



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

BIOFILME DE *Leptospira*: TEMPO DE GERAÇÃO E TAMANHO
CELULAR

por

Élder Müller Nascimento de Almeida

Salvador, BA
(2018)

ÉLDER MÜLLER NASCIMENTO DE ALMEIDA

BIOFILME DE *Leptospira*: TEMPO DE GERAÇÃO E TAMANHO CELULAR

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia como exigência para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas

Orientadora: Tânia Regina Marques da Silva

Coorientadora: Paula Carvalhal Lage von Buettner Ristow

Salvador, BA
(2018)

Data da defesa: 31 de Julho de 2018

Banca examinadora

TÂNIA REGINA MARQUES DA SILVA

Orientadora

Universidade Federal da Bahia

MILTON RICARDO DE ABREU ROQUE

Membro da banca

Universidade Federal da Bahia

THIAGO LUIZ DE PAULA CASTRO

Membro da banca

Universidade Federal da Bahia

RESUMO

Leptospirose é uma doença causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*. Essa zoonose tem importância global e afeta cerca de 1.000.000 de pessoas no mundo, anualmente. Leptospiras possuem a capacidade de formar biofilmes *in vitro*, em rins de ratos naturalmente infectados e também participam de biofilmes ambientais mistos. Biofilmes são comunidades de microrganismos embebidos em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares por eles secretadas. Durante a formação desse fenótipo há modificação da expressão gênica e do metabolismo, alterando a concentração, tamanho e crescimento celular no biofilme. Até o momento não existem estudos caracterizando o crescimento de leptospiras no biofilme. Nesse trabalho, foi utilizada a espécie *Leptospira biflexa* como organismo modelo para caracterizar o crescimento de leptospiras no biofilme e no estado planctônico. Leptospiras foram cultivadas em tubos de vidro, para a formação de biofilme, e em tubos de plástico, para obtenção de células planctônicas. As culturas em tubo de vidro foram feitas em duas condições: com e sem troca do meio de cultura. O crescimento de leptospiras foi diferente entre os fenótipos, sendo 10 vezes menor no biofilme, com tempo de geração igual entre eles. O tamanho celular de leptospiras no biofilme foi maior na fase estacionária, em comparação com as células planctônicas. Quanto ao biofilme na condição de troca de meio, não foram observadas diferenças no crescimento, tempo de geração e tamanho celular. Coletivamente, os resultados sugerem que o metabolismo de leptospiras é diferente no biofilme, cujo crescimento é menor e com maior tamanho celular em comparação com o estado planctônico.

ABSTRACT

Leptospirosis is a disease caused by pathogenic spirochetes of the genus *Leptospira*. This zoonosis is of global importance and affects about 1,000,000 people worldwide annually. Leptospire have the ability to form biofilms in vitro, in naturally infected rat kidneys, and participate in mixed environmental biofilms. Biofilm is an aggregate of microorganisms embedded in a self produced matrix of extracellular polymeric substances. During the formation of this phenotype, there is a modification of gene expression and metabolism, altering the cellular's concentration, size and growth in the biofilm. To date, there are no studies characterizing the growth of leptospire in the biofilm. In this work, the species *Leptospira biflexa* was used as a model organism to characterize the growth of leptospire in the biofilm and in the planktonic state. Leptospiras were cultivated in glass tubes for biofilm formation and in plastic tubes to obtain planktonic cells. Glass tube cultures were made under two conditions: with and without the exchange of the culture medium. The growth of leptospire was different among the phenotypes, being ten times lower in the biofilm, with equal generation time between them. The cell size of leptospire in the biofilm was longer in the stationary phase compared to planktonic cells. As for the biofilm in the medium exchange condition, no differences in growth, generation time and cell size were observed. Collectively, the results suggest that the metabolism of leptospire is different in the biofilm, with lower growth and larger cell size compared to the planktonic state.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Curva de crescimento de leptospiras nos fenótipos biofilme sem troca de meio (BIOFsTM) e planctônico (PLANC). Os resultados representam a média de três réplicas independentes e as barras mostram o erro padrão.....12
- Figura 2** - Fase exponencial de crescimento de BIOFsTM e PLANC. Os resultados representam a média de três réplicas independentes.13
- Figura 3** - Tamanho celular médio de leptospiras ao longo da curva de crescimento. As barras de erros indicam o erro padrão calculado a partir da média de medição de 200 bactérias. Esse gráfico é resultado de um experimento.14
- Figura 4** - Média do tamanho celular de leptospiras nas fases de crescimento bacteriano. As barras de erros indicam o erro padrão calculado a partir da medição de 200 bactérias. Esse gráfico é resultado de um experimento.14
- Figura 5** - Curva de crescimento de Biofilme com troca e meio (BIOFcTM) e biofilme sem troca de meio (BIOFsTM). As barras mostram o erro padrão. Esse gráfico é resultado de três réplicas independentes.....15
- Figura 6** - Fase exponencial de crescimento de BIOFsTM e BIOFcTM. Os resultados representam a média de três réplicas independentes.16
- Figura 7** – Tamanho celular médio de leptospiras ao longo da curva de crescimento. As barras de erros indicam o erro padrão calculado a partir da média de medição de 200 bactérias. Esse gráfico é resultado de um experimento.16

LISTA DE ABREVIATURAS

BIOF	Biofilme
BIOFcTM	Biofilme com troca de meio
BIOFsTM	Biofilme sem troca de meio
EMJH	Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris
PLANC	Planctônica
TG	Tempo de geração

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal da Bahia e ao Instituto de Biologia, local de formação que me proporcionou crescimento profissional.

Ao Laboratório de Bacteriologia e Saúde, por ter me iniciado na ciência e me fornecido tudo quanto necessário para minha formação científica.

À Professora Tânia Silva, minha orientadora, que me recebeu no LABACS e me forneceu uma orientação excepcional, sendo exemplo de trabalho, ética e compromisso.

À professora Paula Ristow, pelo suporte no desenvolvimento desse trabalho e pela orientação nos meus demais projetos no laboratório.

À Priscyla Ribeiro, tutora e amiga, por todos ensinamentos, conselhos e companheirismo.

À toda família do LABACS, pela ajuda, treinamento e suporte, mas principalmente pela amizade.

À Deus, fonte de toda inspiração e sabedoria. Aos meus pais, Eduardo e Edilae, por todo o apoio e cuidado. Aos meus irmãos Euler e Edu, sempre me alegrando com sua companhia diariamente. À Irene, cujo o apoio e carinho foram fundamentais nesse período.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DE LITERATURA	3
<i>Leptospira</i>	3
LEPTOSPIROSE	3
Epidemiologia	3
Sintomatologia	4
BIOFILME	4
CRESCIMENTO BACTERIANO E TEMPO DE GERAÇÃO	6
OBJETIVOS.....	9
OBJETIVO GERAL	9
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
METODOLOGIA	10
CULTIVOS DE BIOFILME E CÉLULAS PLANCTÔNICAS.	10
CURVAS DE CRESCIMENTO.	10
CONTAGEM DE LEPTOSPIRAS.	10
TROCA DE MEIO.	10
DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE GERAÇÃO (TG).	11
MEDIÇÃO DO TAMANHO DE LEPTOSPIRAS.	11
ESTATÍSTICA.	11
RESULTADOS	12
O CRESCIMENTO DE LEPTOSPIRAS FOI MENOR NO BIOFILME	12
NÃO HOUVE DIFERENÇA NOS TEMPOS DE GERAÇÃO	13
TAMANHO MÉDIO DAS BACTÉRIAS FOI IGUAL ENTRE OS FENÓTIPOS, MAS DIFERENTE ENTRE AS FASES DE CRESCIMENTO	13
O CRESCIMENTO DE LEPTOSPIRAS FOI SEMELHANTE ENTRE AS DUAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DE BIOFILME	15
DISCUSSÃO.....	17
CONCLUSÕES.....	20
PERSPECTIVAS	21
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22

INTRODUÇÃO

Leptospiras são espiroquetas longas, finas, Gram-negativas, aeróbias obrigatórias e de crescimento fastidioso (TRABULSI, 2014; CAMERON, 2014). Pertencem ao gênero *Leptospira*, o qual possui espécies saprofíticas (ambientais; incapazes de causar doença em humanos), intermediárias (causam doença com sintomatologia branda) e patogênicas (capazes de causar doença grave) (HAAKE; LEVETT, 2014). As espécies patogênicas são os agentes causadores da leptospirose, uma zoonose de importância global que afeta cerca de 1.000.000 de pessoas no mundo, anualmente (PICARDEAU, 2013; COSTA, 2015).

A leptospirose é considerada uma doença ocupacional pela Organização Internacional do Trabalho (KIM; KANG, 2013) e nos últimos anos essa zoonose vem afetando também os praticantes de ecoturismo, aumentando os índices de infecção desse grupo (BOURQUE; VINETZ, 2018). A maior ocorrência da leptospirose é em locais de clima tropical, com aumento da transmissão em épocas chuvosas, quando a urina de roedores infectados presente em esgotos, bueiros e até mesmo no solo, mistura-se à água da chuva (PICARDEAU, 2013; COSTA et al., 2015; HAAKE; LEVETT, 2014; LOMAR; DIAMENT; TORRES, 2000; GUIMARÃES et al., 2014).

