

**AValiação DA ADEsão DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ATRAVÉS DE  
ELETROMICROGRAFIA DE VARREDURA EM CUPONS DE NÁILON E  
POLIESTIRENO.**

NAYANE APARECIDA ARAUJO DIAS<sup>1</sup>, ALEXANDRE CRISTIANO SANTOS JUNIOR<sup>2</sup>,  
DANILA CAIXETA<sup>3</sup>, ALESSANDRA PEREIRA SANT'ANNA SALIMENA<sup>4</sup>, ROBERTA  
HILSDORF PICCOLI<sup>5</sup>, EDUARDO ALVES<sup>6</sup>

## RESUMO

Este trabalho foi realizado com o intuito de visualizar e analisar se houve a formação biofilme bacteriano pela *Pseudomonas aeruginosa*, em superfícies de náilon e poliestireno (isopor). Foi realizada a higienização dos cupons de poliestireno e náilon. Após este processo foi proporcionada a adesão das células bacterianas aos cupons utilizando a bactéria *Listeria monocytogenes*. Foi realizado o procedimento para fixação dos cupons e posteriormente a visualização no microscópio eletrônico de varredura Evo 040 Leo. Houve dificuldade de adesão das células bacterianas de *Pseudomonas aeruginosa* na superfície de náilon, caracterizando a não formação de biofilme e alto crescimento destas células no isopor, caracterizando a formação ideal de biofilme.

**Palavras-chaves:** Biofilme, cupons, náilon, poliestireno, eletromicrografias.

## INTRODUÇÃO

Os biofilmes são complexos ecossistemas microbianos, que podem ser formados por populações desenvolvidas a partir de uma única, ou de múltiplas espécies, podendo ser encontrados em uma variedade de superfícies bióticas e/ou abióticas. Nikolaev e Plakunov (2007), definem biofilme como uma comunidade de células bacterianas irregularmente estruturada, aderente a uma superfície envolvida em uma matriz de substância polimérica extracelular.

Geralmente, a dinâmica de formação de um biofilme ocorre em etapas distintas. Inicialmente temos os organismos denominados colonizadores primários, que se adere a uma superfície contendo compostos orgânicos que servem de substratos para seu desenvolvimento. As células aderidas passam a se desenvolver, originando microcolônias que sintetizam uma matriz exopolissacarídica (EPS), que passam a atuar como substrato para a aderência de microrganismos denominados colonizadores secundários. Estes colonizadores secundários podem se aderir diretamente aos primários, ou promoverem a formação de agregados com outros microrganismos (Garrett et al., 2008).

A formação de biofilmes produz um ambiente dinâmico, no qual células microbianas se encontram em estado de homeostase, organizadas de maneira a utilizar todos os nutrientes disponíveis (Sutherland, 2001). Biofilmes microbianos podem existir como agregados mais ou menos confluentes, em camadas únicas ou arquitetadas tridimensionais (Stoodley et al., 2002). Quando constituídos por várias camadas de células, apresentam canais que permitem fluxo de líquido e gases, dispersão de nutrientes e descarte de componentes (Lindsay et al., 2008).

Segundo Kumar e Anand (1998), o biofilme pode ser desenvolvido em praticamente todo tipo de superfície e em qualquer meio ambiente no qual os microrganismos viáveis estão presentes. Para isto, deve ser estabelecido o que se chama condicionamento da superfície.

É evidente que o microrganismo sempre adere a uma superfície condicionante. Portanto, a microtopografia da superfície de contato com o alimento é igualmente importante, já que essa superfície pode conter canais e fissuras onde a bactéria pode se alojar e fixar. Dessa maneira, os

---

<sup>1</sup> Mestranda em Ciência dos Alimentos, DCA/ UFLA, nayaneadias@yahoo.com.br

<sup>2</sup> Mestrando em Ciência dos Alimentos, DCA/ UFLA, junincs2009@hotmail.com

<sup>3</sup> Doutoranda em Microbiologia agrícola, DBI/UFLA, danilacaixeta@hotmail.com

<sup>4</sup> Mestranda em Microbiologia agrícola, DBI/UFLA, alesantanna2004@hotmail.com

