

Solicitado por:

NBioTech Industria e Comércio Ltda

CNPJ: 48.416.479/0001-78

Responsável: Nilson Cristiano da Cruz

Elaborado por:

Laboratório de Microbiologia Aplicada

Responsável: Iolanda Cristina Silveira Duarte

E-mail: iolanda@ufscar.br

Data: 12 de junho de 2023

**RELATÓRIO DO EQUIPAMENTO DE VISUALIZAÇÃO DE
CONTAMINAÇÕES LOC - LIGHT ON CELLS****1. RESUMO**

A presente análise foi conduzida com o objetivo de avaliar a capacidade de detecção de biofilmes pelo LOC – *Light On Cells*, equipamento de visualizações de contaminações. Para isso, foram utilizadas culturas isoladas do fungo da espécie *Candida albicans* e bactérias das espécies *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. A fim de otimizar as condições de observação, os microrganismos foram cultivados sobre superfície de aço inox. O equipamento possibilitou verificar a formação gradativa de biofilme ao longo do processo de incubação devido à fluorescência e cor características dos microrganismos quando expostos à luz UV. A formação do biofilme foi evidenciada pelo uso do equipamento ao final do período de incubação, sendo possível visualizar a presença de camada opaca na superfície de inox. O equipamento LOC foi capaz de detectar a formação de biofilmes por todos os microrganismos utilizados nesta análise.

2. MATERIAIS E MÉTODOS**2.1. Cultivo de microrganismos**

Com auxílio de alça de inoculação de 10 µL, os isolados de *S. aureus*, *C. albicans*, *E. coli* e *P. aeruginosa* foram transferidos de placas de petri para frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 150 mL de meio de cultura (caldo Brain Heart Infusion/BHI). As culturas foram mantidas sob agitação de 150 rpm e temperatura de 30°C durante 48 horas em shaker Solab SL 223.

2.2. Preparo dos inóculos

A análise de absorbância dos caldos do cultivo foi utilizada como medida de quantificação e padronização dos microrganismos nos ensaios. Os dados de densidade óptica (DO) de cada microrganismos foram obtidos utilizando espectrofotômetro UV-Vis Hach DR 5000 nos comprimentos de onda de 446 nm, 530 nm, 600 nm e 644 nm, respectivamente. A relação entre DO e a quantidade de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) das amostras de *S. aureus*, *C. albicans*, *E. coli* e *P. aeruginosa* foram obtidas com base nos estudos de Pimentel-Filho *et al.*, (2014), Rodriguez-Tudela *et al.*, (2001), Lin *et al.*, (2009) e Živković *et al.*, (2018), respectivamente.

2.3. Crescimento dos microrganismos e formação de biofilmes

Em placas de petri, foram adicionados 15 mL do caldo de cultivo de cada um dos microrganismos. Uma chapa retangular de aço inox previamente esterilizada foi inserida na placa de petri, sendo mantida submersa no meio. O mesmo procedimento foi repetido utilizando diluições do caldo de cultivo nas proporções de 1:2 (v/v) e 1:3 (v/v) e meio BHI fresco foi utilizado como diluente das amostras. As placas foram incubadas a 35°C em incubadora Fanem 502. Após 24 horas, as chapas de inox foram transferidas para novas placas de petri esterilizadas, sem a presença do caldo de cultivo, e foram mantidas a 35°C até o final do período de análise. Após 48 horas de incubação, as chapas de inox foram esfregadas com swab e submetidas à radiação UV a fim de verificar alterações na superfície que seriam indicativas da remoção de biofilme.

3. RESULTADOS

3.1. Densidade óptica das amostras

Na tabela 1, são apresentados os resultados de absorbância das amostras, quantificadas em termos de densidade óptica (DO) para cada uma das culturas de microrganismos.

Tabela 1 – Diluições utilizadas, comprimentos de onda de análise e respectivas absorbâncias dos caldos de cultivos de *S. aureus*, *C. albicans*, *E. coli* e *P. aeruginosa*.