Leptospiras patogênicas e saprofíticas possuem a capacidade de formar biofilme *in vitro* (RISTOW et al.; 2008) e em rins de ratos naturalmente infectados (SANTOS, 2015), além de participarem de biofilmes mistos em associação com outros microrganismos (SINGH et al., 2003; KUMAR et al.; 2015). Biofilmes são comunidades de microrganismos embebidos em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) por eles secretadas (FLEMMING et al., 2016; HALL-STOODLEY; STOODLEY, 2009). Esse fenótipo protege os microrganismos de condições hostis e pode aumentar a viabilidade de leptospiras em diversas condições ambientais. (BARRAGAN et al., 2011).

Uma característica importante dos microrganismos é a forma como crescem. A dinâmica de crescimento em culturas desses organismos é representada por meio de uma curva chamada curva de crescimento, cujas fases clássicas são: *lag*, exponencial, estacionária e decaimento (MADIGAN et al., 2016). Outra característica do crescimento dos microrganismos é o tempo de geração, o qual consiste no tempo necessário para que ocorra duplicação celular (MADIGAN et al., 2016).

Estudos demonstram que as bactérias no biofilme possuem uma dinâmica de crescimento diferente (RICE; HAMILTON; CAMPER, 2000), por vezes apresentando um crescimento mais lento com tempo de geração maior, quando comparadas ao fenótipo planctônico (WANG et al., 2015). Da mesma forma, o tamanho celular pode estar sob influência desse fenótipo, visto que a disponibilidade

de nutrientes é o principal determinante no tamanho de células bacterianas (VADIA; LEVIN, 2015; TAHERI-ARAGHI et al., 2015), e no fenótipo biofilme, por conta de sua estrutura e organização da matriz, as bactérias podem sofrer restrições de nutrientes. Estudo com outras bactérias constataram que estas são maiores quando incubadas em meio rico de nutrientes, e menores em ambiente com nutrientes limitados (MARSHALL et al., 2012; CHIEN; HILL; LEVIN, 2012; HAEUSSER; LEVIN, 2008).

Até o momento não existem estudos caracterizando o padrão de crescimento do biofilme de *Leptospira*. Tendo em vista a falta de estudos e a importância de compreender a dinâmica de crescimento dessas bactérias no biofilme, esse trabalho utilizará a espécie saprofítica *Leptospira biflexa* como organismo modelo (IRAOLA et al., 2016) para caracterizar o crescimento de leptospiros no biofilme.

REVISÃO DE LITERATURA

Leptospira

Leptospiras são espiroquetas longas, finas e altamente móveis (CAMERON, 2014) que pertencem a ordem Spirochaetes, família Leptospiraceae e gênero *Leptospira* (LEVETT, 2014). São bactérias Gram-negativas, aeróbias obrigatórias, ubíquas e de crescimento fastidioso (TRABULSI, 2014; CAMERON, 2014). Possuem dois endoflagelos, que se inserem no espaço periplasmático e conferem motilidade a esses microrganismos, sendo, também, importantes fatores de virulência (MARTIN et al., 2017; LAMBERT et al., 2012).

O gênero *Leptospira* é atualmente dividido em espécies saprofitas (ambientais; incapazes de causar doença em humanos), intermediárias (causam doença com sintomatologia branda) e patogênicas (capazes de causar doença grave) (HAAKE; LEVETT, 2014).

LEPTOSPIROSE

Epidemiologia

A leptospirose é uma zoonose de importância global que afeta cerca de 1.000.000 de pessoas no mundo, anualmente, apresentando taxa de letalidade de 10% (PICARDEAU, 2013; COSTA, 2015). É considerada uma doença ocupacional pela Organização Internacional do Trabalho, (KIM; KANG, 2013) pois atinge muitos agricultores, soldados (KWON; LEE, 2014), fazendeiros, e trabalhadores de esgoto (PICARDEAU, 2013). Nos últimos anos, essa zoonose vem afetando também os praticantes de ecoturismo, aumentando os índices de infecção desse grupo (BOURQUE; VINETZ, 2018).

A ocorrência da leptospirose é maior em locais de clima tropical, com aumento da transmissão em épocas chuvosas, quando a urina de roedores infectados presentes em esgotos, bueiros e até mesmo no solo, mistura-se à água da chuva (PICARDEAU, 2013; COSTA et al., 2015; HAAKE; LEVETT, 2014; LOMAR; DIAMENT; TORRES, 2000; GUIMARÃES et al., 2014). Ademais, a leptospirose é considerada uma doença negligenciada e apresenta altos índices de infecção em regiões mais pobres e com baixas condições de saneamento (COSTA et al., 2015). No estado da Bahia, a doença tem caráter endêmico e segundo a Secretaria da Saúde do Estado da Bahia (SESAB), o coeficiente de incidência é de 3,2 casos a cada 100.000 habitantes. Entre janeiro e novembro de 2017 foram notificados 172 casos de leptospirose, sendo 36% destes confirmados, com cinco óbitos declarados no estado, quatro dos quais, na capital baiana. Uma análise do número total de casos suspeitos entre 2016 e 2017 revelou aumento do número de notificações entre abril e agosto, que corresponde aos períodos de chuva da região (BAHIA, 2017).

Sintomatologia

A leptospirose é causada por leptospiras patogênicas, com prevalência da espécie *Leptospira interrogans*, as quais podem infectar animais domésticos e silvestres e, potencialmente, todos os mamíferos (ELLIS, 2014; LEVETT, 2014). Os principais reservatórios de leptospiras são os roedores, especialmente aqueles da espécie *Rattus norvegicus*, os quais desenvolvem um quadro crônico e assintomático (PICARDEAU, 2013). Nestes animais, as bactérias colonizam os túbulos renais e são eliminadas pela urina, contaminando o ambiente e possibilitando a infecção de outros animais, incluindo o homem (PICARDEAU, 2013). A infecção pode ocorrer pelo contato com a urina contaminada, com tecido do animal infectado e até mesmo pelo contato com o ambiente contaminado, como o solo e reservatórios de água. Lesões na pele e mucosas são a porta de entrada para essas bactérias (PICARDEAU, 2013; HAAKE; LEVETT, 2014).

Em humanos, a infecção se apresenta como uma doença febril inespecífica acompanhada de cefaleia, mialgia, náuseas e vômitos, podendo ser confundida com outras doenças, como gripe e dengue. Nas formas mais graves, o indivíduo desenvolve icterícia, disfunção hepática grave e insuficiência renal, conhecida como Síndrome de Weil, podendo evoluir para hemorragias e disfunção de órgãos, como pulmão e cérebro (LOMAR; DIAMENT; TORRES, 2000; HAAKE; LEVETT, 2014; SEGURO; ANDRADE, 2013). Animais importantes para a pecuária, como bovinos, suínos, caprinos e ovinos, quando acometidos pela leptospirose, apresentam problemas reprodutivos, o que acarreta em prejuízos para os produtores. Essa doença afeta também animais domésticos, como os cães (PICARDEAU, 2013; PETRAKOVSKY et al., 2014), sendo *Canicola* o sorovar infectante mais comum. Os aspectos clínicos da doença são muito semelhantes aos dos humanos (ELLIS, 2014).

BIOFILME

Biofilme é uma comunidade de microrganismos embebidos em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (Exopolissacarídeos, EPS) por eles secretadas (FLEMMING et al., 2016; HALL-STOODLEY; STOODLEY, 2009). Esse fenótipo é uma antiga adaptação de células procarióticas (HALL-STOODLEY et al., 2004), sendo um dos modos de vida mais amplamente distribuído na terra (FLEMMING et al., 2016). Os microrganismos nesse fenótipo estão aderidos uns aos outros, bem como à uma superfície biótica ou abiótica ou à flocos móveis, na ausência de um substrato (FLEMMING et al., 2016). A matriz de EPS é altamente hidratada e nela estão presentes polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos. Esse arranjo fornece estabilidade mecânica para os biofilmes, auxilia no processo de adesão, imobiliza as células e nutre esse agregado (FLEMMING; WINGENDER, 2010). Essa matriz do biofilme confere proteção às bactérias contra

condições de estresse do ambiente, biocidas (incluindo antibióticos), desinfetantes e contra o sistema imune do hospedeiro (FLEMMING; WINGENDER, 2010; BELOIN; ROUX; GHIGO, 2008), sendo assim um sério problema para a saúde e ambiente.

Biofilmes são mecanismos de virulência envolvidos em diversas infecções bacterianas (BELOIN; ROUX; GHIGO, 2008; OTTO, 2008; KONG et al., 2018; SHARMA et al., 2016, DEPAS et al., 2014). Microrganismos como *Pseudomonas* (BELOIN; ROUX; GHIGO, 2008), *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus* formam biofilme, tornando as infecções nosocomiais causadas por esses microrganismos resistentes à ação antimicrobiana (OTTO, 2008; KONG et al., 2018). Da mesma forma, biofilme de *Escherichia coli* protege os microrganismos nas situações adversas, como a ação de biocidas, aumentando a resistência desse patógeno (SHARMA et al., 2016, DEPAS et al., 2014).

Muitas espiroquetas formam biofilme, à exemplo daquelas da espécie *Treponema denticola* que formam biofilme em associação com outros microrganismos, sendo este fenótipo muito importante na etiologia de doenças periodontais (YAMADA; IKEGAMI; KURAMITSU, 2005). Outras espiroquetas como *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia afzelii* e *Borrelia garinii*, também formam biofilmes, sugerindo que esse fenótipo é uma característica comum a esse gênero, o que favorece vantagens de sobrevivência a esses organismos em diferentes condições ambientais (SAPI et al., 2012; TIMMARAJU et al., 2015).

