na presença de menores títulos de fago ( $10^0$  e  $10^1$  UFP/mL), apenas a análise do crescimento bacteriano apresentou diferença estatística em relação ao tratamento controle, reduzindo 56 e 66%, respectivamente.

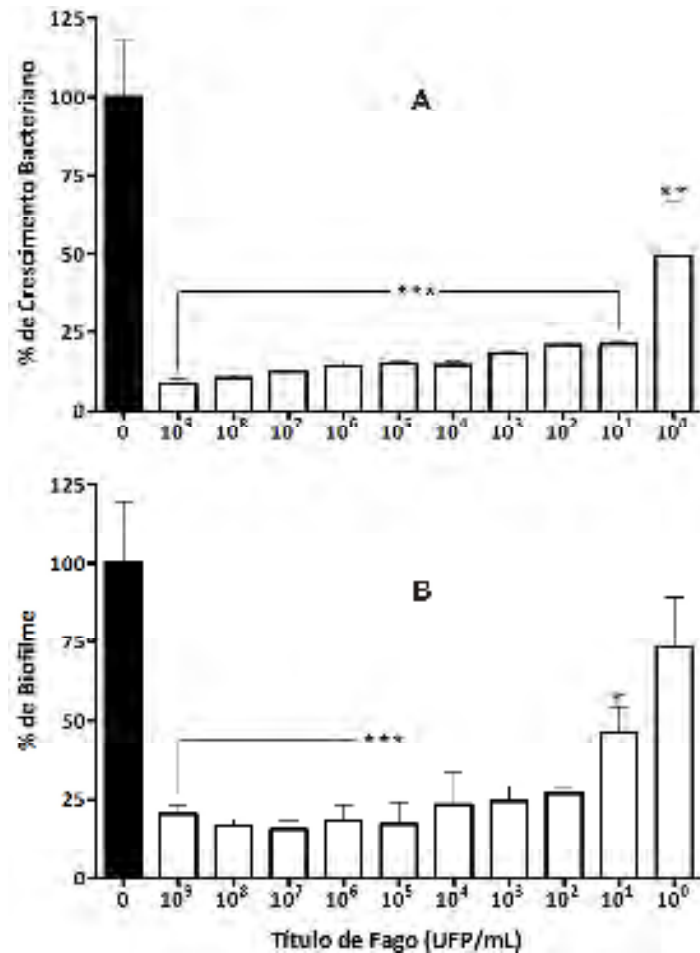


**Figura 4.** Porcentagem de prevenção do crescimento bacteriano (A) e da formação de biofilme (B) em relação ao tratamento controle (100%) após 24 h de exposição a diferentes títulos de fago ( $10^9$  a  $10^0$  UFP/mL) (concentração final). Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média (SEM). Asteriscos denotam diferença significativa em relação ao controle (\*\* $P \leq 0,001$ ; \*\*  $P \leq 0,01$  e \*  $P \leq 0,05$ ).

#### 4.2.3. Avaliação do efeito do bacteriófago na degradação do biofilme

O efeito do bacteriófago no crescimento bacteriano a partir de células aderidas (Fig. 5A) foi semelhante ao efeito na degradação do biofilme (Fig. 5B) após 24 h de tratamento. Na ausência de fago (controle), foram observados os maiores valores para o crescimento bacteriano e formação de biofilme. Em relação ao tratamento controle, foram observadas reduções significativas no crescimento bacteriano em todas as concentrações estudadas de fago (Fig. 5A). Pela análise da degradação do biofilme também é possível observar reduções significativas entre o controle e os tratamentos com fago, exceto para a menor concentração de fago

( $10^0$  UFP/mL) que não exibiu diferença estatística em relação ao controle (Fig. 5B). No maior título de fago ( $10^9$  UFP/mL), foi observado reduções de 91 e 79% no crescimento e na formação de biofilme, respectivamente.



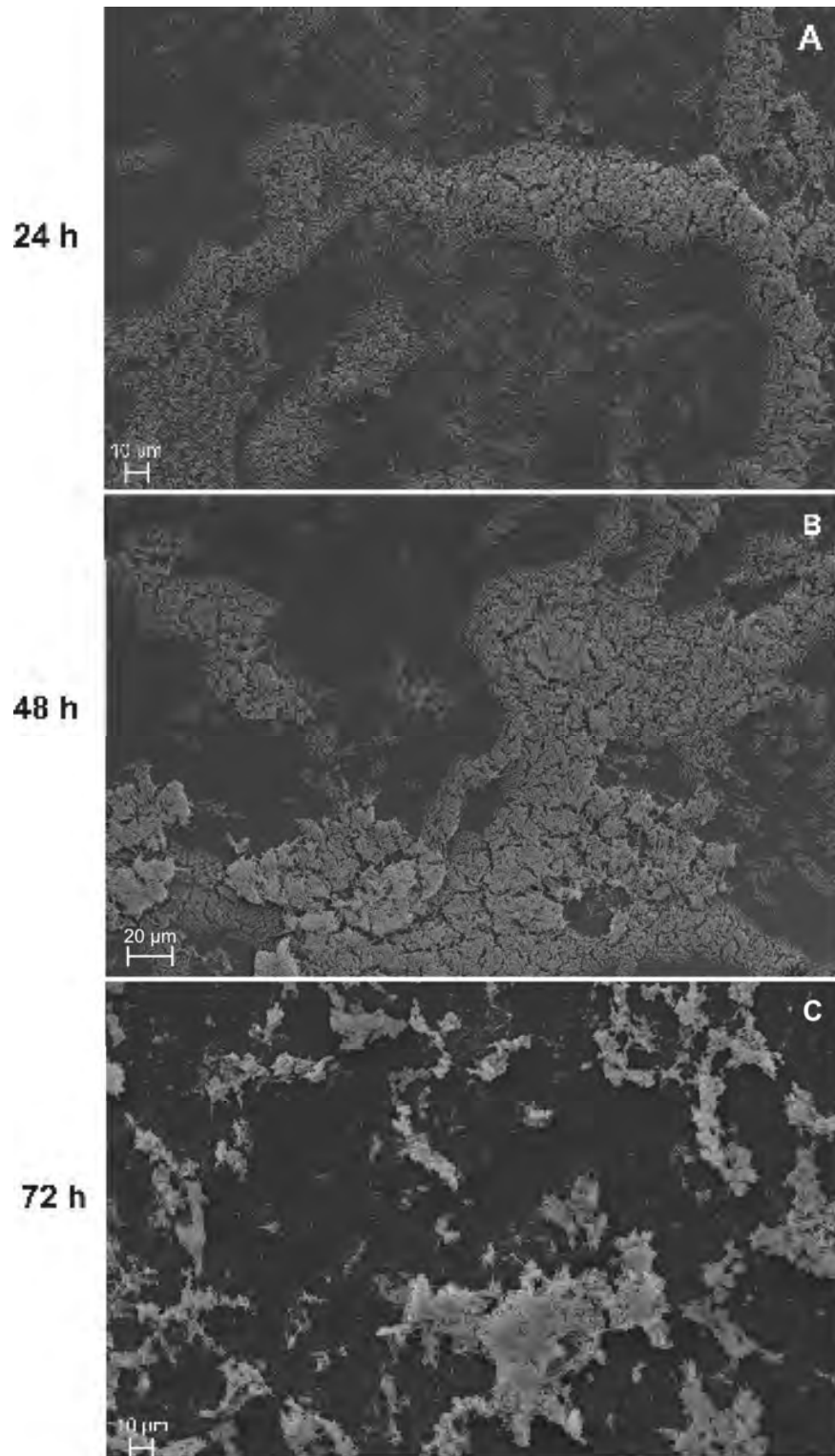
**Figura 5.** Porcentagem de crescimento bacteriano (A) e degradação do biofilme de 24 h (B) em relação ao tratamento controle (100%) após 24 h de exposição a diferentes títulos de fago ( $10^9$  a  $10^0$  UFP/mL) (concentração final). Resultados expressos em média  $\pm$  SEM. Asteriscos denotam diferença significativa em relação ao controle (\*\*\*)  $P \leq 0,001$ ; \*\*  $P \leq 0,01$  e \*  $P \leq 0,05$ ).

