

Copyright 2014, ABRACO

Trabalho apresentado durante o INTERCORR 2014, em Fortaleza/CE no mês de maio de 2014.

As informações e opiniões contidas neste trabalho são de exclusiva responsabilidade do(s) autor(es).

Estudo preliminar da formação de biofilmes em superfícies de aço inox 304L

Suleima E B Pereira^a, Dalva C. B. do Lago^b, Lilian F. de Senna^b, Márcia M. M. Gonçalves^b

Abstract

Biofilms are formed by sessile communities cells adhered to a surface and to each other, embedded in a matrix of extracellular polymeric substances (EPS). These substances are produced by microorganisms in order to increase their survival in a given environment. The growth and adhesion of unwanted biofilms affect a wide variety of microbial habitats such as medical instruments, prosthetics, heat exchangers, filtration membranes, distribution of drinking water systems. When grown on metal surfaces, these biofilms can accelerate corrosion process, changing the lifetime metallic materials useful. This study aimed to assess the biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* on 304L stainless steel surfaces used in the mineral water industry. Rectangular 304L stainless steel coupons were immersed in 100 mL flasks containing: nutrient solution, mineral water and *P. aeruginosa*. Incubation times were 48 h and 72 h. Analyses of electrochemical impedance spectroscopy (EIS), before and after biofilm formation, were performed. These coupons also suffered different types of surface treatment: no treatment and sanded (100 mesh to 600 mesh). Preliminary results showed that there is influence of the surface on the adhesion of the biofilm.

Keywords: 304L stainless steel, biofilm, *Pseudomonas aeruginosa*, electrochemical impedance spectroscopy.

Resumo

Os biofilmes são formados por comunidades de células sésseis aderidas a uma superfície e entre si, embebidas por uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (SPE). Estas substâncias são produzidas pelos próprios micro-organismos com a finalidade de aumentar sua sobrevivência em um determinado meio. O crescimento e a adesão indesejada de biofilmes afetam uma grande diversidade de habitats microbianos, tais como instrumentos médicos, próteses, trocadores de calor, membranas de filtração, sistemas de distribuição de água potável. Quando crescidos sobre superfícies metálicas, estes biofilmes podem acelerar processos corrosivos, alterando o tempo de vida útil de materiais metálicos. Este trabalho teve como objetivo avaliar a formação de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* sobre superfícies de aço inox 304L, utilizado na indústria de água mineral. Cupons retangulares de aço inox 304L, foram imersos em frascos de 100 mL contendo: solução nutritiva, água mineral e *P. aeruginosa*. Os tempos de incubação foram 48h e 72h. Foram realizadas análises de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) antes e após a formação do biofilme. Esses

^a Universidade Estácio de Sá/Universidade do Estado do Rio de Janeiro

^b D. Sc. - Universidade do Estado do Rio de Janeiro

cupons também sofreram diferentes tipos de tratamento na superfície: sem tratamento e lixada (100 mesh e 600 mesh). Os resultados preliminares mostraram que existe influência da superfície no desenvolvimento do biofilme.

Palavras-chave: Biofilme, *Pseudomonas aeruginosa*, aço inox 304L, espectroscopia de impedância eletroquímica.

Introdução

Os biofilmes bacterianos, formados por comunidades de células sésseis aderidas a uma superfície, são considerados estruturas complexas onde os micro-organismos são incorporados em uma matriz composta principalmente por substâncias poliméricas extracelulares (SPE) (1). A camada de SPE ao redor do biofilme protege-o contra o ataque de desinfetantes e fornece a ele os nutrientes necessários para seu crescimento (2). Os biofilmes causam prejuízos econômicos em sistemas de abastecimento de água potável, torres de resfriamento, trocadores de calor como também apresentam um risco considerável de higiene na indústria de alimentos (3). Além disso, o acúmulo de biofilmes pode deteriorar materiais metálicos e causar prejuízos associados à corrosão de natureza microbiológica.