Singh e colaboradores (2003) demonstraram que bactérias do gênero *Leptospira* eram as mais frequentes em biofilmes mistos encontrados em unidades hídricas de consultórios dentários, representando 20% dentre os gêneros bacterianos encontrados. Estudos posteriores demonstraram que leptospiras saprofíticas e patogênicas são capazes de formar biofilmes *in vitro* (RISTOW et al., 2008). No estudo de Barragan e colaboradores (2011), evidenciou-se que a associação de leptospiras saprofíticas ou patogênicas com outras bactérias ambientais em biofilmes aumenta a viabilidade de leptospiras em meio pobre de nutrientes. Kumar e colaboradores (2015) observaram a formação de biofilme ambiental de *L. interrogans* associado com *Azospirillum brasilense*. Também já foi observada presença de biofilme de leptospiras na colonização renal crônica em ratos de esgotos (*Rattus norvegicus*) capturados em áreas endêmicas de leptospirose (SANTOS, 2015).

CRESCIMENTO BACTERIANO E TEMPO DE GERAÇÃO

A dinâmica de crescimento em culturas de microrganismos é representada por meio de uma curva, cujas fases (*lag*, exponencial, estacionária e decaimento) refletem o ciclo de crescimento desses organismos (MADIGAN et al., 2016).

A fase *lag* é a fase inicial de crescimento bacteriano, onde bactérias se adaptam ao meio de cultura e apresentam intensa atividade metabólica. A fase exponencial corresponde ao período em que as células se encontram nas condições mais saudáveis e duplicam-se em tempos regulares. É nessa fase que é possível calcular o tempo de geração, que consiste no tempo necessário para que ocorra duplicação celular. Em determinado momento, o crescimento exponencial cessa, por depleção de nutrientes importantes para o metabolismo celular ou por acúmulo de metabólitos excretados pelas bactérias. Nessa fase, conhecida como fase estacionária, a taxa de duplicação é equivalente à taxa de morte celular, o que mantém o número de células inalterado. A última fase é caracterizada pelo decaimento do número celular, decorrente da morte das bactérias (ALTERTHUM; TRABULSI, 2008; MADIGAN et al., 2016).

As fases de crescimento descritas acima são típicas de microrganismos crescendo em culturas bateladas, ou seja, em recipientes fechados e com uma quantidade limitada de meio de cultura. Em um sistema aberto, como culturas com troca do meio em tempos regulares, a cultura entra em uma condição de equilíbrio quando a quantidade de nutrientes e excretas permanecem inalteradas (MADIGAN et al., 2016), o que caracteriza um estado senescente (VALCOURT et al., 2012). Tal senescência é uma condição reversível do ciclo celular que garante proteção contra situações hostis do ambiente, quando as bactérias reduzem o metabolismo, mas mantém as suas funções celulares básicas. Nesse estado, o tamanho da população é mantido, o que conduz as bactérias a uma fase estacionária que resulta no equilíbrio que mantém a população estável e viável (VALCOURT et al., 2012; RITTERSHAUS; BAEK; SASSETTI, 2013).

Para quantificar esse crescimento um dos métodos utilizados é a contagem direta utilizando câmara de Petroff-Hausser, que apesar de dispendiosa é uma técnica mais precisa em comparação ao método indireto de quantificação por espectrofotômetro, por exemplo (FAINE et al., 1999). Para quantificar o crescimento de leptospiros a contagem em câmara por microscopia de campo escuro é considerada padrão ouro (SCHREIER et al., 2009), mas já existem métodos mais sensíveis como a citometria de fluxo, usada por Fontana e colaboradores (2017), onde observou-se que os valores de quantificação de leptospiros foram altamente semelhantes aos das contagens por câmara de Petroff-

Hausser, apresentado a vantagem de ser uma ferramenta mais rápida e reprodutível, sendo uma técnica promissora para substituir os métodos de quantificação atuais.

Estudos sugerem que bactérias no fenótipo biofilme apresentam crescimento diferente daquelas no fenótipo planctônico. Um estudo com *Pseudomonas aeruginosa* mostrou que essas bactérias apresentam um atraso no crescimento quando fazem a transição de estado planctônico para o biofilme (RICE; HAMILTON; CAMPER, 2000). Wang e colaboradores (2015) mostraram que o crescimento bacteriano no biofilme de *E. coli* era distinto daquele das células em estado planctônico, com um tempo de geração maior que o dobro, ou seja, *E. coli* no biofilme apresentou um crescimento mais lento.

Ao longo da curva de crescimento, bactérias respondem a muitos estímulos externos regulando o seu tamanho celular (MARSHALL et al., 2012). Certas demandas do meio tais como disponibilidade de nutrientes, predação e tamanho populacional são fatores que coordenam a divisão e o crescimento celular em bactérias (MARSHALL et al., 2012; CHIEN; HILL; LEVIN, 2012).

O tamanho da célula está relacionado à taxa de divisão celular. Atrasos na divisão, por exemplo, podem causar aumento do tamanho celular, e uma divisão mais acelerada, a diminuição. Assim, sugere-se que o tamanho das células é coordenado pela taxa de crescimento, o que é chamado de “lei do crescimento” (VADIA; LEVIN, 2015).

A lei do crescimento, proposta por Schaechter, Maaloe e Kjeldgaard (1958), correlaciona a taxa de crescimento com a composição celular, de forma que a composição química e o tamanho de uma célula bacteriana dependem da taxa de crescimento. A partir da lei do crescimento começou-se a investigar as mudanças na taxa de crescimento e no tamanho celular dependente de nutrientes, e hoje aceita-se que o principal determinante no tamanho de células bacterianas é a disponibilidade de nutrientes no meio (VADIA; LEVIN, 2015; TAHERI-ARAGHI et al., 2015).

A disponibilidade de nutriente é um dos fatores mais estudados na influência do tamanho das células bacterianas. Estudos em *Bacillus subtilis* constataram que a bactéria é mais longa quando incubada em meio rico de nutrientes, e menor em ambiente de nutrientes limitados (MARSHALL et al., 2012; CHIEN; HILL; LEVIN, 2012). *E. coli*, por sua vez, quando cultivada em meios ricos, apresentam o dobro de tamanho, comparadas àquelas cultivadas em meio pobre de nutrientes. (HAEUSSER; LEVIN, 2008).

Considerando que biofilme é um fenótipo onde as bactérias sofrem restrição de nutrientes, Wang e colaboradores (2015) estudaram o tamanho de *E. coli* no biofilme, e mostraram que bactérias desse fenótipo apresentaram tamanho menor do que aquelas no estado planctônico. Duas vias foram

propostas para explicar a regulação do tamanho bacteriano: uma via dependente de densidade e uma via dependente de nutrientes. A disponibilidade de nutrientes no meio atua regulando a divisão e conseqüentemente o tamanho celular; quando há muito nutriente a divisão é mais lenta e tamanho celular se torna maior. No entanto, quando a concentração populacional aumenta, é a densidade bacteriana que passa a regular o ciclo de divisão diminuindo o tamanho celular.

Smith e colaboradores (2016) mostraram em seu trabalho a interdependência entre a forma da bactéria e a disposição no biofilme, onde bactérias bacilares apresentaram uma tendência de colonizar a base da comunidade, enquanto as bactérias em forma de cocos apresentaram tendência de colonizar a superfície superior, sugerindo a importância da forma celular na padronização espacial do biofilme.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Caracterizar o padrão de crescimento de *Leptospira biflexa* nos fenótipos biofilme e planctônico

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Caracterizar a curva de crescimento e determinar o tempo de geração de *L. biflexa* no biofilme.
- b) Determinar o tamanho celular de *L. biflexa* ao longo da curva de crescimento nos estados planctônico e biofilme.
- c) Avaliar o efeito da reposição de meio de cultura no crescimento de *Leptospira biflexa* no biofilme.

METODOLOGIA

CULTIVOS DE BIOFILME E CÉLULAS PLANCTÔNICAS. *Leptospira biflexa* sorovar Patoc cepa Patoc 1 (espécie saprofítica) foi cultivada em meio líquido EMJH (Ellinghausen & McCullough, Johnson & Harris), a 29 °C em estufa BOD. Células planctônicas (PLANC) foram obtidas a partir do cultivo em tubos de plástico, sob agitação a 80 rpm. Para a formação de biofilmes (BIOF), leptospiros foram cultivadas em tubos de vidro contendo 2 mL de meio de cultura, sem agitação. A presença de biofilme foi determinada pela observação de um halo na superfície ar-líquido, constituído por leptospiros aderidas à parede do tubo de vidro (RISTOW et al.; 2008).