### 4.3. Análises microscópicas

#### 4.3.1. Avaliação do tempo sobre a formação de biofilme

As imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) evidenciaram a morfologia do biofilme de *E. coli* 30 após 24, 48 e 72 h de tratamento. A maior formação de biofilme ocorreu nos tempos de 24 e 48 h (Fig.

6A-B) com recobrimento de grande parte da superfície. Por outro lado, no tempo de 72 h foi observada redução do biofilme com presença de maior área livre.



**Figura 6.** Micrografias eletrônicas de varredura de biofilmes de *E. coli* 30 formados após 24, 48 e 72 h de tratamento. (n=3)

#### **4.3.2. Avaliação do efeito do bacteriófago na prevenção da formação do biofilme por MEV**

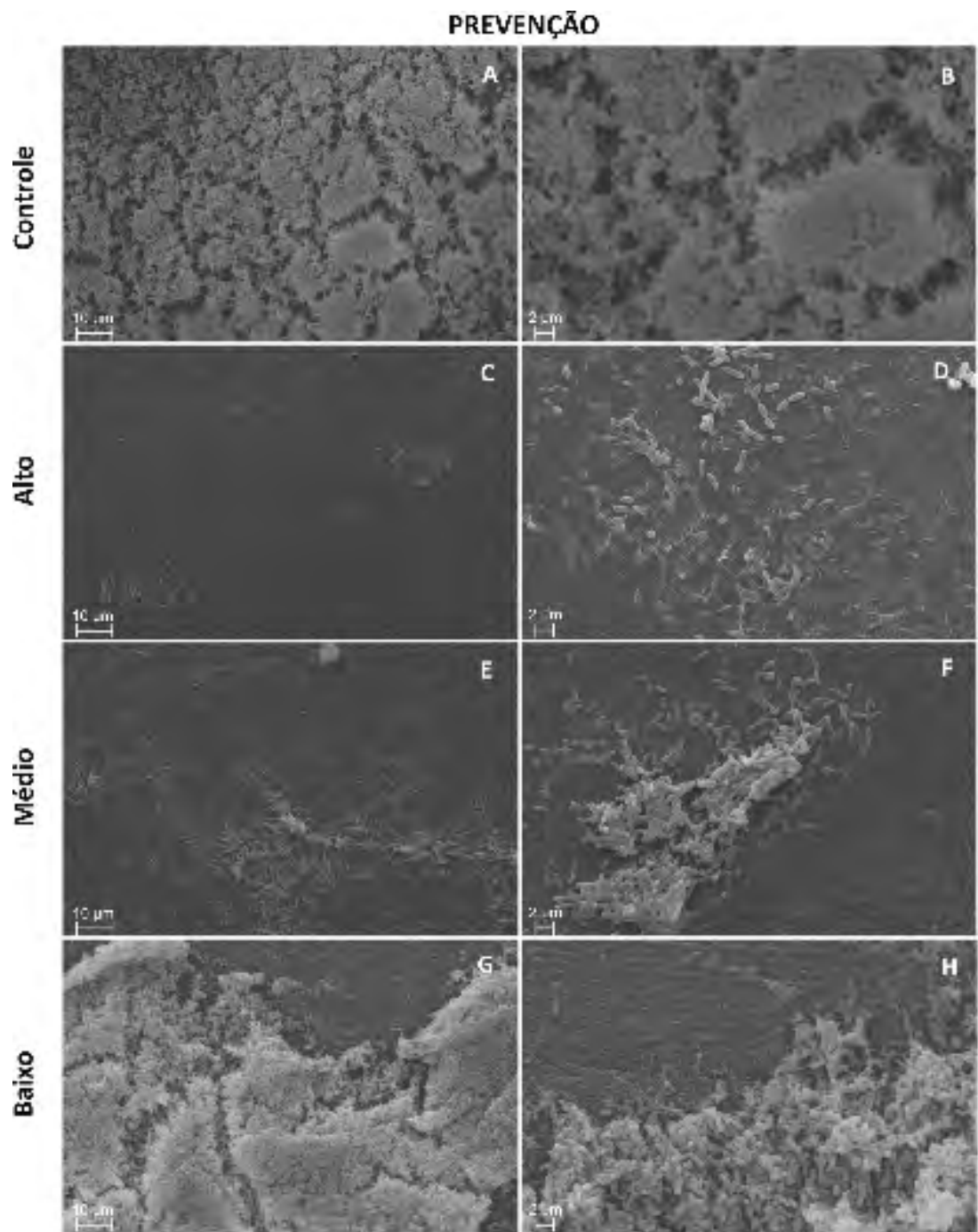
A MEV confirmou o efeito do fago na prevenção da formação do biofilme pela *E. coli* 30 após 24 h de tratamento (Fig. 7). No tratamento controle (sem fago; Fig.7A-B) a formação de biofilme foi máxima com presença de vários agrupamentos com bactérias fortemente aderidas.

A incubação da cepa bacteriana com alto (Fig. 7C-D) e médio título (Fig. 7E-F) de fago reduziu a formação de biofilme de forma dose-dependente. Na presença de alto título foram observadas células isoladas, enquanto na presença de médio título foram observados pequenos agrupamentos bacterianos. Ambos os tratamentos exibiram restos celulares provenientes da lise das bactérias. Em baixo título de fago (Fig. 7G-H), a formação de biofilme apresentou certa similaridade com o controle, sendo observadas regiões de lise superficial e presença de restos celulares na vizinhança do biofilme.

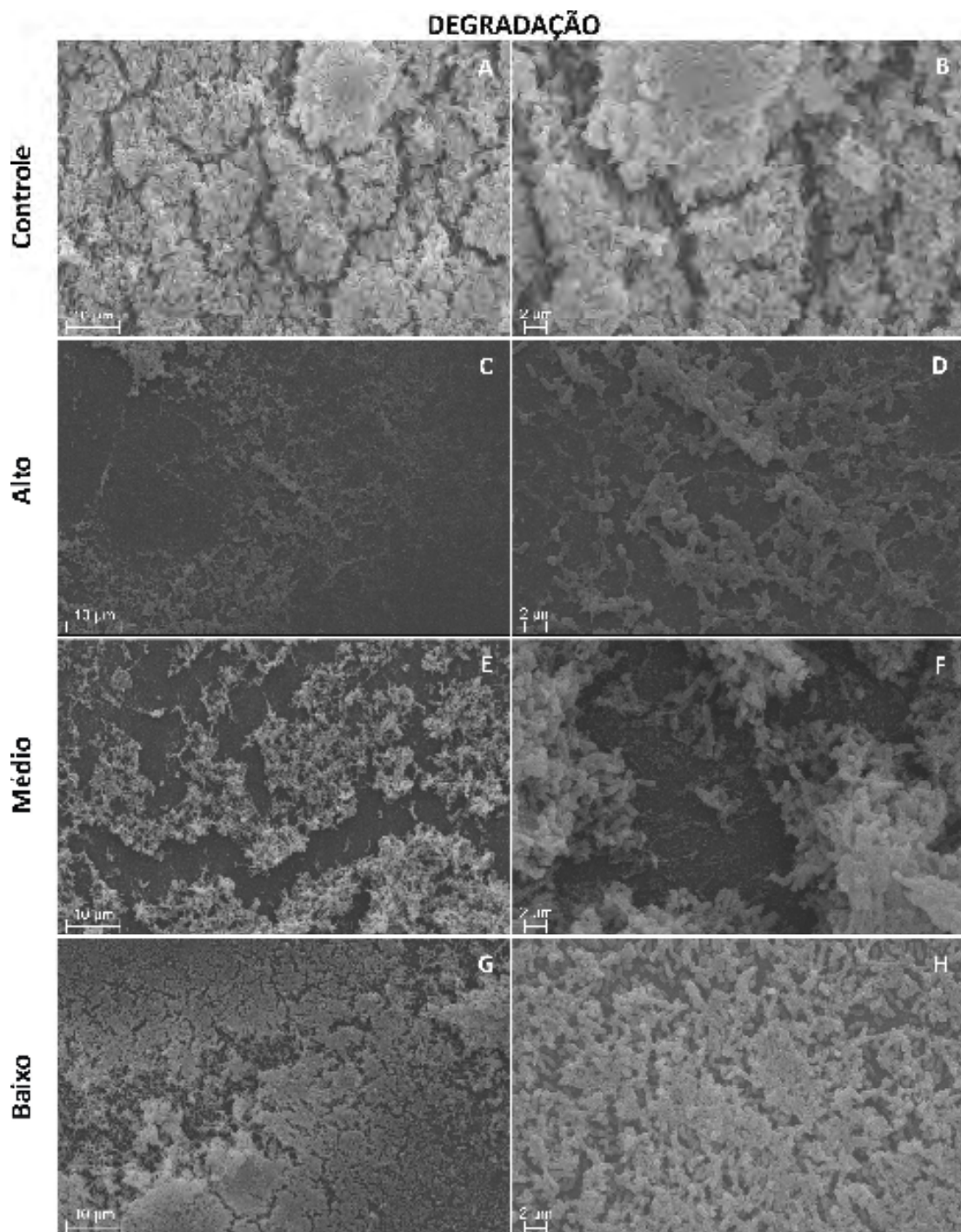
#### **4.3.3. Avaliação do efeito do bacteriófago na degradação do biofilme por MEV**