<sup>5</sup> Professor Adjunto, orientador, DCA/UFLA, rhpiccoli@dca.ufla.br

<sup>6</sup> Professor Adjunto, DFP/UFLA, ealves@ufla.br

microrganismos podem aderir ao aço inoxidável, ao alumínio, ao vidro, à borracha, ao teflon, ao náilon, à fórmica, ao polipropileno, ao poliestireno e ao ferro forjado (Kumar e Anand, 1998). As características macroscópicas, e particularmente as microscópicas das superfícies, são determinantes para maior ou menor adesão microbiana, com reflexos na contaminação dos alimentos por microrganismos deterioradores ou patogênicos (Andrade, 2004). A microtopografia da superfície pode dificultar os procedimentos de limpeza, quando fendas e outras imperfeições criam condições para abrigar as células.

Uma superfície mal higienizada, somada à capacidade de adesão de um microrganismo, pode se tornar uma fonte potencial de contaminação e levar à formação de biofilmes. Estes, uma vez formados, são de difícil remoção, sendo importante evitá-los nos processos iniciais, pois quando os microrganismos organizados em biofilme têm sua fisiologia modificada, tornando-se mais resistentes aos agentes antimicrobianos, antibióticos e sanificantes, disponíveis no mercado (Harrison et al., 2005).

A eliminação do biofilme normalmente requer o uso de detergentes alcalinos, ácidos e/ou iodóforos, no entanto, esses geram alguns efeitos adversos como corrosão, contaminação do produto, toxicidade e a rápida resistência de algumas espécies microbianas.

Os biofilmes são de interesse na indústria, pois as bactérias que chegam a formar esses biofilmes são mais difíceis de ser eliminadas do que as células planctônicas. Uma vez estabelecido, o biofilme pode atuar como fonte de contaminação para produtos processados e outras superfícies (Sharma e Anand, 2002). A adesão e formação de biofilmes bacterianos podem ser indesejáveis sob vários aspectos numa planta de processamento. Estas podem diminuir a transferência de calor em trocadores de calor, diminuir o fluxo em tubulações, desencadear processos corrosivos e principalmente tornarem-se fonte de contaminação microbiana (Arcuri, 2000).

Atualmente os estudos sobre biofilmes microbianos, tanto na área médica quanto na área industrial, tem sido de grande relevância, devido as graves conseqüências que podem causar à saúde pública. Assim o objetivo deste trabalho, é visualizar e analisar se houve a formação biofilme bacteriano pela *Pseudomonas aeruginosa*, em superfícies de náilon e poliestireno (isopor), utilizando a microscopia eletrônica de varredura.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA) e no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra Estrutural do Departamento de Fitopatologia (DFP) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), onde foram realizados, os procedimentos para formação do biofilme em superfícies e a visualização utilizando a microscopia eletrônica de varredura.

O biofilme bacteriano foi formado a partir de uma cultura de *Pseudomonas aeruginosa* pertencente ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos, em cupons de náilon e isopor com 1 mm de espessura e dimensões de 10 x 20 mm aproximadamente.

Os cupons contendo células bacterianas aderidas, foram imersos em solução fixadora (Karnovsky modificado), pH 7,2, pelo período de 48 horas. Após este período, os cupons foram lavados com tampão cacodilato 0,05M por três vezes de 10 minutos, e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1%, em água, por 1 hora. Após este período, estes foram lavados por três vezes em água destilada e, em seguida, desidratados em gradiente de etanol (25%, 50%, 70% e 90%, por 10 minutos; 100% por duas vezes de 10 minutos). Em seguida, o material foi levado ao aparelho de ponto crítico (Bal-Tec CPD 030) para completar a secagem, montados em stubs e cobertos com ouro utilizando o aparelho metalizador (Bal-Tec SCD 050). No final desse procedimento, foram obtidas eletromicrografias das células bacterianas aderidas à superfície de náilon e isopor, usando-se microscópio eletrônico de varredura Evo 040 Leo (Alves, 2004).