CURVAS DE CRESCIMENTO. Bactérias planctônicas e no fenótipo de biofilme foram cultivados por 48 horas. Nesse ponto, onde as células se encontravam em fase de crescimento exponencial (aproximadamente $5,00E+08$ bactérias/mL), foi realizada contagem em câmara de Petroff-Hausser e calculado o inóculo inicial de $1,00E+06$ bactérias/mL. Células planctônicas foram cultivadas em tubo *Falcon*, contendo 20 mL do qual foram retiradas as alíquotas para contagem de leptospiros nos tempos pré-determinados. Biofilme foi cultivado em doze tubos de vidro (um, para cada tempo), contendo 2 ml de meio em cada um deles. Os cultivos de biofilme (BIOF) foram feitos em duas condições: cultivos sem troca de meio (BIOFsTM) e cultivos com troca de meio (BIOFcTM). A troca de meio foi feita a cada 12 horas, visando remover células não aderidas ao biofilme (adaptado WANG et al., 2015). Foram adicionados também dois pontos iniciais para possibilitar a análise da fase *lag*. Assim, nos tempos pré-determinados, (4 h, 8 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 60 h, 72 h, 84 h, 96 h, 108 h, 120 h), foram realizadas as contagens para avaliar o crescimento bacteriano.

CONTAGEM DE LEPTOSPIRAS. Todas as contagens foram feitas em câmara de Petroff-Hausser, seguindo protocolo do fabricante. Três condições foram analisadas: 1) PLANC - após cuidadosa agitação do tubo para homogeneizar a cultura, 300 µL foram retirados para contagem; 2) BIOF - com auxílio de uma pipeta, o sobrenadante (SN – células não aderidas ao biofilme) foi retirado do tubo cuidadosamente, para não desfazer o biofilme, e descartado. Utilizando 1 mL de meio EMJH, o biofilme foi lavado para remoção de células planctônicas não aderidas. O meio de cultura utilizado para lavagem foi retirado e descartado. Em seguida, foram adicionados 2 mL de meio EMJH e o biofilme foi raspado (na parede e no fundo do tubo), homogeneizado e a contagem foi feita seguindo o protocolo acima citado.

TROCA DE MEIO. Para o cultivo de BIOFcTM, a cada doze horas, o meio foi retirado e descartado e o biofilme lavado com 1 mL de meio de cultura a 29 °C, para retirada de células não aderidas. Em seguida, 2 mL de meio a 29 °C foram adicionados e os tubos retornados para a estufa.

DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE GERAÇÃO (TG). O TG foi calculado a partir das curvas de crescimento descritas anteriormente, a partir das fórmulas: $\alpha = \ln(n/n_0) / (t-t_0)$ e $TG = \ln(2)/\alpha$, onde α é a taxa de crescimento específico; n , a concentração final de células; n_0 , a concentração de células no tempo inicial t_0 ; e t , o tempo final (WANG et al., 2015). Para realizar esses cálculos, foi escolhido o intervalo de tempo da curva de crescimento onde houvesse no mínimo dobramento do número de células em tempos regulares, caracterizando a fase de crescimento exponencial.

MEDIÇÃO DO TAMANHO DE LEPTOSPIRAS. Para cada amostra e tempo descritos para a curva de crescimento, foi retirada uma alíquota de 50 μ l de cultura e colocada sobre uma lâmina de microscopia para observação e captura de imagens. Foi utilizando o microscópio de campo escuro *Olympus BX53* e o software *Olympus Cell Sens Entry*. Foram capturadas imagens de 20 campos na objetiva de 20x e realizadas as medições do tamanho celular. Em cada imagem foram medidas até 10 bactérias, sendo consideradas apenas aquelas nítidas e com morfologia típica e desconsideradas aquelas em divisão, aspecto curvado, sobrepostas ou aglomeradas.

ESTATÍSTICA. A média e o erro padrão foram calculados utilizando o programa Microsoft Excel. Para análises das diferenças do crescimento foi utilizado o teste estatístico *Two-way* ANOVA com medidas repetidas e para analisar a diferenças nos tempos de geração utilizou-se *One-way* ANOVA. Para analisar o efeito do fenótipo e do tempo no tamanho celular das bactérias, foi usado *Two-way* ANOVA. Para avaliar a diferença do tamanho celular nas fases de crescimento, foi utilizado o teste *One-way* ANOVA. Foi utilizado o software PAST 3.20, e considerados significantes as diferenças com o $p < 0.05$.

RESULTADOS

O CRESCIMENTO DE LEPTOSPIRAS FOI MENOR NO BIOFILME

Curvas de crescimento foram geradas a partir dos valores de contagem de leptospiras em câmara de Petroff-Hausser durante cinco dias (Figura 1). No crescimento de leptospiras no biofilme (BIOFsTM), foi observada fase inicial (4 a 8 horas) onde começou a adesão ao substrato, seguida das fases de crescimento exponencial (12 a 48 horas) e estacionária. Para leptospiras planctônicas (PLANC), foram observadas as fases *lag* (4 a 8 horas) e fase exponencial (12 a 60 horas), seguidas da fase estacionária. A fase de declínio para ambos os fenótipos não pode ser observada durante o tempo de duração do experimento. Foi observada também diferença ($p < 0,05$) na concentração celular, com BIOFsTM crescendo dez vezes menos (máximo de $1,00E+08$ cel/mL), quando comparado à PLANC (máximo de $1,00E+09$ cel/mL). Adicionalmente, BIOFsTM apresentou fase exponencial mais curta (36 horas) do que PLANC (48 horas) e, por conseguinte, entrou precocemente na fase estacionária (Figura 1).

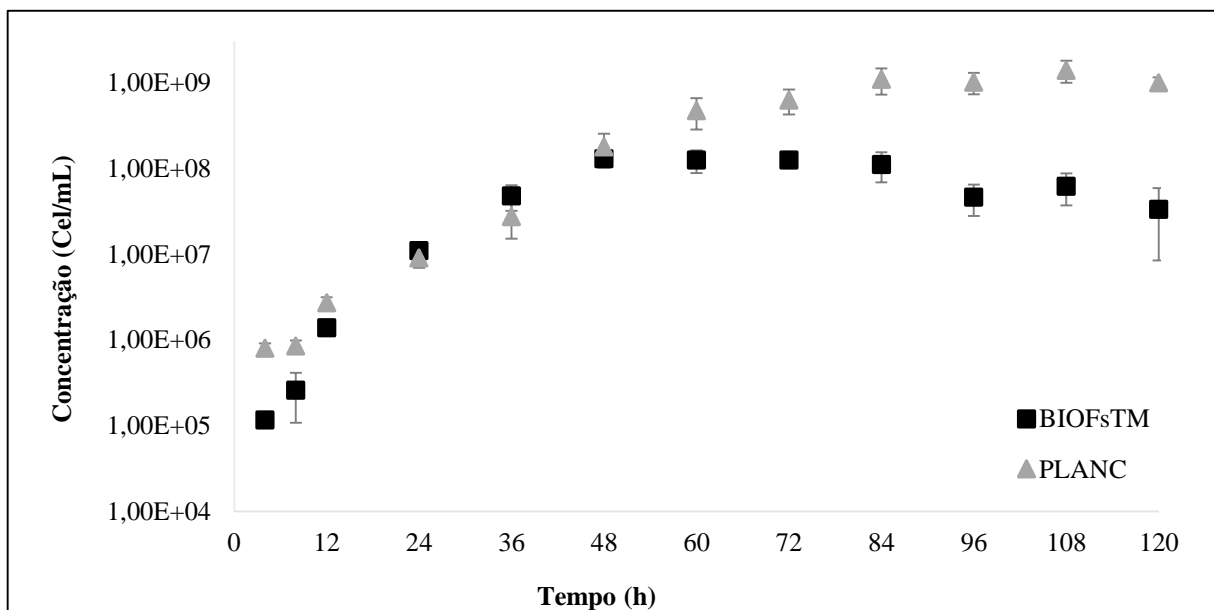


Figura 1 - Curva de crescimento de leptospiras nos fenótipos biofilme sem troca de meio (BIOFsTM) e planctônico (PLANC). Os resultados representam a média de três réplicas independentes e as barras mostram o erro padrão.

NÃO HOUVE DIFERENÇA NOS TEMPOS DE GERAÇÃO

O tempo de geração foi calculado utilizando o intervalo das curvas correspondente ao crescimento exponencial, em tempos consecutivos onde se observava, no mínimo, duplicação celular (Figura 2). Esse intervalo foi confirmado através do gráfico de regressão exponencial e do valor de R^2 . Para BIOFsTM, essa fase durou de 12 a 48 horas, enquanto que para PLANC, de 12 e 60 horas. Apesar dessa fase ter sido mais curta para BIOFsTM, não houve diferença nos tempos de geração de BIOFsTM (5,6 horas) e PLANC (6,43 horas).