A MEV dos biofilmes formados após 24 h e expostos a diferentes títulos de fago pelo mesmo tempo encontra-se na Fig. 8. O tratamento do biofilme com alto (Fig. 8C-D) e médio (Fig. 8E-F) título de fago demonstrou lise celular e destruição da arquitetura do biofilme comparado ao biofilme não tratado crescido em condições idênticas (Fig. 8A-B). A degradação do biofilme foi dose-dependente, sendo observado na presença alto título pequenos agrupamentos bacterianos e células isoladas, enquanto na presença de médio título foram observados agrupamentos celulares maiores. Ambos os tratamentos exibiram restos celulares provenientes da lise das bactérias. Por outro lado, na presença do menor título viral (Fig. 8G-H), o biofilme manteve-se praticamente íntegro, exibindo apenas regiões com lise superficial de células.





**Figura 7.** Micrografias eletrônicas de varredura de biofilmes de *E. coli* 30 formados após 24 h de tratamento na ausência de fago (A-B) e com fago em diferentes títulos: ALTO:  $10^9$  (C-D), MÉDIO:  $10^4$  (E-F) e BAIXO:  $10^1$  (G-H) UFP/mL (concentração final). A, C, E e G menor aumento e B,D, F e H maior aumento. (n=3)

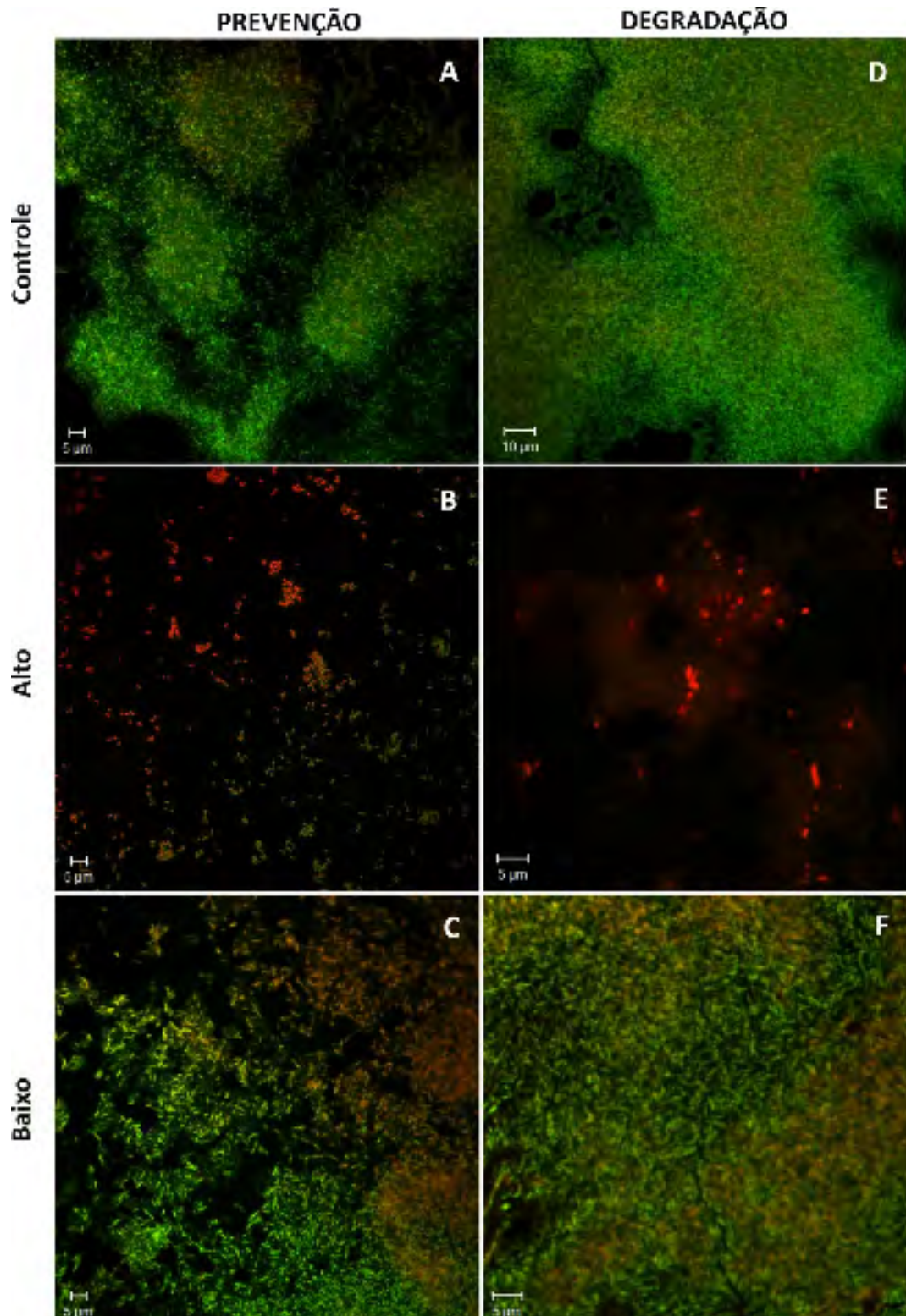


**Figura 8.** Micrografias eletrônicas de varredura de biofilmes de *E. coli* 30 controle (A-B) e tratados com diferentes títulos de fago: alto:  $10^9$  (C-D), médio:  $10^4$  (E-F) e baixo:  $10^1$  (G-H) UFP/mL (concentração final). Os cupons foram incubados com o fago por 24 h após mesmo tempo de formação do biofilme. A, C, E e G menor aumento e B,D, F e H maior aumento. (n=3)

#### **4.3.4. Avaliação do efeito do bacteriófago na prevenção da formação e degradação do biofilme por microscopia confocal**

Imagens obtidas por microscopia confocal evidenciaram resultados semelhantes aos encontrados por MEV. O biofilme formado na ausência de fago (controle) exibiu agrupamentos celulares com predomínio de células viáveis (coloração esverdeada) (Fig. 9A). A incubação da *E. coli* 30 com alto título de fago inibiu a formação de biofilme, resultando na presença de pequenos grupos de células e células isoladas, viáveis e mortas (coloração avermelhada) (Fig. 9B). Por outro lado, a incubação com baixo título de fago não preveniu a formação do biofilme se comparado ao controle, embora apresente um maior número de células mortas (Fig. 9C).

No ensaio de degradação o crescimento da *E. coli* 30 na ausência de fago resultou em biofilme complexo com predomínio de células viáveis (Fig. 9D). O tratamento do biofilme com alto título de fago resultou em degradação do biofilme com predomínio de células mortas e restos celulares (Fig. 9E). Já o tratamento com baixo título não teve efeito notável sobre o biofilme (Fig. 9F).