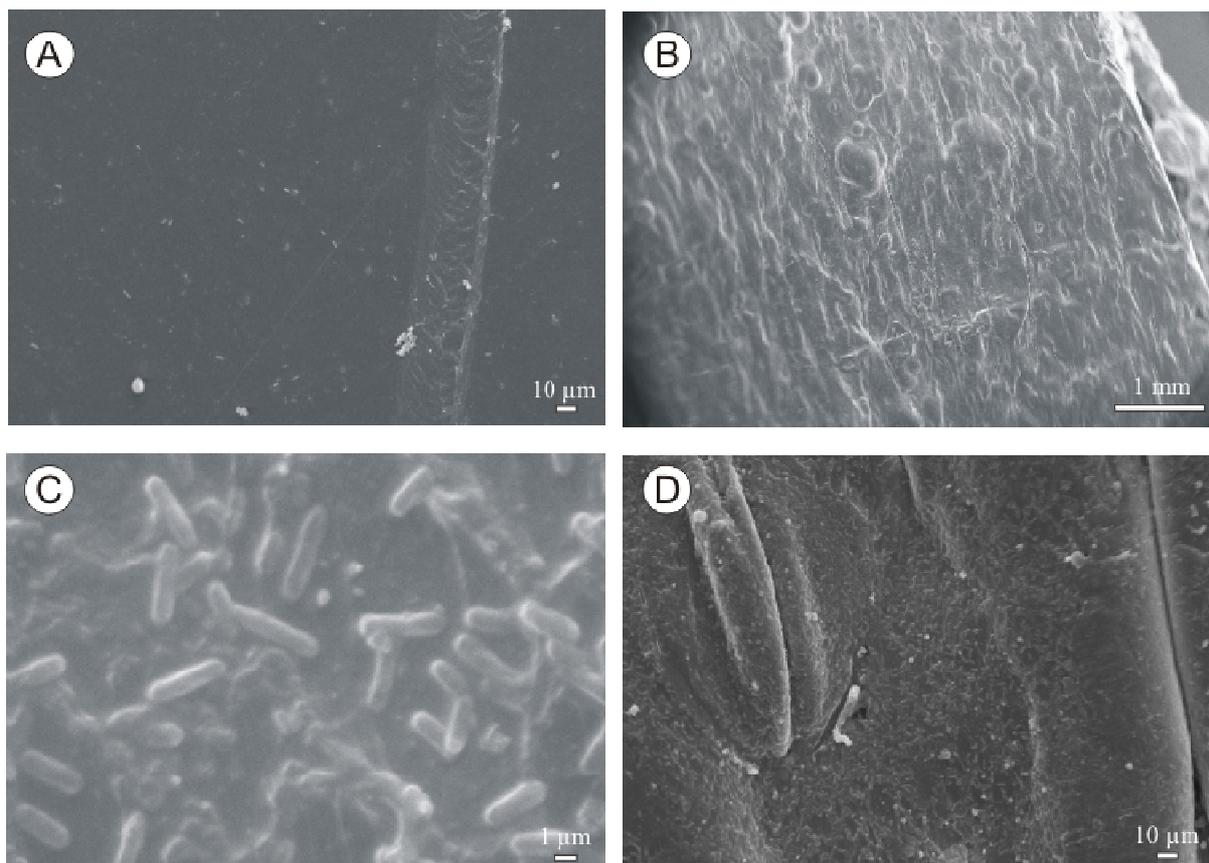
## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Conforme visualizado na (figura 1) pelas eletromicrografias de varredura, a superfície do náilon (A) é muito lisa, enquanto a superfície do isopor é bem irregular (B) apresentando muitas

fissuras. Conhecer a eletromicrografia da superfície é importante, já que essa pode conter canais e fissuras onde a bactéria pode se alojar e fixar, sendo determinante para maior ou menor adesão microbiana, (Kumar e Anand, 1998; Andrade, 2004).

Pode-se observar que as células bacterianas de *Pseudomonas aeruginosa* apresentaram dificuldade em se aderir na superfície de náilon, formando um pequeno agregado de células aderidas não caracterizando a formação de um biofilme sendo demonstrado na eletromicrografia (A).

A superfície de isopor (D) provavelmente devido a sua irregularidade, favorece a adesão e crescimento das células de *Pseudomonas aeruginosa* caracterizando a formação de biofilme, ou seja, uma comunidade de células bacteriana irregularmente estruturada, aderidas e bem distribuída por grande parte da superfície (Harrison et al., 2005).



**FIGURA1:** Eletromicrografias de cupons de náilon e poliestireno com adesão de células bacterianas de *Listeria monocytogenes*.