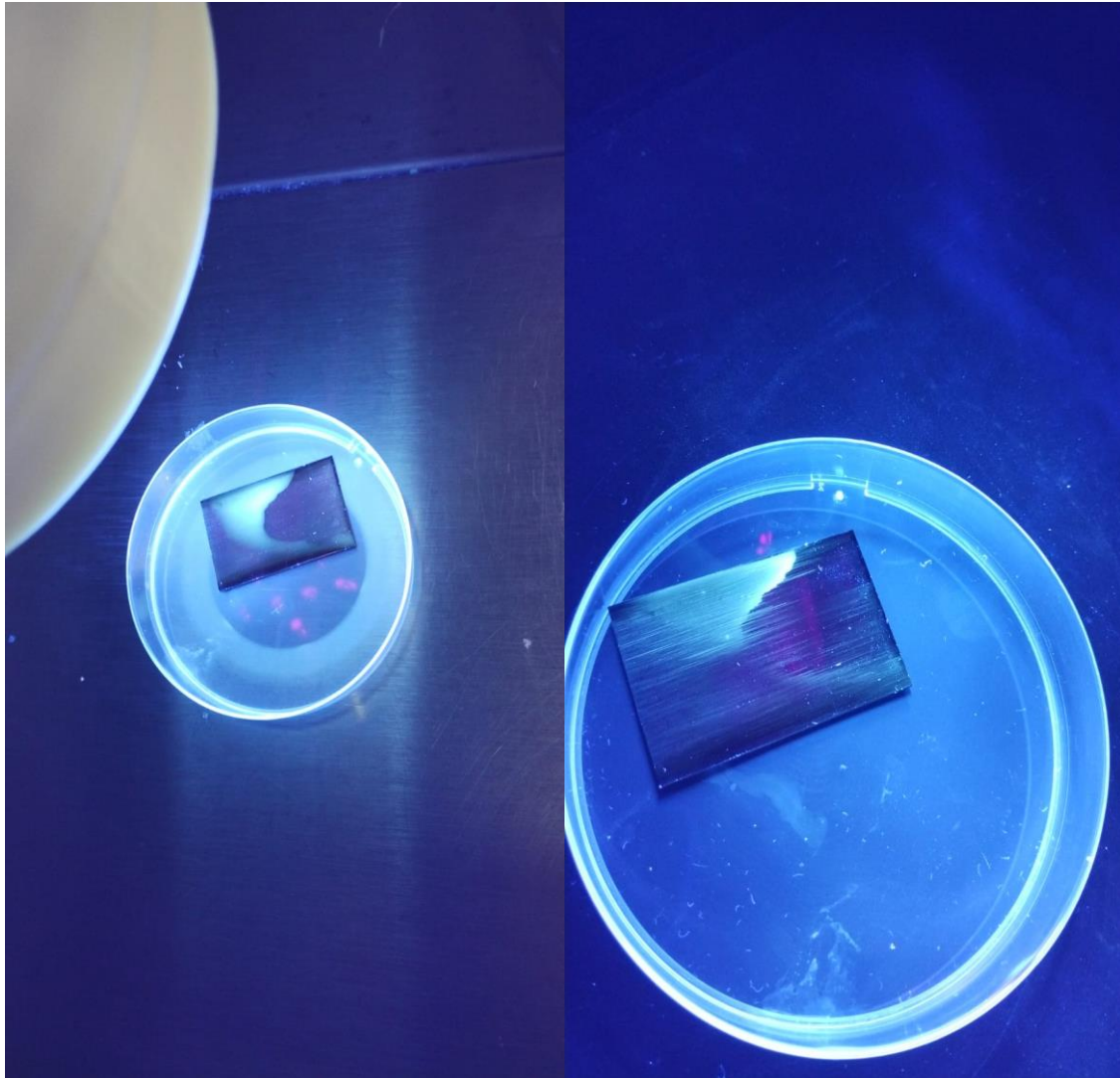
Microrganismo	Diluição (v/v)	Comprimento de Onda (nm)	Absorbância (DO)	UFC/mL
<i>S. aureus</i>	1:1	446	1.093	$\sim 10^5$
<i>S. aureus</i>	1:2		0.702	$\sim 10^5$
<i>S. aureus</i>	1:3		0.476	$\sim 10^4$
<i>C. albicans</i>	1:1	530	1.172	$\sim 10^8$
<i>C. albicans</i>	1:2		0.670	$\sim 10^8$
<i>C. albicans</i>	1:3		0.532	$\sim 10^8$
<i>E. coli</i>	1:1	600	1.229	$\sim 10^8$
<i>E. coli</i>	1:2		0.915	$\sim 10^7$
<i>E. coli</i>	1:3		0.720	$\sim 10^7$
<i>P. aeruginosa</i>	1:1	644	1.504	$\sim 10^8$
<i>P. aeruginosa</i>	1:2		1.208	$\sim 10^8$

DO: Densidade Óptica.