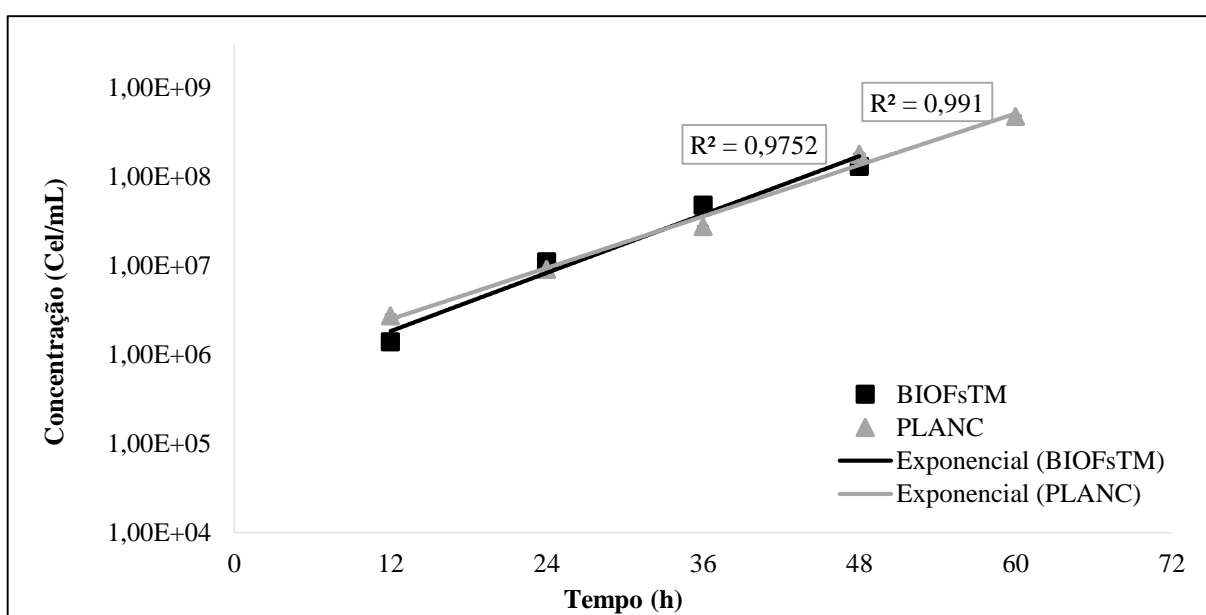


Figura 2 - Fase exponencial de crescimento de BIOFsTM e PLANC. Os resultados representam a média de três réplicas independentes.

TAMANHO MÉDIO DAS BACTÉRIAS FOI IGUAL ENTRE OS FENÓTIPOS, MAS DIFERENTE ENTRE AS FASES DE CRESCIMENTO

A medição do tamanho celular de leptospiras mostrou que não existe diferença no tamanho médio das bactérias (13 μm) em ambos os fenótipos (BIOFsTM e PLANC), quando considerados todos os tempos da curva de crescimento (Figura 3). Ao avaliar o tamanho celular de BIOFsTM e PLANC nas fases de crescimento, foi observado que na fase estacionária o tamanho de BIOFsTM foi 12,1 μm , enquanto que PLANC teve tamanho menor (10,2 μm) ($p < 0,05$) (Figura 4). Adicionalmente, o tamanho celular nos fenótipos foi reduzindo ao longo do tempo em BIOFsTM (15,1 μm para 12,1 μm) e PLANC (14,4 para 10,2 μm) ($p < 0,05$) (Figura 3).

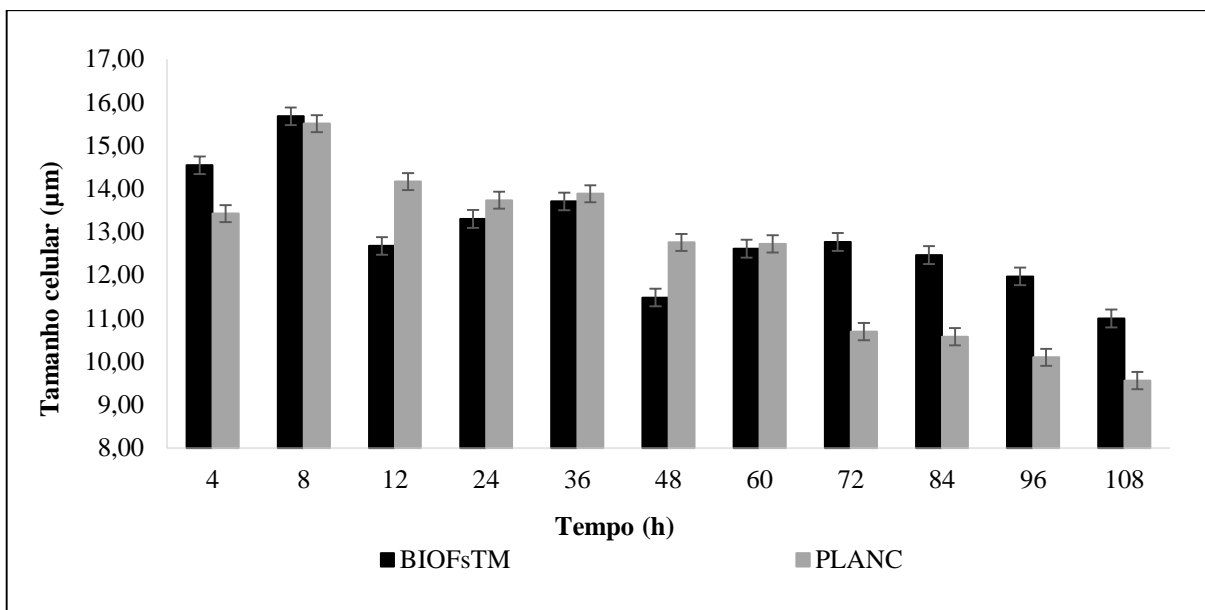


Figura 3 - Tamanho celular médio de leptospiros ao longo da curva de crescimento. As barras de erros indicam o erro padrão calculado a partir da média de medição de 200 bactérias. Esse gráfico é resultado de um experimento.

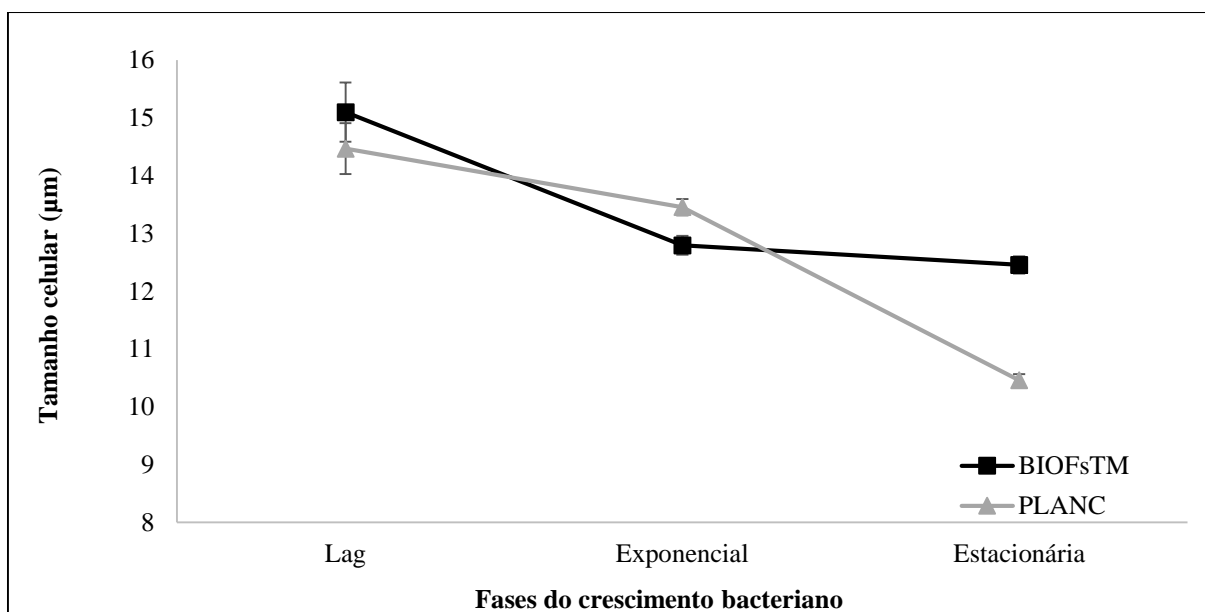


Figura 4 - Média do tamanho celular de leptospiros nas fases de crescimento bacteriano. As barras de erros indicam o erro padrão calculado a partir da medição de 200 bactérias. Esse gráfico é resultado de um experimento.

O CRESCIMENTO DE LEPTOSPIRAS FOI SEMELHANTE ENTRE AS DUAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DE BIOFILME

Com o objetivo de eliminar a interferência das células em suspensão que poderiam estar constantemente se aderindo ao biofilme e superestimando a contagem, influenciado no TG, o cultivo de BIOF foi feito também com troca de meio de cultura a cada 12 horas.

As curvas de crescimento do biofilme nas duas condições BIOFsTM (sem troca do meio de cultura) e BIOFcTM (com troca do meio de cultura) foram semelhantes, conforme mostrado na Figura 5. Entretanto, foi observada uma fase exponencial mais curta em BIOFcTM (12 a 36 horas), comparado a BIOFsTM (12 a 48 horas). Apesar dessa diferença, não houve diferença entre os TG entre esses fenótipos (Figura 6). Da mesma forma, não foi observada diferença no tamanho celular de leptospiras nessas duas condições de cultivo (Figura 7).

