AVALIAÇÃO DE ADERÊNCIA DE *Pseudomonas aeruginosa* EM SUPERFÍCIES RELEVANTES: IMPLICAÇÕES PARA SAÚDE E INDÚSTRIA ALIMENTÍCIA

Victória Corrêa de Oliveira (PIC/UEM), Jean Lopes da Silva, Isabelly Vitoria Da Silva Gonçalves, Emilly Brito Ferreira (Coorientadora), Fabrícia Gimenes (Orientadora). E-mail: fgimenes@uem.br

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Ciências Biológicas / Microbiologia

Palavras-chave: Biofilme; superfícies de contato; adesão bacteriana

RESUMO

Os biofilmes são comunidades microbianas aderidas a superfícies, capazes de persistir em diferentes ambientes e dificultar processos de higienização. *Pseudomonas aeruginosa* apresenta capacidade de aderir a diferentes materiais e formar biofilme, constituindo um importante microrganismo de interesse em ambientes de saúde e na indústria alimentícia. Este estudo teve como objetivo avaliar a aderência de *P. aeruginosa* em superfícies de aço inoxidável, granito e PVC ao longo dos tempos de 0, 0,5, 2, 6, 12 e 24h. Foram utilizados cupons dos três materiais, submetidos ao contato com suspensão de *P. aeruginosa*, ajustada a aproximadamente 10^4 UFC/mL, em caldo Mueller-Hinton (MH), a 35 °C. Após cada período de incubação, os cupons foram lavados e submetidos à sonicação para recuperação das células aderidas. A suspensão obtida foi submetida a diluições seriadas e plaqueamento de 20 µl em ágar MH pelo em duplicata. Os resultados foram expressos em $\log_{10}$ UFC/cm². Como controle de esterilidade, um cupom adicional de cada material foi submetido ao mesmo procedimento de preparo, sem apresentar crescimento microbiano. Os resultados demonstraram diferenças na quantidade de células viáveis recuperadas entre os materiais e ao longo dos períodos avaliados, com maiores contagens observadas no aço inoxidável, seguido do granito e do PVC, especialmente a partir de 6 h. A manutenção de células viáveis aderidas às superfícies nos períodos subsequentes indica persistência da aderência bacteriana. Os resultados reforçam a importância do conhecimento da capacidade de aderência de *P. aeruginosa* a diferentes superfícies.

INTRODUÇÃO

Os biofilmes são comunidades microbianas estruturadas, constituídas por células aderidas a superfícies e envoltas por uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares, que favorecem a persistência bacteriana em diferentes ambientes e dificultam os processos de higienização (Flemming *et al.*, 2016). A formação de biofilmes em superfícies pode favorecer a persistência e a disseminação de

microrganismos, representando um desafio para a segurança em ambientes de saúde e na indústria de alimentos.

Entre os microrganismos associados ao desenvolvimento de biofilmes, destaca-se a *P. aeruginosa*, uma bactéria oportunista, reconhecida por sua capacidade de adaptação, persistência e colonização em diferentes superfícies. A adesão bacteriana pode ser influenciada por características do microrganismo, do meio e da superfície, como a composição e as propriedades físico-químicas do material (Alonso *et al.*, 2023). No setor alimentício, a presença de biofilmes pode dificultar a higienização e favorecer a persistência de microrganismos, contribuindo para riscos de contaminação cruzada.

Diferentes materiais apresentam características que podem influenciar a adesão bacteriana. Estudos demonstram que superfícies utilizadas em ambientes de processamento de alimentos podem favorecer a formação de biofilmes, tornando relevante compreender a interação entre os microrganismos e os materiais presentes nesses ambientes (Sharan *et al.*, 2022).

Sendo assim, este estudo teve como objetivo avaliar a aderência de *P. aeruginosa* em superfícies de aço inoxidável, granito e PVC, avaliando sua evolução ao longo dos tempos determinados.

MATERIAIS E MÉTODOS

Preparação dos cupons

Os cupons de aço inoxidável e granito foram previamente higienizados com detergente neutro e água destilada, desinfetados com álcool 70% por 1 h e autoclavados a 121ºC por 15min. Os cupons de PVC foram lavados com sabão neutro e esponja, enxaguados com água destilada, imersos em álcool 70% por 30 min e, posteriormente, em solução de hipoclorito de sódio por 24 h. Em seguida, foram enxaguados três vezes com água destilada. Os cupons secos foram submetidos a quatro ciclos de desinfecção em forno de micro-ondas, de 4 minutos a 40% de potência.

Manutenção e reativação da bactéria

Foi utilizada a cepa padrão de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, fornecida pelo Laboratório de Microbiologia de Água, Ambientes e Alimentos da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Para reativação, uma alíquota foi inoculada em MH e incubada a 35ºC por 24 horas. Foi preparada uma suspensão bacteriana ajustada à turbidez de 0,5 McFarland, correspondente a aproximadamente 10^8 UFC/mL. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas em solução salina 0,85%, até a obtenção de aproximadamente 10^5 UFC/mL.

Teste de aderência bacteriana aos materiais escolhidos

Em placas de 24 poços, foram adicionados 900 µL de caldo MH e 100 µL da suspensão bacteriana, resultando em concentração inicial de aproximadamente 10^4 UFC/mL. Em cada poço foi inserido um cupom do material a ser testado. Para cada combinação entre material e tempo de incubação, foram utilizados dois cupons,

acondicionados em poços distintos. As placas foram incubadas a 35 ºC por diferentes tempos: 0, 0,5, 2h, 6h, 12h e 24 h, sendo o tempo zero correspondente à recuperação imediatamente após a inoculação.