**Figura 9.** Micrografias obtidas em microscópio confocal de biofilmes obtidos nos experimentos de prevenção da formação (A-C) e de degradação (D-F) do biofilme de *E. coli* 30. Controles (sem fago): A e D e título viral ALTO:  $10^9$  (B e E) e BAIXO:  $10^1$  (C e F) UFP/mL (concentração final). (n=2)

## 5. DISCUSSÃO

A maioria das bactérias é capaz de aderir a superfícies formando agregados conhecidos como biofilmes (MERRIT et al., 2011). O crescimento do biofilme pode ocorrer, naturalmente, em superfícies abióticas (materiais inertes) ou bióticas (tecidos e células) sendo encontrados na interface líquido-ar, líquido-líquido, sólido-líquido e sólido-ar (MARTÍ et al., 2011, WOOD, et al.; 2011). Em geral, biofilmes formados em substratos (poços de microplacas de poliestireno, por exemplo) em contato com líquido encontram-se na interface sólido-líquido ou líquido-ar. Em nosso trabalho, a formação do biofilme de *E. coli* 30 ocorreu na interface líquido-ar. O crescimento do biofilme nesta região pode ter sido determinado por características da bactéria, dentre elas a mobilidade, conferida por estruturas locomotoras (flagelos), e a preferência em crescer na presença de oxigênio; além das condições de crescimento, em especial o meio de cultura utilizado (LB). Trabalhos têm mostrado que micro-organismos móveis e/ou aeróbios podem formar biofilmes na interface líquido-ar e/ou sólido-líquido, enquanto micro-organismos imóveis e anaeróbios, em geral, formam biofilmes na interface sólido-líquido (DANESE et al., 2000; CARSON et al., 2010; O'TOOLE, 2011). Carson et al. (2010) mostraram que *E. coli* crescida em meio mínimo formou biofilme em toda superfície (interface sólido-líquido), enquanto em meio LB, o biofilme foi limitado a interface líquido-ar.

Diversas técnicas experimentais têm sido utilizadas para estudar a formação dos biofilmes *in vitro*. Para a quantificação do biofilme é indispensável à utilização de técnicas sensíveis, específicas e reprodutíveis. Em nosso estudo foi utilizado o ensaio colorimétrico com cristal violeta (CV) em microplacas de poliestireno. Esta metodologia vem sendo utilizada por vários autores devido à simplicidade, reprodutibilidade e sensibilidade (SULE et al., 2009; CARSON et al., 2010; KELLY et al., 2011; MERRITT et al., 2011; O'TOOLE et al., 2011; CHIBEU et al., 2012). Por ser um corante básico, o CV é capaz de se ligar a moléculas da superfície bacteriana carregadas negativamente e a polissacarídeos da matriz extracelular (LI et al., 2003), corando células vivas, células mortas e a matriz polissacarídica do biofilme (SULE et al., 2009).

O tempo necessário para a formação de biofilme varia entre espécies e até entre cepas de uma mesma espécie. Após 24 h de incubação foi possível detectar a formação de biofilme pela *E. coli* 30. Trabalhando com *E. coli* e com outras espécies microbianas, Danese et al. (2000), Burton et al. (2007) e Kay et al. (2011) também evidenciaram crescimento de biofilme após 24 h de incubação. Além disso, a quantidade de biofilme formado variou com o tempo e a redução encontrada no tempo de 72 h pode estar associada ao decréscimo na disponibilidade de nutrientes (SILLANKORVA et al., 2008), ausência de aeração (O'TOOLE, 2001; CHAN et al., 2007) resultando no desprendimento de partes do biofilme da superfície (Fig. 6C). Sillankorva et al. (2008), trabalhando com *Pseudomonas fluorescens*, observaram que após renovação periódica do meio de crescimento houve aumento na formação de biofilme com o tempo. Autores têm sugerido que o aparecimento de condições desfavoráveis, como o esgotamento de nutrientes e o acúmulo de metabólitos, pode induzir alterações fisiológicas nas bactérias, com aumento na produção de enzimas, tais como: proteases, dispersina B e DNAses, que permitem a bactéria deixar o estado sésil e assumir o estilo de vida planctônico, de modo a buscar um ambiente mais favorável (FEY, 2010; NIJLAND, et al., 2010; BOLES e HORSWILL, 2011).

A morfologia das células nos biofilmes é diversificada. Fatores relacionados a condições de crescimento, como meio de cultura, temperatura, agitação e tempo, além de fatores relacionados ao micro-organismo, como fisiologia e motilidade, interferem na forma dos micro-organismos (DANESE et al., 2000; FLEMMING e WINGENDER, 2010; O'TOOLE, 2011). As células de *E. coli* 30 encontradas nos biofilmes com 24, 48 e 72 horas apresentaram-se, predominantemente, como bastonetes provavelmente devido às condições estáticas de crescimento e ao meio de cultura utilizado. Consistente com este resultado, estudos têm mostrado que biofilmes crescidos sob condições estáticas e/ou em meio de rico em nutrientes (LB, por exemplo) apresentam células, predominantemente, na forma de bastonetes, enquanto aqueles crescidos sob agitação (aeração mais eficiente), apresentam principalmente células filamentosas (SILLANKORVA et al., 2008; YOON et al., 2011).

Devido ao grande impacto nas atividades humanas, o interesse no desenvolvimento de medidas eficazes para evitar a formação, bem como degradar



biofilmes formados, tem aumentado. Idealmente a prevenção é uma estratégia mais coerente, entretanto, as técnicas desenvolvidas até o momento não têm fornecido resultados satisfatórios (EUN e WEIBEL, 2009; SIMÕES et al., 2010; LÓPEZ et al., 2011).

Consistente com este trabalho, resultados prévios têm demonstrado que fagos são capazes de lisar células no interior de biofilmes bacterianos (SHARMA et al., 2005; SILLANKORVA et al., 2008; CARSON et al., 2010; SILLANKORVA et al., 2011) diferente da maioria dos antibióticos (STEWART et al., 2004; STEWART e FRANKLIN, 2008; HALL-STOODLEY e STOODLEY, 2009). Além disso, fagos têm sido considerados seguros para uso humano e são altamente específicos (FLAHERTY et al., 2009; CARSON et al., 2010; LOC-CARRILO e ABEDON, 2011; AHMED et al., 2012). Resultados de sucesso na prevenção (CURTIN e DONLAN, 2006; FU et al., 2010) e tratamento de infecções em humanos e animais têm sido documentados (SULAKVEDIZE et al., 2001; SILLANKORVA et al., 2004).

Neste trabalho praticamente todas as concentrações do bacteriófago Ecofago 017 reduziram o crescimento bacteriano e a quantidade de biofilme, entretanto não foi visualizada eficiência de 100%. Isto pode ser explicado pelas condições experimentais incluindo ausência de agitação e o tempo de incubação com o fago. Sillankorva et al. (2008 e 2011) observaram que, sob condições dinâmicas, os fagos encontram seus hospedeiros mais rápido resultando em maior redução nestes parâmetros. Além disso, sugere-se que maior tempo de contato entre fago e hospedeiro (acima de 24 h) poderia proporcionar melhores resultados, entretanto, trabalhos têm mostrado que maiores tempos de incubação podem resultar em ativação do estado lisogênico, com estabelecimento de equilíbrio entre vírus e bactéria (SHARMA et al., 2005), menor susceptibilidade das bactérias e emergência de cepas resistentes (SUTHERLAND et al., 2004; SILLANKORVA et al., 2008; VIAZIS et al., 2011).

Por outro lado, o efeito do fago sobre o crescimento bacteriano foi maior que o efeito sobre o biofilme. Alguns autores sugerem que células planctônicas (livres), em crescimento exponencial, são mais susceptíveis ao fago e que fago e hospedeiro podem entrar em equilíbrio no interior do biofilme, o que não ocorre na fase planctônica (SUTHERLAND et al., 2004). Sillankorva et al. (2011) e Chibeu et al.

(2012) encontraram resultados semelhantes para cepas de *E. coli* relacionadas a infecções no trato urinário. Entretanto, Sharma et al. (2005) encontraram reduções similares na quantidade de biofilme e de células livres, indicando que a adesão a superfície de poliestireno, nas condições testadas, não proveu proteção adicional contra o fago.