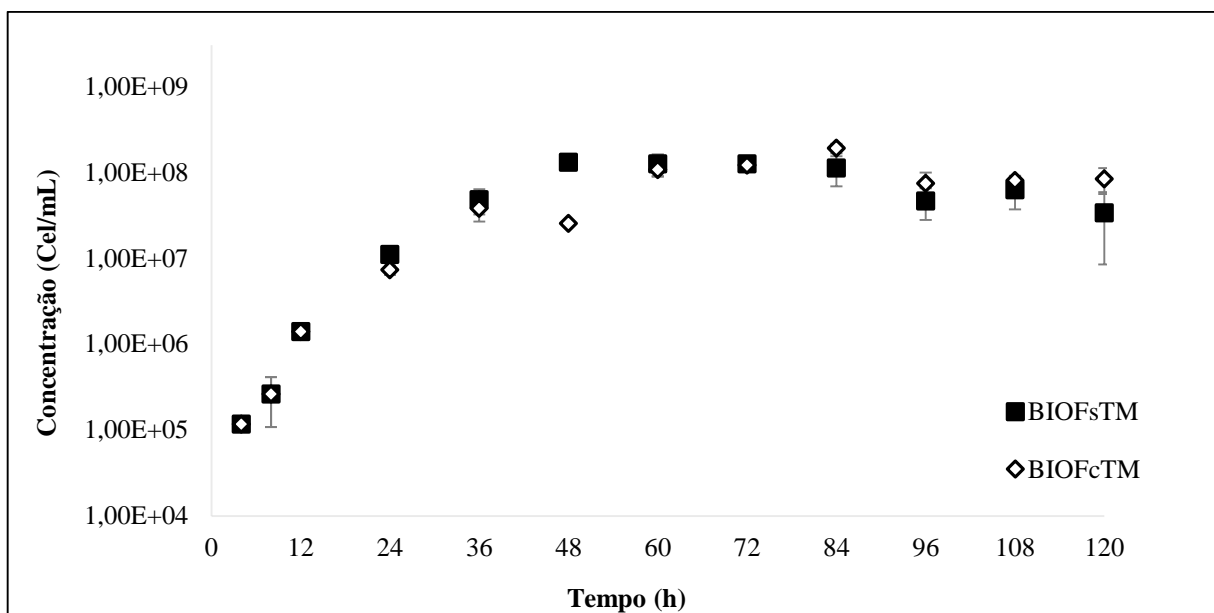


Figura 5 - Curva de crescimento de Biofilme com troca e meio (BIOFcTM) e biofilme sem troca de meio (BIOFsTM). As barras mostram o erro padrão. Esse gráfico é resultado de três réplicas independentes.

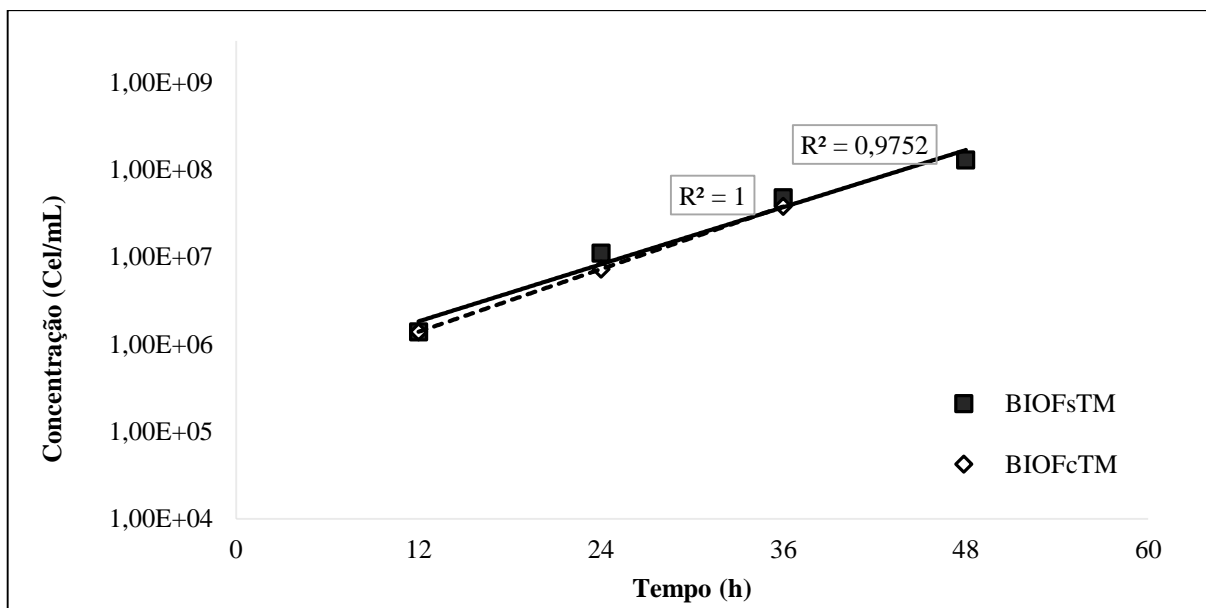


Figura 6 - Fase exponencial de crescimento de BIOFsTM e BIOFcTM. Os resultados representam a média de três réplicas independentes.

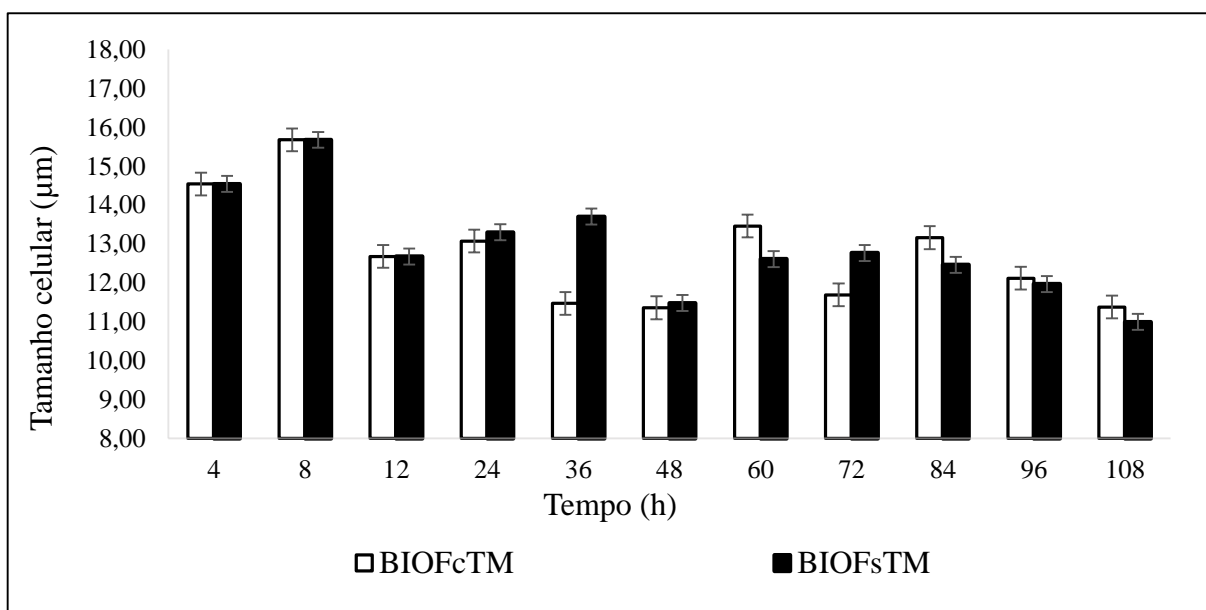


Figura 7 – Tamanho celular médio de leptospiras ao longo da curva de crescimento. As barras de erros indicam o erro padrão calculado a partir da média de medição de 200 bactérias. Esse gráfico é resultado de um experimento.

DISCUSSÃO

Nesse estudo objetivou-se caracterizar os aspectos do crescimento de *Leptospira biflexa*, no estado planctônico e no biofilme. Biofilme de Leptospiras é encontrado no ambiente, em unidades hídricas e até mesmo colonizando animais (BARRAGAN et al., 2011; SINGH et al., 2003; SANTOS, 2015), o que pode acarretar em prejuízos para a indústria e para a saúde. Existem poucos estudos que buscam compreender a dinâmica de crescimento do biofilme. Nesse trabalho a espécie saprofítica *Leptospira biflexa* foi utilizada como organismo modelo (IRAOLA et al., 2016) para caracterizar o crescimento de leptospiras no biofilme.

Demonstramos, por meio da contagem de leptospiras, que existe diferença entre o crescimento de leptospiras planctônicas e no biofilme. Houve um crescimento menor de leptospiras no fenótipo biofilme, uma vez que as bactérias entraram na fase estacionária antes das bactérias planctônicas, e atingiram $1,00E+08$ células, enquanto que nas bactérias planctônicas observou-se concentração máxima de $1,00E+09$ células/mL, no mesmo período. Um estudo com biofilme de *Streptococcus pneumoniae* mostrou que estas bactérias apresentavam regulação negativa de genes relacionados à via glicolítica, caracterizando um metabolismo menor ao longo do desenvolvimento do biofilme (ALLAN et al., 2014). *Leptospira biflexa*, quando em biofilme, apresenta regulação negativa dos genes envolvidos na divisão celular e no metabolismo de açúcar e outras moléculas, o que caracteriza também uma diminuição do metabolismo (IRAOLA et al., 2016). É possível que o menor crescimento no biofilme observado no nosso trabalho esteja relacionado com a redução do metabolismo das bactérias nesse fenótipo.

De acordo com a literatura o tempo de geração para leptospiras saprofíticas planctônicas, usando quantificação por espectrofotometria, é de 4,5 horas (HENNEBERRY; BASEMAN; COX, 1970). Encontramos os valores de tempo de geração de 6,43 horas para as bactérias planctônicas e 5,6 para bactérias no biofilme. Usamos um método de contagem direta por microscopia de campo escuro, que é considerado um método mais preciso para quantificação de leptospiras (SCHREIER et al., 2009), o que pode explicar a diferença dos valores aqui encontrados.