3.2. Crescimento dos microrganismos sobre chapa de inox

A exposição das chapas de aço inox à radiação UV logo após serem removidas do caldo de cultivo evidenciou a presença de camadas contínuas, fluorescentes e de coloração branco-esverdeada nas chapas previamente submersas nas culturas de *E. coli* (Figura 1), *S. aureus* (Figura 2) e *P. aeruginosa* (Figura 3), e de pequenos aglomerados, fluorescentes e de mesma padronagem de cor, cobrindo toda a extensão da superfície da chapa anteriormente submersa na cultura de *C. albicans* (Figura 4).

Figura 1 – Crescimento de *E. coli* sobre chapa de inox após a) 24 horas de incubação e b) 48 horas de incubação.



(a)

(b)

Figura 2 – Crescimento de *S. aureus* sobre chapa de inox após a) 24 horas de incubação e b) 48 horas de incubação.

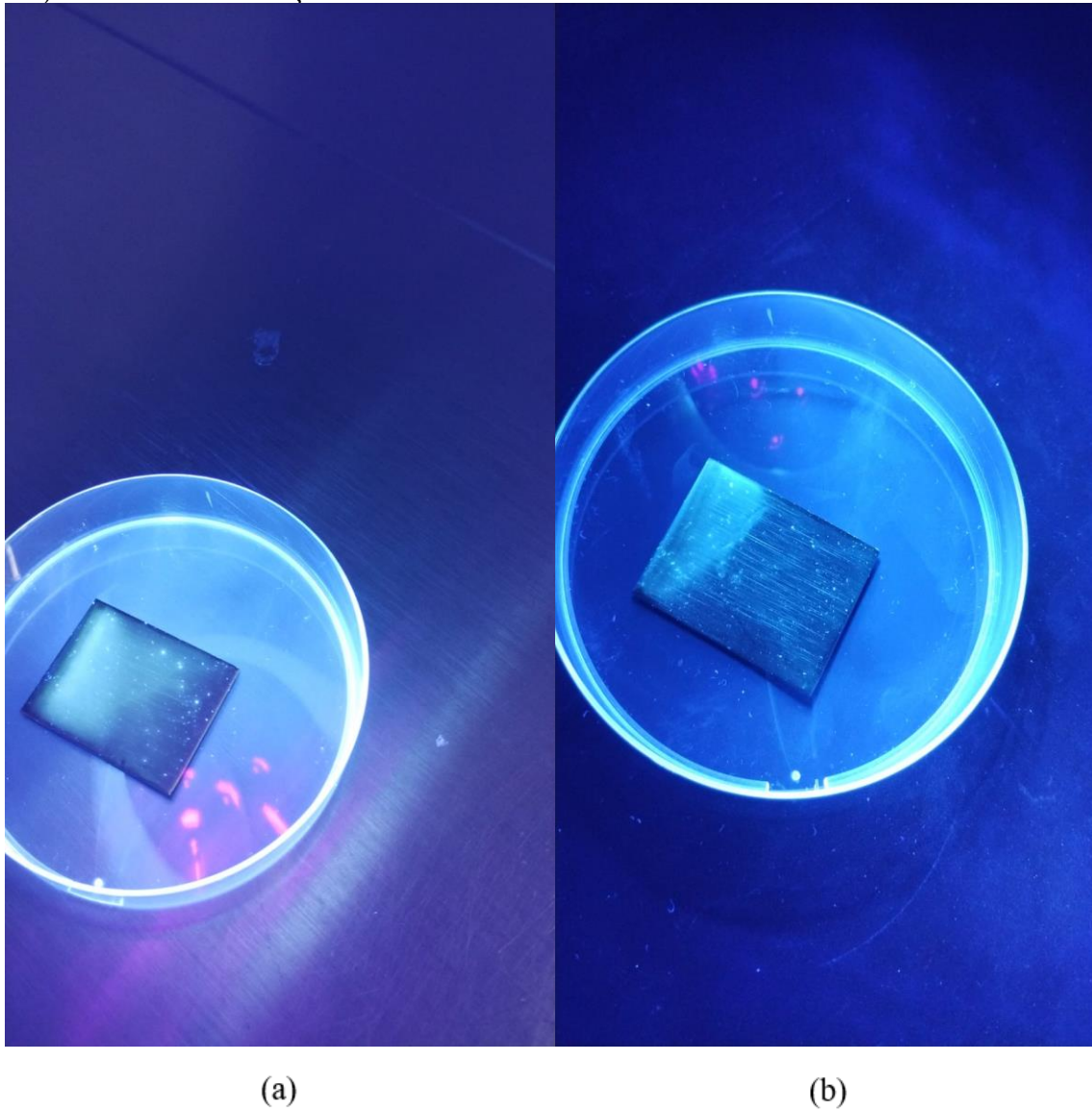
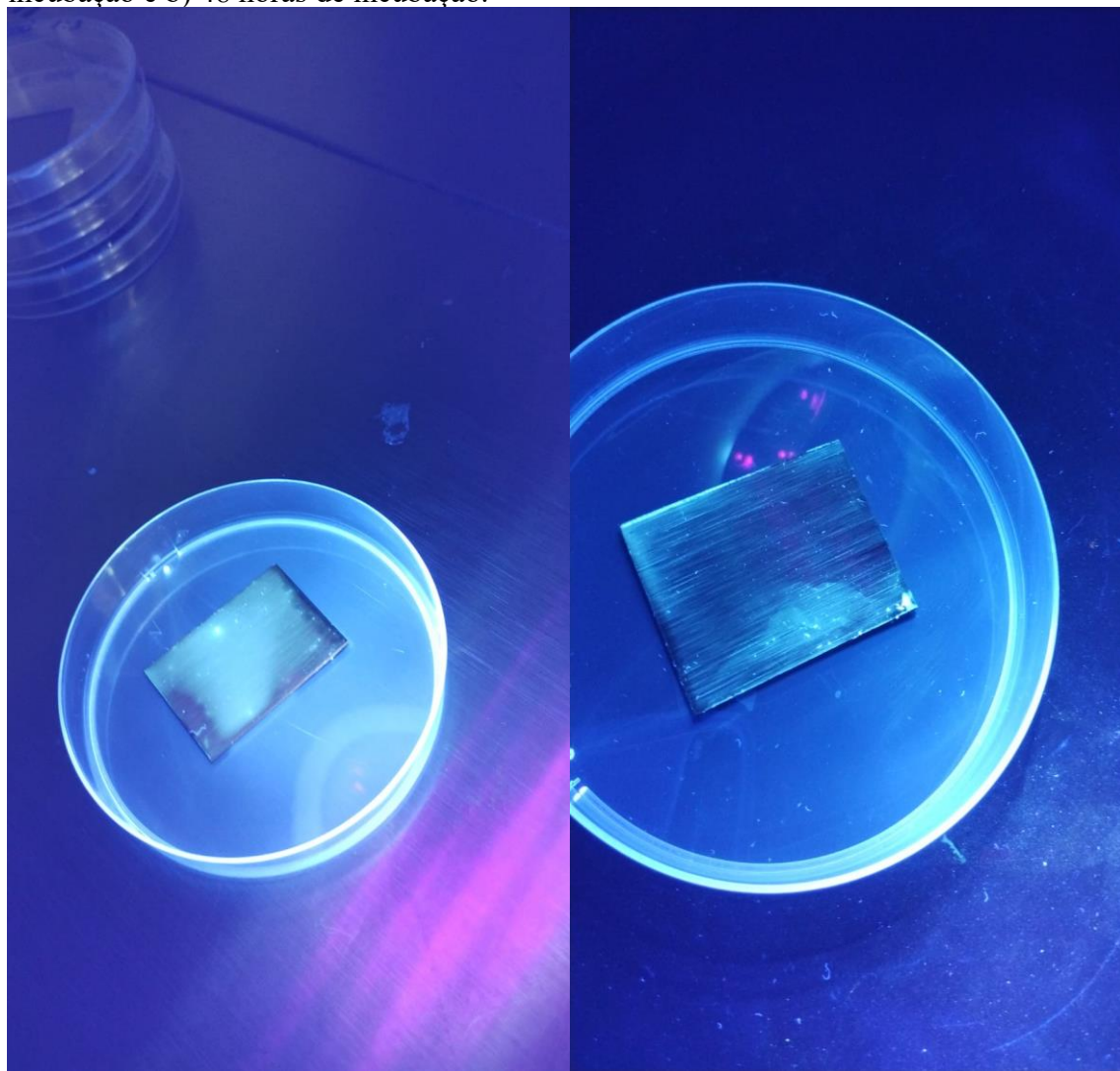