Concentrações de fármacos devem ser suficientes para ter o efeito desejado, porém mínimas para evitar ou reduzir a ocorrência de efeitos indesejados. Altos títulos de fago podem causar ativação do sistema imune (LOC-CARRILO e ABEDON, 2011; PAUL et al., 2011) e resposta inflamatória mediada por endotoxinas presentes nas preparações (RIETSCHEL et al., 1982).

No presente trabalho, a dose mínima capaz de reduzir significativamente o biofilme foi  $10^2$  UFP/mL (Multiplicidade de infecção, MOI, de  $10^{-5}$ ), bem inferior à encontrada na literatura. Isto pode estar relacionado à alta especificidade do Ecofago 017 para a *E. coli* 30 e a duração do ciclo lítico. Estudos anteriores demonstraram que uma MOI entre 1.000 (KUDVA et al., 1999; SHARMA et al., 2005; ABULADZE et al. 2008) e 100.000 vezes (SHARMA et al., 2005) seria necessária para reduzir a população de *E. coli* O157:H7 no biofilme.

No experimento de prevenção, a eficiência do fago pode ser explicada ainda pelo contato simultâneo do fago e da bactéria com a superfície de poliestireno. Nestas condições, o fago causou lise imediata das bactérias livres, inibindo a adesão e, conseqüentemente, a formação de biofilme. Este resultado pode ser confirmado pelas imagens de MEV dos cupons tratados com alto e médio títulos de fago que exibiram predominantemente bactérias isoladas e pequenos grupos celulares, além de pequena quantidade de restos celulares. Resultados de prevenção similares foram obtidos por Viazis et al. (2011) que observaram prevenção da formação de biofilme de *E. coli* O157:H7 em diferentes superfícies, incluindo aço, cerâmica e polietileno, e em diferentes condições de temperatura e tempo.

O efeito do fago sobre o biofilme foi dependente do título usado, entretanto a variação não foi linear. Resultados semelhantes foram encontrados por diversos autores (GUENTER et al., 2009; CARSON et al., 2010; VIAZIS et al., 2010; CHIBEU et al., 2012). Chibeu et al. (2012) observaram redução de até 50% no biofilme de *E. coli*



Can 91 após tratamento com  $10^9$  UFP/mL de fagos isolados do meio ambiente por 24 h.

Os experimentos de degradação sugerem que o Ecofago 017 é capaz de reduzir significativamente biofilmes estabelecidos de *E. coli* 30, indicando sua habilidade em acessar o biofilme e infectar bactérias em seu interior, causando morte celular. Isto foi demonstrado pela redução de até 85% na massa do biofilme após exposição ao fago e pode ser explicado pela baixa quantidade de matriz extracelular (MEC) presente.

Estudos têm mostrado que a quantidade de matriz está relacionada às condições de crescimento, tais como, meio de cultura, tempo e agitação. O crescimento bacteriano em meio rico é acompanhado, em geral, de produção de pequena quantidade de MEC. Biofilmes formados nestas condições aparecem como comunidades microbianas mais frouxas, com presença de poucos aglomerados coesos e sem quantidades significantes de MEC (SUTHERLAND et al., 2004; OH et al., 2007). A formação de um biofilme mais coeso e com maior quantidade de matriz pode ser atribuído à indução de estresse nutricional (PATEL et al., 2011). Oh et al. (2007) demonstraram que biofilmes de *E. coli* crescidos em meio mínimo tiveram morfologia mais complexa com maior concentração de MEC.

A manutenção do crescimento de *E. coli* 30 na fase exponencial durante os 3 dias de experimento, também pode explicar a reduzida produção de MEC. Durante a fase estacionária ( $Abs_{600}$  maior que 1,0), que, em geral, ocorre após o 3º dia de crescimento, tem início a produção de polímeros extracelulares levando a formação de uma camada viscosa sobre a superfície sólida (HUGHES, et al., 1998) e resultando em um biofilme maduro (WATNICK e KOLTER, 2000; CHAN et al., 2007; SUH et al., 2010).

A quantidade de MEC pode estar relacionada ainda a aplicação ou não de agitação. Em geral, pequena quantidade de matriz é visualizada em biofilmes formados em condição estática de crescimento, na qual as células não são supridas com meio e nem aeradas continuamente (MERRIT, et al., 2011; O'TOOLE, 2011).

Além da quantidade de MEC, a morfologia do biofilme pode interferir no acesso do fago ao biofilme. Espaços entre os aglomerados celulares, visualizados por microscopia eletrônica de varredura permitem o acesso do fago à superfície da

bactéria, inclusive em camadas mais profundas (SUTHERLAND et al., 2004). Assim, o fago lisa as bactérias em diferentes camadas levando ao desprendimento de partes do biofilme no meio líquido (SILLANKORVA et al., 2008). Após liberação dos agrupamentos para a fase planctônica, as células destacadas são mais susceptíveis ao ataque do fago.

A eficácia do tratamento de biofilmes estabelecidos com fago pode ser aumentada pela combinação com antimicrobianos (CHIBEU et al., 2012), soluções de limpeza como hipoclorito (SHARMA et al. 2005; SIMÕES et al., 2010; PATEL et al., 2011), mistura de fagos específicos para o patógeno (O'FLYNN et al. 2004, SHARMA et al., 2005; RICHARDS e MELANDER, 2009), aumentando a eficiência dos fagos induzindo-os a expressar, por exemplo, lisinas mais eficientes (O'FLAHERTY et al., 2009; XIONG e LIU, 2010). Tail et al. (2002) obtiveram erradicação completa de biofilmes de *E. cloacae* quando expostos a solução de 3 fagos por 24 horas. Abuladze et al. (2008) encontraram inativação de 99,99% de uma mistura de cepas de *E. coli* O157:H7 sobre lâminas de vidro tratadas com alto título de uma mistura de 3 fagos ( $10^{10}$  UFP/mL).

A microscopia confocal é presentemente o método de eleição para a observação dos biofilmes, pois permite analisá-los no estado hidratado. As imagens obtidas em microscopia confocal confirmam os resultados quantitativos. No ensaio de viabilidade celular, o IP penetra apenas em células mortas, enquanto o FITC penetra em todas as células, de modo que células mortas apresentaram coloração avermelhada ou amarelada e células vivas (viáveis) apresentaram coloração esverdeada (DONLAN, 2002; CARSON et al., 2010; WANG et al. 2012). Os controles exibiram um equilíbrio natural entre células vivas e células mortas dentro do biofilme. Por outro lado, poucas bactérias fluorescentes podem ser vistas nos cupons tratados com alto título de fago confirmando a significativa prevenção da formação do biofilme e degradação do biofilme formado. Carson et al. (2010) encontraram resultados semelhantes na prevenção da formação de biofilmes na superfície de cateteres revestida com fagos. Resultados semelhantes também foram observados Curtin e Donlan (2006) e Fu et al. (2010).

Transpor os resultados obtidos *in vitro* para *in vivo* requer avaliações em modelos animais, seguidos por triagens clínicas para segurança e eficácia nos

pacientes. Testes de segurança em humanos ainda não são frequentes (O'FLAHERTY et al., 2009), porém alguns experimentos já tem se mostrado seguros como a administração por via oral de fago T4 (BRUTTIN e BRUSSOW, 2005) e o uso de preparações tópicas (FORTUNA et al., 2008) que não produziram reações adversas. Os resultados sugerem que o Ecofago 017 pode ser usado tanto para reduzir a fixação bacteriana quanto para lisar células associadas a biofilmes de *E. coli*, gerando potenciais aplicabilidades biotecnológicas para este fago.

## 6. CONCLUSÕES

- \* O ensaio colorimétrico em microplacas de poliestireno é um método simples sensível e reprodutível para a quantificação de biofilmes;
- \* As análises microscópicas permitiram analisar a morfologia dos biofilmes;
- \* O Ecofago 017 foi capaz de prevenir a formação de biofilme e degradar biofilmes já estabelecidos de *E. coli* em concentrações equivalentes a  $10^{-5}$  MOI;
- \* O Ecofago 017 demonstrou nas condições testadas que pode ser útil no biocontrole de *E. coli*.