O crescimento de leptospiras no biofilme foi menor, mas não foi mais lento, evidenciado pelos tempos de geração, que não apresentaram diferenças entre os fenótipos. No estudo de Wang e colaboradores (2015), foram encontradas diferenças no crescimento de *E. coli* no biofilme, que foi mais lento, conseqüentemente com maior tempo de geração. Um estudo com *P. aeruginosa*, da mesma forma, mostrou que as bactérias apresentam um atraso no crescimento no biofilme em comparação com as células no estado planctônico (RICE; HAMILTON; CAMPER, 2000).

O tamanho celular de leptospiiras, em ambos os fenótipos, está de acordo com o descrito na literatura, variando de 6 a 20 μm . (CAMERON, 2014). Embora não tenha sido observada diferença entre os tamanhos médios de leptospiiras ao longo do tempo, quando essa análise foi feita considerando apenas a fase estacionária, observamos um maior tamanho de leptospiiras no estado de biofilme, comparado ao estado planctônico. Duas vias são relacionadas à regulação do tamanho celular em bactérias: a via dependente de nutrientes (SCHAECHTER; MAALOE E KJELDGAARD, 1958; VADIA; LEVIN, 2015; TAHERI-ARAGHI et al., 2015) e a via dependente de densidade (WANG et al., 2015). *B. subtilis* e *E. coli* apresentam tamanho celular maior quando cultivados em meio rico de nutrientes (MARSHALL et al., 2012; CHIEN; HILL; LEVIN, 2012; HAEUSSER; LEVIN, 2008). O mecanismo subjacente ao controle do tamanho celular dependente de nutrientes é a regulação da proteína de divisão FtsZ, que na presença de nutrientes tem sua ação inibida retardando a divisão e alongando o tamanho celular, mecanismos já estabelecidos em também em *B. subtilis* e *E. coli* (WEART et al., 2007; HILL et al., 2013).

A via dependente de densidade propõe que as bactérias diminuem o tamanho à medida que a densidade celular aumenta, visto que aumenta a secreção de moléculas que atuam como sinalizadoras, regulando o tamanho umas das outras (GOMER; JANG; BRAZILL, 2011; TOSTEVIN, 2011; FERKINGHOFF-BORG; SAMS, 2014).

Wang e colaboradores (2015) encontraram as duas vias atuando no biofilme de *E. coli*, reduzindo o tamanho celular. Em concentrações celulares menores o tamanho celular era regulado pela via dependente de nutrientes, mas quando a concentração populacional aumentava, a via dependente de densidade passava a regular o ciclo de divisão, diminuindo o tamanho celular.

Embora não tenha sido possível determinar a via atuante na regulação do tamanho celular no biofilme de *L. biflexa*, observamos que houve diminuição do tamanho celular em ambos os fenótipos nos tempos tardios, coincidindo com a maior concentração celular, nesse período. Analisados em conjunto, esses dados sugerem um controle de tamanho celular dependente de densidade, o que é também coerente com o menor tamanho celular de leptospiiras planctônicas em comparação com o biofilme, visto que o fenótipo planctônico alcançou uma maior concentração na fase estacionária ($1,00\text{E}+09$ cel/mL).

Nos cultivos onde houve troca de meio a cada 12 horas, não observamos aumento do tamanho celular, sugerindo que o tamanho celular em biofilme de *L. biflexa* não é regulado pela via dependente de nutrientes.

Por fim, não foram observadas diferenças no crescimento, tempo de geração e tamanho de leptospiras do biofilme com troca e sem troca de meio, sugerindo que os valores obtidos na contagem de leptospiras no fenótipo biofilme ao longo da curva de crescimento não sofrem influência da adesão de bactérias ao biofilme.

CONCLUSÕES

Leptospiras no biofilme apresentaram um crescimento menor em comparação com leptospiras planctônicas.

O tempo de geração não foi diferente entre os fenótipos.

Leptospiras no biofilme apresentaram maior tamanho celular na fase estacionária em comparação com leptospiras planctônicas.

A troca de meio de cultura não teve efeitos significativos no crescimento, tempo de geração e tamanho celular no biofilme de *L. biflexa*.

PERSPECTIVAS

Pretendemos ainda adicionar ao trabalho já realizado, mais duas réplicas do experimento de tamanho celular, tendo em vista que até o momento apenas uma foi analisada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER, Ben. History of Leptospirosis and Leptospira. **Current Topics In Microbiology And Immunology**, [s.l.], p.1-9, 12 nov. 2014. Springer Berlin Heidelberg. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_1.
- ALLAN, Raymond N. et al. Pronounced Metabolic Changes in Adaptation to Biofilm Growth by *Streptococcus pneumoniae*. **Plos One**, [s.l.], v. 9, n. 9, p.1-16, 4 set. 2014. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0107015>.
- ALTERTHUM, Flávio; TRABULSI, Luiz Rachid. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 780 p.
- BARRAGAN, Veronica A. et al. Interactions of *Leptospira* with Environmental Bacteria from Surface Water. **Current Microbiology**, [s.l.], v. 62, n. 6, p.1802-1806, 10 abr. 2011. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-011-9931-3>.
- BELOIN, Christophe; ROUX, Agnès; GHIGO, Jean-marc. *Escherichia coli* biofilms. **Curr Top Microbiol Immunol.**, [s.l.], v. 322, p.249-289, 2008.
- BOURQUE, Daniel L.; VINETZ, Joseph M.. Illnesses Associated with Freshwater Recreation During International Travel. **Current Infectious Disease Reports**, [s.l.], v. 20, n. 7, p.18-24, 22 maio 2018. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11908-018-0623-z>.
- BRASIL. Secretaria da Saúde da Bahia. Sesab. Boletim epidemiológico de leptospirose Bahia 2017. Boletim epidemiológico. Bahia, 2, 2017. Disponível em: <http://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2017/11/Boletim-Epidemiol%C3%B3gico-de-Leptospirose-Bahia-2017-n2.pdf>. Acesso em: 21 mar. 2018.
- CAMERON, Caroline E.. Leptospiral Structure, Physiology, and Metabolism. **Current Topics In Microbiology And Immunology**, [s.l.], p.21-41, 12 nov. 2014. Springer Berlin Heidelberg. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_3.
- CHIEN, An-chun; HILL, Norbert s.; LEVIN, Petra anne. Cell Size Control in Bacteria. **Current Biology**, [s.l.], v. 22, n. 9, p.340-349, maio 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2012.02.032>.
- COSTA, Federico et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [s.l.], v. 9, n. 9, p.1-19, 17 set. 2015. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0003898>.

CROUZET, Marc et al. Exploring early steps in biofilm formation: set-up of an experimental system for molecular studies. **Bmc Microbiology**, [s.l.], v. 14, n. 1, p.1-2, 30 set. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s12866-014-0253-z>.

DEPAS, William H. et al. Biofilm Formation Protects Escherichia coli against Killing by Caenorhabditis elegans and Myxococcus xanthus. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 80, n. 22, p.7079-7087, 5 set. 2014. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.02464-14>.

ELLIS, William A.. Animal Leptospirosis. **Current Topics In Microbiology And Immunology**, [s.l.], p.99-137, 12 nov. 2014. Springer Berlin Heidelberg. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_6.

FAINE, S.. **Leptospira and Leptospirosis**. 2. ed. Madinson: Medisci, 1999. 272 p.

FERKINGHOFF-BORG, Jesper; SAMS, Thomas. Size of quorum sensing communities. **Mol. Biosyst.**, [s.l.], v. 10, n. 1, p.103-109, 2014. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c3mb70230h>.

FLEMMING, Hans-curt et al. Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nature Reviews Microbiology**, [s.l.], v. 14, n. 9, p.563-575, set. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>.

FLEMMING, Hans-curt; WINGENDER, Jost. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, [s.l.], v. 8, n. 9, p.623-633, 2 ago. 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2415>.

FONTANA, Célia et al. Use of flow cytometry for rapid and accurate enumeration of live pathogenic Leptospira strains. **Journal Of Microbiological Methods**, [s.l.], v. 132, p.34-40, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2016.10.013>.

GOMER, Richard H.; JANG, Wonhee; BRAZILL, Derrick. Cell density sensing and size determination. **Development, Growth & Differentiation**, [s.l.], v. 53, n. 4, p.482-494, 27 abr. 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-169x.2010.01248.x>.

GUIMARÃES, Raphael Mendonça et al. Análise temporal da relação entre leptospirose e ocorrência de inundações por chuvas no município do Rio de Janeiro, Brasil, 2007-2012. **Ciência & Saúde Coletiva**, [s.l.], v. 19, n. 9, p.3683-3692, set. 2014. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1413-81232014199.06432014>.

HAAKE, David A.; LEVETT, Paul N.. Leptospirosis in Humans. **Current Topics In Microbiology And Immunology**, [s.l.], p.65-97, 12 nov. 2014. Springer Berlin Heidelberg. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_5.

HAEUSSER, Daniel P; LEVIN, Petra Anne. The great divide: coordinating cell cycle events during bacterial growth and division. **Current Opinion In Microbiology**, [s.l.], v. 11, n. 2, p.94-99, abr. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2008.02.008>.

HALL-STOODLEY, Luanne; COSTERTON, J. William; STOODLEY, Paul. Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews Microbiology**, [s.l.], v. 2, n. 2, p.95-108, fev. 2004. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro821>.

HALL-STOODLEY, Luanne; STOODLEY, Paul. Evolving concepts in biofilm infections. **Cellular Microbiology**, [s.l.], v. 11, n. 7, p.1034-1043, jul. 2009. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01323.x>.