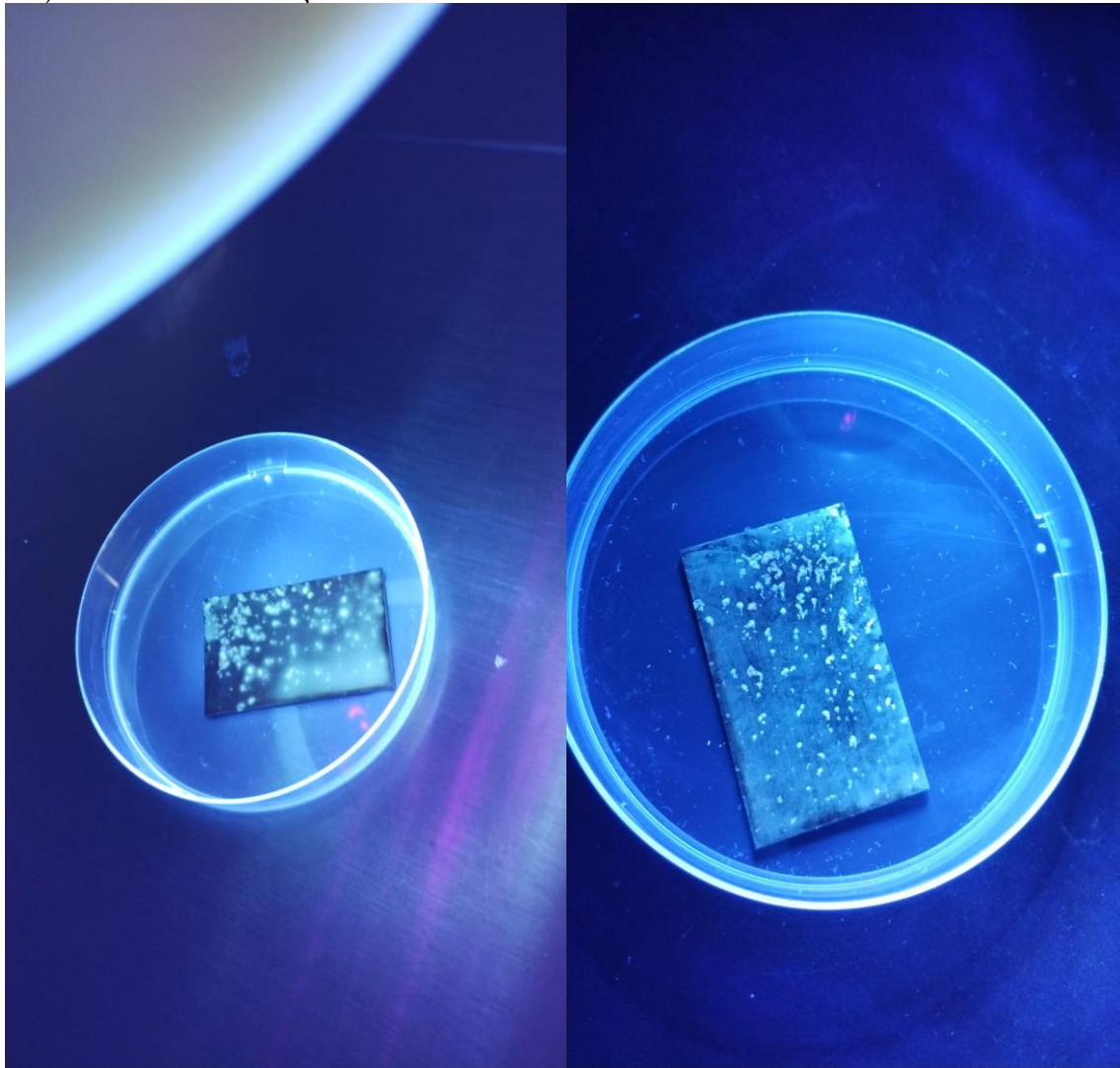
Figura 3 – Crescimento de *P. aeruginosa* sobre chapa de inox após a) 24 horas de incubação e b) 48 horas de incubação.



(a)

(b)

Figura 4 – Crescimento de *C. albicans* sobre chapa de inox após a) 24 horas de incubação e b) 48 horas de incubação.



