

Vliv rozpouštědla krystalové violeti na hodnocení produkce biofilmu

A. Siváková, F. Růžička, V. Holá, M. Dvořáčková, M. Mahelová, T. Peroutková

Mikrobiologický ústav Lékařské fakulty Masarykovy univerzity a Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně, Brno, CZ

Summary

Biofilm formation is considered to be one of virulence factor of microorganisms [1]. It helps them to colonize any environment, in medicine especially artificial materials such as plastic catheters. Biofilm is also hard to eradicate because of its high resistance to antimicrobials. There are several different techniques to visualize biofilm like fluorescence, high-resolution microscopic techniques or radiolabeling [2]. One of the commonly used method for the indirect quantification is staining with crystal violet [3, 4]. In our study we tested three different chemicals to dissolve crystal violet before the optical density of the solution was spectrophotometrically measured. We tried ethanol, ethanol with HCl (100:3) and 33% glacial acetic acid for releasing the bound dye [3]. We concluded that there was a significant difference in their ability to dissolve crystal violet. The most efficient media for resolubilization of crystal violet was 33% glacial acetic acid [5].

Úvod

Tvorba biofilmu je považována za jeden z faktorů virulence bakterií. Díky tomuto způsobu růstu mohou kolonizovat jim jinak nepříznivá prostředí, a také jsou mnohem odolnější vůči antibiotikům. Metod průkazu biofilmu je mnoho a mezi jednu z nejjednodušších a nejběžnějších patří kultivace v mikrotitrační destičce barvená krystalovou violetí.

Materiály a metody

Pro testy byly použity následující sbírkové kmeny: *S. epidermidis* (CCM7221), *C. albicans* (SC5314), *C. albicans* (GDH2346), *C. tropicalis* (AAHB73). Dále bylo použito 6 klinických kmenů: *Enterobacter cloacae*, *S. aureus*, 2 kmeny *P. aeruginosa* a 2 kmeny *C. parapsilosis*.

Jako médium ke kultivaci biofilmu byl použit BHI (HiMedia, India) bujón s přidavkem 4 % glukózy.

Kmeny byly nejprve suspendovány ve sterilním fyziologickém roztoku do výsledné hodnoty zákalu 0,5 McFarland. Z takto získané homogenní suspenze bylo odebráno 50 µl a přeneseno do zkumavky obsahující 4 950 µl sterilního BHI bujónu se 4 % glukózy. Obsah byl opět homogenizován na vortexu 10 s. Poté bylo odebráno 200 µl suspenze živného média s kmenem a přeneseno do jamky s plochým dnem v mikrotitrační destičce pro tkáňové kultury (GAMA GROUP a.s., Česká republika). Jakmile byla destička zaplněná, vzorky se ponechaly 24 hod aerobně kultivovat při teplotě 37°C, poté byly jamky 3x promyty 250 µl sterilního fyziologického roztoku a fixovány sušením při 37°C přes noc.

Zafixované destičky byly barveny 15 min 250 µl krystalové violeti. Zbytky nenavázaného barviva byly odstraněny promýváním pod tekoucí vodou, což se opakovalo 4x. Po opláchnutí byly destičky osušeny a ponechány 2 hod při pokojové teplotě.

Do nabarvených destiček bylo napipetováno 150 µl rozpouštědla, které se nechalo působit 15 min. Jako rozpouštědlo jsme postupně vyzkoušeli 95% denaturovaný ethanol, kyselý alkohol (směs 100 ml 95% ethanolu a 3 ml koncentrované HCl) a 33% kyselinu octovou. Po vyluhování barviva bylo 100 µl eluátu přeneseno do jamek s plochým dnem čisté

mikrotitrační destičky (GAMA GROUP a.s., Česká republika). Absorbance jednotlivých eluátů byla měřena pomocí spektrofotometru (Anthos Labtec Instruments 10.500, Austria) při vlnové délce 595 nm, referenční filtr 690 nm. Pro zvýšení přesnosti měření, kvůli intenzivnímu zbarvení některých eluátů, byly eluáty dále ředěny v poměru 1:1 destilovanou vodou a jejich absorbance byla opět hodnocena spektrofotometricky.

Mikrotitrační destička s biofilmem byla po eluci opláchnuta pod tekoucí vodou. Po usušení byly jednotlivé jamky dále eluovány 150 µl 33% kyseliny octové 15 min. Absorbance jednotlivých eluátů byla měřena spektrofotometricky při vlnové délce 595 nm, referenční filtr 690 nm.

Výsledky

Nejlépe vytvořily biofilm kmeny *S. epidermidis*, *S. aureus* a *C. tropicalis*. Tyto kmeny měly odečtenou hodnotu absorbance v neředěném eluátu s kyselinou octovou vyšší než 1,7. Všechny kmeny *C. albicans* a *C. parapsilosis* tvořily biofilm v BHI se 4 % glukózy pouze slabě, hodnota jejich absorbance byla v průměru 0,1 – 0,3 . Kmeny *E. cloacae* a *P. aeruginosa* byly středně silnými producenty biofilmu a hodnoty odečtených absorbancí byly v rozmezí 0,57 – 0,87.

U kmenů *S. epidermidis*, *S. aureus* a *C. tropicalis* se hodnoty odečtených absorbancí statisticky významně lišily při hladině významnosti 0,01 pro jednotlivá rozpouštědla krystalové violeti. Tento rozdíl hodnot absorbancí byl jak mezi 95% denaturovaným ethanolem a 33% kyselinou octovou, tak mezi kyselým alkoholem a 33% kyselinou octovou.

Pro kmeny *C. albicans*, *C. parapsylosis*, *E. cloacae* se neprokázal statisticky významný rozdíl mezi hodnotami absorbancí jednotlivých eluátů při použití 95% denaturovaného ethanolu, kyselého alkoholu a 33% kyseliny octové.

Diskuze a závěr

Při porovnání hodnot absorbancí u jednotlivých kmenů při použití různých rozpouštědel krystalové violeti vyšlo najevo, že hodnoty u kmenů, které silně tvoří biofilm nejsou ve statisticky významném rozmezí (hladina významnosti 0,01) totožné. Došlo k postupnému nárůstu hodnot absorbancí podle kyselosti rozpouštědla barviva. Toto lze vysvětlit tím, že krystalová violeť patří mezi zásaditá barviva [6] a je tedy lépe rozpustná v kyselých rozpouštědlech, což se projeví především při vyšší koncentraci barviva, které je třeba rozpustit. Z tohoto důvodu se zdá metoda odbarvení za použití 33% kyseliny octové jako nejlepší (tento výsledek odpovídá postupu u Stepanovic [5]).

Literatura

1. Růžička F, Holá V, Votava M, et al. Biofilm detection and the clinical significance of *Staphylococcus epidermidis* isolates. *Folia Microbiol.* 2004; 49(5): 596-600
2. Negri M, Goncalves V, Silva S, et al. Crystal violet staining to quantify *Candida* adhesion to epithelial cells. *British Journal of Biomedical Science.* 2010; 67 (3): 120-125
3. Stepanovic S, Vukovic D, Hala V, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS.* 2007; 115: 891-899
4. Hannig Ch, Follo M, Hellwig E, Al-Ahmad A. Visualization of adherent micro-organisms using different techniques. *Journal of Medical Microbiology.* 2010; 59: 1-7
5. Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods.* 2000; 40: 175-179
6. Müller J, Chytil F. Barviva v mikroskopické technice. 1. vyd. Praha: Academia; 1966. s. 215