HILL, Norbert S. et al. A Moonlighting Enzyme Links Escherichia coli Cell Size with Central Metabolism. **Plos Genetics**, [s.l.], v. 9, n. 7, p.1-2, 25 jul. 2013. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1003663>.

IRAOLA, Gregorio et al. Transcriptome Sequencing Reveals Wide Expression Reprogramming of Basal and Unknown Genes in *Leptospira biflexa* Biofilms. **Msphere**, [s.l.], v. 1, n. 2, p.1-16, 6 abr. 2016. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/msphere.00042-16>.

JOHNSON, Russell C.. *Leptospira*. In: BARON, Samuel. **Medical Microbiology**. 4. ed. Texas: University Of Texas Medical Branch At Galveston, 1996. Cap. 35.

KIM, Eun-a; KANG, Seong-kyu. Historical review of the List of Occupational Diseases recommended by the International Labour organization (ILO). **Annals Of Occupational And Environmental Medicine**, [s.l.], v. 25, n. 1, p.14-23, 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/2052-4374-25-14>.

KONG, Cin et al. Suppression of *Staphylococcus aureus* biofilm formation and virulence by a benzimidazole derivative, UM-C162. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.1-16, 9 fev. 2018. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-21141-2>.

KRUPKA, Marcin et al. *Escherichia coli* FtsA forms lipid-bound minirings that antagonize lateral interactions between FtsZ protofilaments. **Nature Communications**, [s.l.], v. 8, 11 jul. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms15957>.

KUMAR, K. Vinod et al. Coexistence and survival of pathogenic leptospire by formation of biofilm with *Azospirillum*. **Fems Microbiology Ecology**, [s.l.], v. 91, n. 6, p.1-27, 10 maio 2015. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/femsec/fiv051>.

KWON, Young-jun; LEE, Soo-jin. Compensation for Occupational Injuries and Diseases in Special Populations: Farmers and Soldiers. **Journal Of Korean Medical Science**, [s.l.], v. 29, n. , p.24-31, 2014. Korean Academy of Medical Sciences (KAMJE). <http://dx.doi.org/10.3346/jkms.2014.29.s.s24>.

LAMBERT, Ambroise et al. FlaA Proteins in *Leptospira interrogans* Are Essential for Motility and Virulence but Are Not Required for Formation of the Flagellum Sheath. **Infection And Immunity**, [s.l.], v. 80, n. 6, p.2019-2025, 26 mar. 2012. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.00131-12>.

LEVETT, Paul N.. Systematics of Leptospiraceae. **Current Topics In Microbiology And Immunology**, [s.l.], p.11-20, 12 nov. 2014. Springer Berlin Heidelberg. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_2.

LEVETT, Paul N.. Systematics of Leptospiraceae. **Current Topics In Microbiology And Immunology**, [s.l.], p.11-20, 12 nov. 2014. Springer Berlin Heidelberg. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_2.

LOMAR, Andre V.; DIAMENT, Decio; TORRES, Jaime R.. LEPTOSPIROSIS IN LATIN AMERICA. **Infectious Disease Clinics Of North America**, [s.l.], v. 14, n. 1, p.23-39, mar. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0891-5520\(05\)70216-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0891-5520(05)70216-6).

LOOSE, Martin; MITCHISON, Timothy J.. The bacterial cell division proteins FtsA and FtsZ self-organize into dynamic cytoskeletal patterns. **Nature Cell Biology**, [s.l.], v. 16, n. 1, p.38-46, 8 dez. 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2885>.

MADIGAN, Michael T. et al. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. 987 p.

MARSHALL, Wallace F et al. What determines cell size? **Bmc Biology**, [s.l.], v. 10, n. 1, p.101-120, 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1741-7007-10-101>.

MARTIN, Fabiana San et al. Crystallization of FcpA from *Leptospira*, a novel flagellar protein that is essential for pathogenesis. **Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications**, [s.l.], v. 73, n. 3, p.123-129, 21 fev. 2017. International Union of Crystallography (IUCr). <http://dx.doi.org/10.1107/s2053230x17002096>.

MURA, Andrea et al. Roles of the Essential Protein FtsA in Cell Growth and Division in *Streptococcus pneumoniae*. **Journal Of Bacteriology**, [s.l.], v. 199, n. 3, p.08-16, 21 nov. 2016. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.00608-16>.

OTTO, Michael. Staphylococcal Biofilms. **Curr Top Microbiol Immunol.**, [s.l.], v. 322, p.207-228, 2008.

PETRAKOVSKY, Jessica et al. Animal Leptospirosis in Latin America and the Caribbean Countries: Reported Outbreaks and Literature Review (2002–2014). **International Journal Of Environmental Research And Public Health**, [s.l.], v. 11, n. 10, p.10770-10789, 16 out. 2014. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph111010770>.

PICARDEAU, M.. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. **Médecine Et Maladies Infectieuses**, [s.l.], v. 43, n. 1, p.1-9, jan. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.medmal.2012.11.005>.

RICE, A.r.; HAMILTON, M.a.; CAMPER, A.k.. Apparent Surface Associated Lag Time in Growth of Primary Biofilm Cells. *Microbial Ecology*, [s.l.], v. 40, n. 1, p.8-15, jul. 2000. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s002480000011>.

RISTOW, P. et al. Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires. **Microbiology**, [s.l.], v. 154, n. 5, p.1309-1317, 1 maio 2008. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.2007/014746-0>.

RITTERSHAUS, Emily s.c.; BAEK, Seung-hun; SASSETTI, Christopher m.. The Normalcy of Dormancy: Common Themes in Microbial Quiescence. **Cell Host & Microbe**, [s.l.], v. 13, n. 6, p.643-651, jun. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2013.05.012>.

SANTOS, Ana Amélia Nunes. **Identificação de biofilme renal em ratos naturalmente infectados por *Leptospira interrogans* através de técnicas histoquímicas e de microscopia eletrônica de varredura**. 2015. 64 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2015.

SAPI, Eva et al. Characterization of Biofilm Formation by *Borrelia burgdorferi* In Vitro. **Plos One**, [s.l.], v. 7, n. 10, p.1-11, 24 out. 2012. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0048277>.

SCHAECHTER, M.; MAALOE, O.; KJELDGAARD, N. O.. Dependency on Medium and Temperature of Cell Size and Chemical Composition during Balanced Growth of *Salmonella*

typhimurium. **Journal Of General Microbiology**, [s.l.], v. 19, n. 3, p.592-606, 1 dez. 1958. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-19-3-592>.

SCHREIER, Stefan et al. Leptospirosis research: fast, easy and reliable enumeration of mobile leptospire. **Biological Research**, [s.l.], v. 42, n. 1, p.5-12, 2009. SciELO Comision Nacional de Investigacion Cientifica Y Tecnologica (CONICYT). <http://dx.doi.org/10.4067/s0716-97602009000100001>.

SEGURO, Antonio Carlos; ANDRADE, Lúcia. Pathophysiology of Leptospirosis. **Shock**, [s.l.], v. 39, p.17-23, maio 2013. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/shk.0b013e31828fae49>.

SHARMA, G. et al. Escherichia coli biofilm: development and therapeutic strategies. **Journal Of Applied Microbiology**, [s.l.], v. 121, n. 2, p.309-319, 11 mar. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jam.13078>.

SINGH, R. et al. Microbial Diversity of Biofilms in Dental Unit Water Systems. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 69, n. 6, p.3412-3420, 1 jun. 2003. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.69.6.3412-3420.2003>.

SMITH, William P. J. et al. Cell morphology drives spatial patterning in microbial communities. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 114, n. 3, p.280-286, 30 dez. 2016. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1613007114>.

TAHERI-ARAGHI, Sattar et al. Cell-Size Control and Homeostasis in Bacteria. **Current Biology**, [s.l.], v. 25, n. 3, p.385-391, fev. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2014.12.009>.

TIMMARAJU, Venkata Arun et al. Biofilm formation by *Borrelia burgdorferi* sensu lato. **Fems Microbiology Letters**, [s.l.], v. 362, n. 15, p.1-11, 24 jul. 2015. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/femsle/fnv120>.

TOSTEVIN, Filipe. Precision of Sensing Cell Length via Concentration Gradients. **Biophysical Journal**, [s.l.], v. 100, n. 2, p.294-303, jan. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2010.11.046>.

VADIA, Stephen; LEVIN, Petra Anne. Growth rate and cell size: a re-examination of the growth law. **Current Opinion In Microbiology**, [s.l.], v. 24, p.96-103, abr. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2015.01.011>.

VALCOURT, James R. et al. Staying alive. **Cell Cycle**, [s.l.], v. 11, n. 9, p.1680-1696, maio 2012. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.4161/cc.19879>.

WANG, Liyun et al. Bacterial growth, detachment and cell size control on polyethylene terephthalate surfaces. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.1-11, 14 out. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/srep15159>

WEART, Richard B. et al. A Metabolic Sensor Governing Cell Size in Bacteria. **Cell**, [s.l.], v. 130, n. 2, p.335-347, jul. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.043>.

YAMADA, Mitsunori; IKEGAMI, Akihiko; KURAMITSU, Howard K.. Synergistic biofilm formation by *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis*. **Fems Microbiology Letters**, [s.l.], v. 250, n. 2, p.271-277, set. 2005. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1016/j.femsle.2005.07.019>.