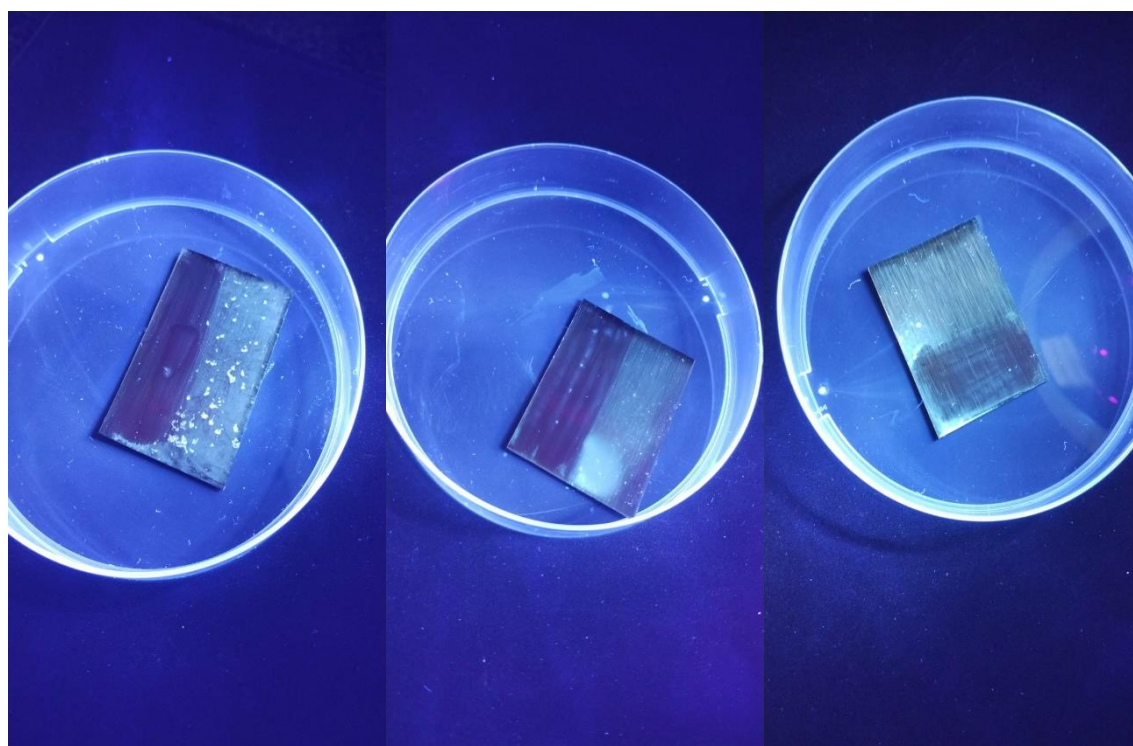
(a)

(b)

4. Verificação da formação de biofilme

Após uso do swab na chapa de inox, foi observado contraste entre duas regiões da superfície, uma opaca e outra de maior brilho (Figura 5). Essa distinção pôde ser verificada a olho nu, mas foi evidenciada pelo uso do equipamento, denotando a efetiva formação de biofilme por todos os microrganismos utilizados.

Figura 5 – Identificação da formação de biofilme sobre as chapas de inox com auxílio do equipamento.



C. albicans (1:2)

E. coli (1:3)

P. aeruginosa (1:2)

CONCLUSÃO

A partir do uso do equipamento LOC, foi possível observar o processo de formação de biofilme de *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* sobre superfícies de aço inox desde as fases iniciais do processo de incubação. Os biofilmes foram caracterizados por camada de aspecto opaco sobre a superfície de inox, e quando iluminados, apresentaram fluorescência e coloração branco-esverdeada. Dessa forma, o equipamento LOC – *Light On Cells* pode efetivamente ser utilizado na identificação de biofilmes de bactérias e fungos sobre superfícies contaminadas.

REFERÊNCIAS

LIN, H. L. *et al.* Revisiting with a relative-density calibration approach the determination of growth rates of microorganisms by use of optical density data from liquid cultures. *Applied and environmental microbiology*, v. 76, 2010. doi: 10.1128/FAEM.00824-09

PIMENTEL-FILHO, N. J. *et al.* Bovicin HC5 and nisin reduce *Staphylococcus aureus* adhesion to polystyrene and change the hydrophobicity profile and Gibbs free energy of adhesion. *International Journal of Food Microbiology*, v. 190, p. 1–8, 2014. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.004

RODRÍGUEZ-TUDELA J. L. *et al.* Standardization of antifungal susceptibility variables for a semiautomated methodology. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 39, p. 2513-2517, 2001. doi: 10.1128/JCM.39.7.2513-2517.

ŽIVKOVIĆ, V. *et al.* To biofilm or no to biofilm? *SEEMEDJ*, v. 2, 2018. doi: 10.26332/seemedj.v2i1.69