Após cada período de incubação, os cupons foram removidos com pinça estéril e imersos em 1mL de solução salina 0,85% por 1 min para remoção das células planctônicas. Em seguida, foram transferidos para outro microtubo contendo 1 mL de salina 0,85% (P1) e submetidos a banho ultrassônico por 5 min, a 25 kHz, para recuperação das células aderidas. A suspensão obtida (P1) foi submetida a diluições seriadas até 10^{-7}, seguidas do plaqueamento de alíquotas de 20 µL em ágar MH, em duplicata. As placas foram incubadas a 35 ºC por 24h, e as colônias foram contadas para posterior conversão dos resultados em UFC/cm^2. Foram consideradas as diluições que continham entre 6-60 colônias.

Adicionalmente, um cupom de cada material foi utilizado como controle de esterilidade, sendo submetido ao mesmo procedimento de preparo e incubado em meio de cultura. Não foi observado crescimento microbiano nos controles.

A análise estatística foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de *Tukey*, considerando-se significância estatística de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 1. Aderência de *P. aeruginosa* em diferentes superfícies ao longo do tempo.

Tratamentos	TEMPO(h)					
	0	0,5	2	6	12	24
PVC *(log.Ufc⁻¹)*	$0,00^{Ea} \pm 0,00$	$1,27^{Db} \pm 0,60$	$2,76^{Cb} \pm 0,11$	$5,18^{Bc} \pm 0,00$	$7,30^{Ac} \pm 0,05$	$7,38^{Ac} \pm 0,11$
GRANITO *(log.Ufc⁻¹)*	$0,00^{Fa} \pm 0,00$	$2,28^{Ea} \pm 0,62$	$2,84^{Da} \pm 0,11$	$5,47^{Cb} \pm 0,07$	$6,15^{Bb} \pm 0,02$	$6,63^{Bb} \pm 0,15$
INOX *(log.Ufc⁻¹)*	$1,00^{Da} \pm 0,00$	$2,29^{Ca} \pm 0,11$	$2,69^{Cb} \pm 0,00$	$6,54^{Ba} \pm 0,15$	$7,83^{Aa} \pm 0,02$	$7,90^{Aa} \pm 0,82$

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Os resultados indicaram aumento da quantidade de células viáveis recuperadas ao longo do período avaliado, com diferenças entre os materiais e os tempos de incubação. A análise estatística dos dados, realizada pelo teste de *Tukey*, evidenciou diferenças significativas ($p < 0,05$), tanto ao longo do tempo quanto entre os materiais avaliados em cada período. Entre os materiais avaliados, a partir de 6 h, o aço inoxidável apresentou as maiores contagens de células viáveis recuperadas, seguido do granito e do PVC. A maior quantidade de células viáveis recuperadas no aço inoxidável pode estar relacionada às características físico-químicas da superfície, que podem influenciar a adesão bacteriana (Ou-Yahia *et al.*, 2023). O granito apresentou valores intermediários, enquanto o PVC apresentou as menores contagens na maior parte dos tempos avaliados.

A partir de 6h, observou-se maior diferenciação entre os materiais avaliados, com aumento das contagens de células viáveis recuperadas ao longo do período. Entre 12 e 24h, as diferenças devem ser interpretadas de acordo com a análise estatística realizada, com inox apresentando a maior média (letra “a”), granito com valores intermediários (letra “b”) e PVC sinalizando os menores valores (letra “c”).

CONCLUSÕES

P. aeruginosa apresentou capacidade de aderência nas superfícies de aço inoxidável, granito e PVC, com aumento das contagens de células viáveis recuperadas ao longo dos períodos avaliados. A partir de 6h, aço inoxidável apresentou as maiores contagens, seguido do granito e do PVC. A manutenção de células viáveis aderidas nos períodos subsequentes indica persistência da colonização bacteriana nas superfícies analisadas. Esses resultados reforçam a importância do conhecimento da capacidade de aderência de *P. aeruginosa* em diferentes superfícies, contribuindo para estratégias de controle e higienização em ambientes de interesse sanitário e na indústria de alimentos.

AGRADECIMENTOS

À UEM pela oportunidade de realização deste projeto de Iniciação Científica e ao LAGUA-UEM pelo suporte técnico e infraestrutura disponibilizada.

REFERÊNCIAS

ALONSO, V. P. P.; GONÇALVES, M. P. M. B. B.; DE BRITO, F. A. E.; BARBOZA, G. R.; ROCHA, L. O.; SILVA, N. C. C. Dry surface biofilms in the food processing industry: An overview on surface characteristics, adhesion and biofilm formation, detection of biofilms, and dry sanitization methods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 22, 688–713, 2023. DOI: https://doi.org/10.1111/1541-4337.13089.

FLEMMING, H.-C. *et al*. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, v. 14, n. 9, p. 563–575, 2016. DOI: https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94.

SHARAN, M.; VIJAY, D.; DHAKA, P.; BEDI, J. S.; GILL, J. P. S. Biofilms as a microbial hazard in the food industry: a scoping review. *Journal of Applied Microbiology*, v. 133, n. 4, p. 2210–2234, 2022. DOI: https://doi.org/10.1111/jam.15766.

OU-YAHIA, D.; FIKRI-BENBRAHIM, K.; BENNOUNA, F.; IBNSOUDA KORAICHI, S. Adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* and its effects on the physicochemical properties of 304 stainless steel immersed in artificial seawater. *Materials Today: Proceedings*, v. 72, p. 3589–3593, 2023. DOI:10.1016/j.matpr.2022.08.352.