A eletromicrografia (C) demonstra com mais detalhes as células bacterianas de *Pseudomonas aeruginosa* organizada em biofilme, nota-se que estas células apresentam forma de bastonete e algumas se encontram ainda em processo de fissão binária. Além disso, não foi possível distinguir a presença de exopolissacarídeos, que geralmente são produzidos por estas células quando organizadas em biofilme.

As bactérias e outros microrganismos têm tendência natural de aderir a superfícies como mecanismo de sobrevivência, no entanto, a colonização bacteriana a superfícies sólidas tem sido descrita como estratégia básica e natural em uma variedade de ambientes (Cappello e Guglielmino, 2006). A adesão de bactérias à superfície depende de parâmetros microbiológicos, físicos, químicos e relacionados ao material. Portanto, a microtopografia da superfície tem sido largamente estudada, uma vez que microrganismos alocados em rachaduras ou fendas podem escapar de procedimentos de limpeza e desinfecção, e posteriormente, podem vir a contaminar ou a recontaminar produtos alimentícios durante o processamento, ou ainda proporcionar a continuação da formação de biofilme na superfície (Hilbert et al., 2003).

## CONCLUSÃO

As eletromicrografias obtidas neste trabalho revelaram dificuldade de adesão das células bacterianas de *Pseudomonas aeruginosa* em aderir em superfície de náilon, caracterizando a não formação de biofilme, em contrapartida houve a formação do biofilme em cupons de isopor.

## AGRADECIMENTOS

Aos agentes financiadores: CAPES, FAPEMIG, CNPQ.

## REFERÊNCIAL BIBLIOGRÁFICO

ALVES, E. **Curso: introdução à microscopia eletrônica de varredura e de transmissão**. FAEPE: Universidade Federal de Lavras, 2004.

ANDRADE, N. J. Aspectos de importância na higienização na indústria de laticínios. In: WORKSHOP SOBRE DESENVOLVIMENTO NO SETOR DE LEITE, 2., 2004, Viçosa. **Anais...** Viçosa, MG: UFV, 2004. 14 p.

ARCURI, E.F. Biofilmes bacterianos na indústria de alimentos. **Revista Leite e Derivados**, v.9, n.53, p.40-45, 2000.

CAPELLO, S.; GUGLIELMINO, S.P.P. Effects of growth temperature on polystyrene adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. **Brazilian Journal of Microbiology**, n.37, p.205-207, 2006.

GARRETT, T. R.; BHAKOO, M.; ZHANG, Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. **Progress in Natural Science**, v. 18, p. 1049-1056, 2008.

HARRISON, J.; TURNER, R.; MARQUES, L.; CERI, H. A new understanding of these microbial communities is driving a revolution that may transform the science of microbiology. **American Scientist Classics.**, v. 93, n. 6., 2005.

HILBERT, L.R.; BAGGE-RAVN, D.; KOLD, J.; GRAM, L. Influence of surface roughness of stainless steel on microbial adhesion and corrosion resistance. **International Biodeterioration e Biodegradation**, n.52, p.173-185, 2003.

KUMAR, C.G., ANAND, S.K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.42, p.9-27, 1998.

LINDSAY, D.; NTOAMPE, M.; GRAY, V. M. Biodegradation of sodium benzoate by a Gram-negative consortium in a laboratory-scale fluidized bed bioreactor. **Bioresource Technology**. v. 99, 2008. p. 5115-5119.

NIKOLAEV, Y.A.; PLAKUNOV, V. K. biofilm: "City of Microbes" or an analogue of multicellular organisms? **Microbiology**, London, v.76, n.2, p.125-138, 2007.

SHARMA, M.; ANAND, S.K. Characterization of constitutive microflora of biofilms in dairy processing lines. **Food Microbiology**, v.19, p. 627-636,. 2002.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D. G.; COSTERTON, J. W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review in Microbiology**, Palo Alto, v.56, p.187-209, 2002.

**XIX CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA**  
**27 de setembro a 01 de outubro de 2010**

---

SUTHERLAND, I.W. The biofilm matrix: an immobilized but dynamic microbial environment. **Trends in microbiology**, London, v.9, n.5, p.222-227, 2001.