## 7. REFERÊNCIAS

- ABDI-ALI, A., MOHAMMADI-MEHR, M., AGHA ALEI, Y. Bactericidal activity of various antibiotics against biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa*. **Int. J. Antimicrob. Agents**, 27:196-200, 2006.
- ABEE, T.; KOVÁCS, Á.T.; KUIPERS, O.P.; VEEN, S.V.D. Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, 22:172–179, 2011.
- ABULADZE, T., LI, M., MENETREZ, M. Y., DEAN, T., SENECA, A., SULAKVELIDZE, A. Bacteriophages reduce experimental contamination of hard surfaces, tomato, spinach, broccoli, and ground beef by *Escherichia coli* O157:H7. **Applied and Environmental Microbiology**, 74:6230-6238, 2008.
- AHEARN, D. G., GRACE, D. T., JENNINGS, M. J., BORAZJANI, R. N., BOLES, K. J., ROSE, L. J., SIMMONS, R. B., AHANOTU, E. N. Effects of hydrogel/silver coatings in in vitro adhesion to catheters of bacteria associated with urinary tract infections. **Curr. Microbiol.** 41:120-125, 2000.
- AHMED, K., KADERBHAI, N. N., KADERBHAI, M. A. Bacteriophage therapy revisited. **African Journal of Microbiology Research**, 6:3366-3379, 2012.
- ANDERSON, G.G.; O'TOOLE, G.A. Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms in *Bacterial Biofilms* (ed. Romeo T.). **Current Topics in Microbiology and Immunology**, 332: 85–105, 2008.
- BELOIN, C.; ROUX, A.; GHIGO, J-M. *Escherichia coli* Biofilms. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, 322:249-289, 2008.
- BENDINGER, B.; RIJNAARTS, H., H., M.; ALTENDORF, K.; ZEHNDER, A. J. B. Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids. **Appl. Environ. Microbiol.**, 59:3973–3977, 1993.

- BOLES, B. R., HORSWILL, A. R. Staphylococcal biofilm disassembly. **Cell Trends in Microbiology**, 19:449-455, 2011.
- BRADLEY, A. J., GREEN, M. J. Factors affecting cure when treating bovine clinical mastitis with cephalosporin-based intramammary preparations. **Journal of Dairy Science**, 92: 1941-1953, 2009.
- BREYERS, J.D.; RATNER, J.P; Bioinspired implant materials befuddle bacteria. **ASM News**, 70:232–237, 2004.
- BRUTTIN A & BRUSSOW H. Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: a safety test of phage therapy. **Antimicrob. Agents Ch.**, 49: 2874–2878, 2005.
- BURTON, E., YAKANDAWALA, N., LO VETRI, K., MADHYASTHA, M. S. A microplate spectrofluorometric assay for bacterial biofilms. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol**, 34:1-4, 2007.
- CALISH, V. L., KIPNIS, T. L., MARIANO, M., NETO, C. F., DIAS DA SILVA, W. D. The activation of the complement system by *Paracoccidioides brasiliensis in vitro*: its opsonic effect and possible significance for an *in vivo* model of infection. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, 12: 21-30, 1979
- CAMPBELL, A. The future of bacteriophage biology. **Nat. Rev. Genet.**, 4:471–477, 2003.
- CARRILLO, L. C., ATTERBURY, R. J., EL-SHIBINY, A., CONNERTON, P. L., DILLON. E., SCOTT, A., CONNERTON, I. F. Bacteriophage Therapy To Reduce *Campylobacter jejuni* Colonization of Broiler Chickens. **Applied and Environmental Microbiology**, 71: 6554–6563, 2005.
- CARSON, L.; GORMAN, S.P.; GILMORE, B.F. The use of lytic bacteriophages in the prevention and eradication of biofilms of *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli*. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, 59:447–455, 2010.

- CHAN, T., LEE, K., ROULIN, P. Escherichia coli Biofilm Development and Bacteriophage T4 Susceptibility. **Journal of Experimental Microbiology and Immunology**, 11:73-80, 2007.
- CHANETON, L., TIRANTE, L., MAITO, J. Relationship between milk lactoferrin and etiological agente in the mastitic bovine mammaty gland. **J. DAIRY SCIENCE**, 91:1865-1873, 2008.
- CHARACKLIS, W.G. Biofilm processes. In: Characklis, W.G.; Marshall, K.C. editors. **Biofilms**. New York: John Wiley & Sons. 195–231, 1990.
- CHIBEU, A., LINGOHR, E. J., MASSON, L., MANGES, A., HAREL, J., ACKERMANN, H-W., KROPINSKI, A. M., BOERLIN, P. Bacteriophages with ability to degrade Uropathogenic Escherichia coli biofilms. **Viruses**, 4: 471-487, 2012.
- CROXEN, M. A., FINLAY, B; B. Molecular Mechanisms of Escherichia coli pathogenicity. **Nature Review Microbiology**, 8:26-38. 2010
- CURTIN, J.J.; DONLAN, R.M. Using bacteriophages to reduce formation of catheter-associated biofilms by *Staphylococcus epidermidis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 50, 1268–1275, 2006.
- D'HERELLE, F. Bacteriophage as a treatment in acute medical and surgical infections. **Bull. N. Y. Acad. Med.**, 7:329–348, 1931.
- DANESE, P. N., PRATT, L. A., KOLTER, D. R. The outer membrane protein, Antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms. **Molecular Microbiology**, 37:424-432, 2000.
- DANESE, P.N.; PRATT, L.A.; KOLTER, R.J. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. **Bacteriol.**, 182:3593–3596, 2000.
- DAVEY, M.E.; O'TOOLE, G.A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, 64:847–867, 2000.

- DONLAN R. M. Role of biofilms in antimicrobial resistance. **ASAIO J.**, 46:S47–S52, 2000.
- DONLAN, R.M. Biofilms and Device-Associated Infections. **Emerging Infectious Diseases**, 7:277-281, 2001.
- DONLAN, R.M. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, 8:881-890, 2002.
- DONLAN, R.M. Preventing biofilms of clinically relevant organisms using Bacteriophage. **Trends in Microbiology**, 17:66-72, 2009.
- DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin. Microbiol. Rev.**, 15:167–193, 2002.
- EUN, Y-J.; WEIBEL, D.B. Fabrication of Microbial Biofilm Arrays by Geometric Control of Cell Adhesion. **Langmuir**, 25:4643–4654, 2009.
- EVANS, D.J.; BROWN, M.R.W.; GILBERT. P. Susceptibility of bacterial biofilms to tobramycin: role of specific growth rate and phase in the division cycle. **J. Antimicrob. Chemother.**, 25:585–591, 1990.
- FEY, P. D. Modality of bacterial growth presents unique targets: how do we treat biofilm-mediated infections? **Current opinion in Microbiology**, 13:610–615, 2010.
- FLEMMING, H-C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nat. Rev. Microbiol.**; 8:623–633, 2010.
- FLINT, J., PALMER, P.; BREMER, B., SEALE, J., BROOKS, D., LINDSAY, S. B. Biofilm formation. **Encyclopedia of Dairy Sciences**, 445-450, 2011.
- FORTUNA, W., MIEDZYPBRODZKI, R., WEBER-DABROWSKA, B., GORSKI, A. Bacteriophage therapy in children: facts and prospects. **Med Sci Monitor** 14: RA126–RA132, 2008.



- FU, W., FOSTER, T., MAYER, O., CURTIN, J. J., LEHMAN, L. M., DONLAN, R. M. Bacteriophage cocktail for the prevention of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* on catheters in an in vitro model system. **Antimicrob. Agents Chemoter**, 54:397-404, 2010.
- FUX, C.A.; COSTERTON, J.W.; STEWART, P.S.; STOODLEY, P. Survival strategies of infectious biofilms. **Trends in Microbiology**, 13:34–40, 2005.
- GOLDMAN, G.; STAROSVETSKY, J.; ARMON, R. Inhibition of biofilm formation on UF membrane by use of specific bacteriophages. **Journal of Membrane Science**, 342:145–152, 2009.
- GORSKI, A.; WEBER-DABROWSKA, B. The potential role of endogenous bacteriophages in controlling invading pathogens. **Cell. Mol. Life Sci.**, 62:511–519, 2005.
- GUENTER, S., HUWYLER, D., RICHARD, S., LOESSNER, M. J. Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. **Applied and Environmental Microbiology**, 75:93-100, 2009.
- HALL-STOODLEY, L.; STOODLEY, P. Evolving concepts in biofilm infections. **Cell. Microbiol.**, 11:1034–1043, 2009.
- HANLON, G.W.. DENYER, S.P.; OLLIFF, C.J.; IBRAHIM, L.J. Reduction of exopolysaccharide viscosity as an aid to bacteriophage penetration through *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Appl. Environ. Microbiol.**, 67:2746–2753, 2001.
- HAUSNER, M.; WUERTZ, S. High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis. **Appl. Environ. Microbiol.**, 65:3710–3713, 1999.
- HOLT, J.G. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.

- HOYLE, B.D.; COSTERTON, W.J. Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. **Prog. Durg. Res.**, 37:91–105, 1991.
- HUGHES, K.A., SUTHERLAND, I. W., JONES, M. J. Biofilm susceptibility to bacteriophage attack: the role of phage-borne polysaccharide depolymerase. **Microbiology**, 144:3039-3047, 1998.
- IYAMBA, J.M.L.; SEIL, M.; DEVLEESCHOUWER, M.; KIKUNI, N.B.T.; DEHAYE, J.P. Study of the formation of a biofilm by clinical strains of *Staphylococcus aureus*. **Biofouling**, 27:811–821, 2011.
- IZUTANI N., IMAZATO S., NAKAJO K., TAKAHASHI N., TAKAHASHI Y., EBISU S., RUSSELL R. R. B. Effects of the antibacterial monomer 12-methacryloyloxydodecylpyridinium bromide (MDPB) on bacterial viability and metabolism. **European Journal of Oral Sciences**. 119: 175-181, 2011.
- JURCISEK, J. A., DICKSON, A. C., BRUGGEMAN, M. E., BAKALETZ, L. O. *In vitro* Biofilm Formation in an 8-well Chamber Slice. **Journal of Visualized Experiments**, 47:1-2, 2011.
- KANNAN, S., AUDET, A., HUANG, H., CHEN, L-J., WU, M. Cholesterol-Rich Membrane Rafts and Lyn Are Involved in Phagocytosis during *Pseudomonas aeruginosa* Infection. **The Journal of Immunology**, 180:2396-2408, 2012.
- KAPER, J. B., NATARO, J. P., MOBLEY, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, 2:123-140, 2008.
- KAPLAN, J.B. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. **J. Dent. Res.**, 89:205–218, 2010.
- KARATAN, E.; WATNICK, P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, 73:310–347, 2009.
- KAY, M.K.; ERWIN, T.C.; MCLEAN, R. J.C.; ARON, G.M. Bacteriophage Ecology in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* Mixed-Biofilm Communities. **Applied and Environmental Microbiology**, 77:821–829, 2011.

- KELLY, D., MCAULIFFE, O., ROSS, R. P., COFFEY, A. Prevention of *Staphylococcus aureus* biofilm formation and reduction in established biofilm density using a combination of phage K and modified derivatives. **Letters in Applied Microbiology**, 54:286-291, 2012.
- KERKSIEK, K. A life in slime-biofilms rule the world. **Infection Research (Perspectives)**, 1-8, 2008.
- KIELY, P.D.; CALL, D.F.; YATES, M.D.; REGAN, J.M.; LOGAN, B.E. Anodic biofilms in microbial fuel cells harbor low numbers of higher-power-producing bacteria than abundant genera. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 88:371–380, 2010.
- KRETH, J.; ZHANG, Y.; HERZBERG, M.C. Streptococcal antagonism in oral biofilms: *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii* interference with *Streptococcus mutans*. **J. Bacteriol.**, 190:4632–4640, 2008.
- KUDVA, I. T., JELACIC, S., TARR, P. I., YOUNDERIAN, P., HOVDE, C. J. Biocontrol of *Escherichia coli* O157 with O157-specific bacteriophages. **App. Environ. Microbiol.** 65-3767-3773, 1999.
- LACROIX-GUEU, P.; BRIANDET, R.; LEVEQUE-FORT, S.; BELLON-FONTAINE, M.N.; FONTAINE-AUPART, M.P. *In situ* measurements of viral particles diffusion inside mucoid biofilms. **C. R. Biol.**, 328,1065–1072, 2005.
- LERICHE, V.; SIBILLE, P.; CARPENTIER, B. Use of an enzyme-linked lectinsorbent assay to monitor the shift in polysaccharide composition in bacterial biofilms. **Appl Environ Microbiol**, 66:1851–1856, 2000.
- LEWANDOWSKI, Z. Structure and function of biofilms. In: Evans LV, editor. Biofilms: recent advances in their study and control. Amsterdam: **Harwood Academic Publishers**, 1–17, 2000.
- LEWIS, K. Persister cells and the riddle of biofilm survival. **Biochemistry (Mosc)** 70:267–274, 2005.

- LI, X., YAN, Z., XU, J. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. **Microbiology**, 149, 353–362, 2003.
- LÓPEZ, D.; VLAMAKIS, H.; KOLTER, R. Biofilms. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, 2:1-11, 2011.
- MAH, T-F.; O'TOOLE, G.A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in Microbiology**, 9: 34–39, 2001.
- MARTÍ, S., RODRÍGUEZ-BAÑO, J., CATEL-FERREIRA, M., JOUENNE, T., VILA, J., HARALD SEIFERT, H., DÉ, E.. Biofilm formation at the solid-liquid and air-liquid interfaces by *Acinetobacter* species. **BMC Research Notes** 4:1-4, 2011.
- MERRIT, J. H., KADOURI, D. E., O'TOOLE, G. A. Growing and analyzing static biofilms. **Current Protocols in Microbiology**. Supplement 22. 1B.1.1-1B1.18, 2011.
- MONDS, R.D.; O'TOOLE, G.A. The developmental model of microbial biofilms: Ten years of a paradigm up for review. **Trends Microbiol.**, 17:73–87, 2009.
- NIJLAND, R., HALL, M. J., BURGESS, J. G. Dispersal of Biofilms by Secreted, Matrix Degrading, Bacterial DNase. **PlosOne**, 5:1-7, 2010
- NORRBY S.R.; NORDM, C.E.; FINCH, R. Lack of development of new antimicrobial drugs: a potential serious threat to public health. **Lancet. Infect. Dis.**, 5:115–119, 2005.
- O'FLAHERTY, S.; ROSS, R.P.; COFFEY, A. Bacteriophage and their lysins for elimination of infectious bacteria. **FEMS Microbiol. Rev.**, 33:801–819, 2009.
- O'TOOLE, G., KAPLAN, H. B., KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **ANNU. REV. MICROBIOL**, 54:49-79, 2000.
- O'TOOLE, G. A. Microtiter dish biofilm formation assay. **Journal of Visualized Experiments**, 47:1-2, 2011.

- OH, Y.J.; JO, W.; YANG, Y.; PARK, S. Influence of culture conditions on *Escherichia coli* O157:H7 biofilm formation by atomic force microscopy. **Ultramicroscopy**, 107:869–874, 2007.
- PAI, A.; TANOUCHI, Y.; COLLINS, C.H.; YOU, L. Engineering multicellular systems by cell-cell communication. **Curr. Opin. Biotechnol.**, 20:461–470, 2009.
- PARK, A. -I., DAESCHEL, M.A., ZHAO, Y. Functional properties of antimicrobial lysozyme-chitosan composite films. **Journal of Food Safety**, 69:215-221, 2004.
- PATEL, J.; SHARMA, M.; MILLNER, P.; CALAWAY, T.; SINGH, M. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 Attached to Spinach Harvester Blade Using Bacteriophage. **Foodborn Pathogens and Disease**, 8:541-546, 2011.
- PAUL, V. D., SUNDARRAJAN, S., RAJAGOPALAN, S. S., HARIHARAN, S., KEMPASHANAIAH, S., PADMANABHAN, S., SRIRAM, B., RAMACHANDRAN, J. Lysis-deficient phages as novel therapeutic agents for controlling bacterial infection. **BMC Microbiology**, 11: 1-9, 2011.
- PROSSER, B.L.T.; TAYLOR, D.; DIX, B. A.; CLEELAND, R. Method of Evaluating Effects of Antibiotics on Bacterial Biofilm. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 31:1502-1506, 1987.
- RAKHUBA, D. V., KOLOMIETS, E. I., SZWAJECER DEY, E. AND NOVIK, G. I. Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. **Polish Journal of Microbiology**. 59:145-155, 2010.
- RICHARDS, J.J.; MELANDER, C. Controlling bacterial biofilms. **Chembiochem.**, 10:2287-2294, 2009.
- RIETSCHEL, E.T.; SCHADE, U.; JENSEN, M.; WOLLENWEBER, H.W.; LÜDERITZ, O.; GREISMAN; S.G. RIETSCHEL, E.T.H. Bacterial endotoxins: chemical structure, biological activity and role in septicaemia. **Scand. J. Infect. Dis. Suppl.**, 31:8–21, 1982.

- ROSENBERG, M.; KJELLEBERG, S. Hydrophobic interactions in bacterial adhesion. **Advances in Microbial Ecology**, 9:353–93, 1986.
- SAENZ, Y.; BRINAS, L.; DOMINGUEZ, E.; RUIZ, J.; ZARAZAGA, M.; VILA, J.; TORRES, C. Mechanisms of resistance in multipleantibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins. **Antimicrob. Agents. Ch.**, 48:3996–4001, 2004.
- SAMBROOK, J., RUSSEL, D. W. Molecular Cloning. **A Laboratory Manual**. Third Edition. 2001.
- SAUER, K.; RICKARD, A.H.; DAVIES, D.G. Biofilms and biocomplexity. **Microbe.**, 2:347–353, 2007.
- SAWHNEY, R.; BERRY, V. Bacterial biofilm formation, pathogenicity, diagnostics and control: An overview. **Indian Journal of Medical Sciences**, 63: 313-321, 2009.
- SHARMA, M.; RYU, J.H.; BEUCHAT. L.R. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in biofilm on stainless steel by treatment with an alkaline cleaner and a bacteriophage. **Journal of Applied Microbiology**, 99:449–459, 2005.
- SILLANKORVA, S., OLIVEIRA, D. R., VIEIRA, M. J., SUTHERLAND, I. W., AZEREDO, J. Bacteriophage S1 infection of *Pseudomonas fluorescens* planktonic cells versus biofilms. **Biofouling**, 20133-138, 2004.
- SILLANKORVA, S., OLIVEIRA, D., MOURA, A., HENRIQUES, M., FAUSTINO, A., NICOLAU, A., AZEREDO, J. Efficacy of a broad host range lytic bacteriophage against *E. coli* adhered to urothelium. **Curr. Microbiol**, 62:1128-1132, 2011.
- SILLANKORVA, S.; NEUBAUER, P.; AZEREDO, J. *Pseudomonas fluorescens* biofilms subjected to phage phiIBB-PF7A. **BMC Biotechnology**, 8:1-12, 2008.
- SIMÕES, M.; SIMÕES, L.C.; VIEIRA, M.J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **Food Science and Technology**, 43:573–583, 2010.

- SINGH, R.; PAUL, D.; JAIN, R.K. Biofilms: implications in bioremediation. **Trends Microbiol.**, 14:389–397, 2006.
- STEWART, P.S.; FRANKLIN, M.J. Physiological heterogeneity in biofilms. **Nat. Rev. Microbiol.**, 6:199–210, 2008.
- STEWART, P.S.; MUKHERJEE, P. K., GHANNOUM, M. A. Biofilm antimicrobial resistance. In: Ghannoum M., O'Toole, G. A. eds. *Microbial biofilms*. Washington, DC: ASM Press, 250-268, 2004.
- SUH, J.D.; RAMAKRISHNAN, V.; PALMER, J.N. Biofilms. **Otolaryngol. Clin. N. Am.**, 43:521–530, 2010.
- SULAKVELIDZE, A. Bacteriophages as therapeutic agents. **Ann. Med.**, 33:507–509, 2001.
- SULE, P., WADHAWAN, T. CARR, N. J., HORNE, S. M., WOLFE, A. J., PRUB, B. M. A combination of assays reveals biomass differences in biofilms formed by *Escherichia coli* mutants. **Letters in Applied Microbiology**, 49:299-304, 2009.
- SUTHERLAND, I.W. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. **Microbiology**, 147:3–9, 2001.
- SUTHERLAND, I.W. The biofilm matrix - an immobilized but dynamic microbial environment. **Trends in Microbiology**, 9:222–227, 2001.
- SUTHERLAND, I.W., HUGHES, K. A., SKILLMAN, L. C., TAIT, K. The interaction on phage and biofilm. **FEMS Microbiol. Lett.** 232:1-6, 2004.
- SUTTLE, C. A. Marine viruses-major players in the global ecosystem. **Nat. Rev. Microbiol.**, 5:801–810, 2007.
- TSUNEDA, S.; AIKAWA, H.; HAYASHI, H.; YUASA, A.; HIRATA, A. Extracellular polymeric substances responsible for bacterial adhesion onto solid surface. **FEMS Microbiology Letters**, 223:287–292, 2003.

- TUNNEY, M.M.; JONES, D.S.; GORMAN, S.P. Biofilm and biofilm-related encrustation of urinary tract devices. In: Doyle RJ, editor. **Methods in enzymology**, 310:558-66, 1999.
- VIAZIS, S., AKHTAR, M., FEITARG, J., DIEZ-GONZALEZ, F. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 viability on hard surfaces by treatment with a bacteriophage mixture. **International Journal of Food Microbiology**, 145:37-42, 2011.
- WANG, R., NEOH, K. G., SHI, Z., KANG, E-T., TAMBYAH, P.A., CHIONG, E. Inhibition of *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* adhesion and biofilm formation on medical grade silicone surface. **Biotechnology and Bioengineering**, 109:336-345, 2012.
- WATNICK, P.; KOLTER, R. Biofilm, City OF MICROBES. **JOURNAL of Bacteriology**, 182:2675–2679, 2000.
- WEISS-MUSZKAT, M.; SHAKH, D.; ZHOU, Y.; PINTO, R.; BELAUSOV, E.; CHAPMAN, M.R., SELA, S. Biofilm Formation by and Multicellular Behavior of *Escherichia coli* O55:H7, an Atypical Enteropathogenic Strain. **Applied and Environmental Microbiology**, 76:1545–1554, 2010.
- WHITMAN, W.B.; COLEMAN, D.C.; WIEBE, W.J. Prokaryotes: the unseen majority. **P. Natl. Acad. Sci. USA**, 95:6578–6583, 1998.
- WINGENDER, J.; NEU, T.R.; FLEMMING, H.-C. What are bacterial extracellular polymeric substances? In J. Wingender, T. R. Neu, & H.-C. Flemming (Eds.), **Microbial extracellular polymeric substances - Characterization, structure and function**, 1–19, 1999.
- WOOD, T. K.; HONG, S.H.; MA, Q. Engineering biofilm formation and Dispersal. **Trends in Biotechnology**, 29:87-94, 2011.
- XIONG, Y., LIU, Y. Biological control of microbial attachment: a promising alternative for mitigating membrane biofouling. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, 86:825-837, 2010.



YOON, M. Y., LEE, K-M., PARK, Y., YOON, S. S. Contribution of Cell Elongation to the Biofilm Formation of *Pseudomonas aeruginosa* during Anaerobic Respiration. **PlosOne**, 6:1-11, 2011

YOUN, L. J., YOON, J. W, HOVDE, C. J. A Brief Overview of Escherichia coli O157:H7 and Its Plasmid O157. **J. Microbiol. Biotechnol.** 20(1):1-10, 2010.