As indústrias mais afetadas pela formação de biofilmes são a de geração de energia, produção de óleo, transporte, estocagem e distribuição de água. Em uma indústria de água mineral, por exemplo, as bactérias podem formar biofilmes em toda a superfície que está em contato com a água, ou seja, todas as tubulações da indústria serão revestidas com um biofilme, que pode conter um amplo espectro de gêneros bacterianos tais como, *Acinebacter*, *Listera*, *Flavobacterium*, *Mycobacterium* e *Pseudomonas*, os quais se multiplicarão rapidamente sob condições ideais (4). Uma particularidade atribuída à *Pseudomonas aeruginosa* (*P.aeruginosa*) é o fato dela se desenvolver na água, fonte de poucos nutrientes (5). Muitas dessas bactérias heterotróficas também podem causar doenças, especialmente entre pessoas muito jovens, imuno-comprometidas ou idosas. Outro problema ocorre quando os biofilmes contaminam a água potável, através da produção de metabólitos, causando sabor e odor desagradáveis à água. Sérios problemas de saúde pública podem ainda ser gerados se houver o desprendimento do biofilme da tubulação, principalmente se este for composto por micro-organismos patogênicos (6).

O efeito da superfície tem influência na maneira em que os micro-organismos vão aderir. A superfície que possui irregularidades promove uma maior deposição de micro-organismos (7). Neste trabalho foi avaliada a formação do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* em superfícies de aço inox 304L. Foram usados cupons metálicos sem tratamento na superfície, para simular uma tubulação nova, e corpos de prova que foram polidos com lixas de granulometria de 100 mesh e 600 mesh, com o objetivo de simular uma tubulação desgastada. O comportamento do aço inoxidável diante à adesão do biofilme foi avaliado por espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE).

Metodologia

1. Corpos de Prova

Foram utilizados dois tipos de cupons metálicos. Os corpos de prova usados na quantificação do biofilme e observação microscópica consistiam em cupons retangulares de aço inox 304L com uma área média em torno de 2 cm² e com 2 mm de espessura (Figura 1A). Antes de serem utilizados estes cupons foram desengordurados com acetona em ultrassom por 15 minutos, desinfetados com álcool 95°GL, secos em estufa a 30°C e armazenados em dessecador até o momento do uso. Para avaliação eletroquímica foram preparados eletrodos de aço inox 304L com área média exposta de aproximadamente 1 cm², contendo um fio condutor para estabelecer a conexão elétrica do sistema, e embutidos em resina poliamida para que apenas uma de suas faces ficasse exposta na solução (Figura 1B). Esses cupons foram secos com jato de ar frio e acondicionados em dessecador até o momento do uso. Tanto para quantificação dos micro-organismos, observação microscópica e para os ensaios de impedância foram utilizados cupons sem tratamento de superfície e polidos com lixas de granulometria de 100 mesh e 600 mesh. No momento da imersão no meio de cultura, os cupons ficaram expostos por 20 minutos, cada lado, à luz germicida em capela de fluxo laminar.



Figura 1: (A) cupom metálico para os ensaios de quantificação do biofilme e observação microscópica e (B) cupom metálico para avaliação eletroquímica.

2. Preparação do inóculo

A *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) foi obtida no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - INCQS/ FIOCRUZ.

O inóculo foi preparado pela adição de 10 mL da cultura *P. aeruginosa*, em 100 mL de Caldo nutriente. Após 24h de incubação a 30°C com agitação de 100 rpm, o inóculo apresentava uma concentração em torno 10⁸ células/mL. O caldo nutriente contém 3,0 g/L de extrato de carne, 5,0 g/L de peptona e pH igual a 7,0 ± 0,2. Todos os meios foram esterilizados a 121°C por 15 min e preservados em geladeira até o dia de uso.

4. A formação do biofilme

O ensaio foi realizado em duplicata nos tempos de 48 h e 72h, os quais foram selecionados a partir do estudo realizado por Ulloa (8). Foram usados frascos com capacidade de 100 mL, denominados reatores, que continham 70 mL de água mineral *Serra do Padre*, 1 mL do inóculo e 30 mL de solução nutriente (Figura 2). Esta solução nutriente contém 30g/L de peptona e 33,3 g/L de NaCl. Os cupons metálicos foram suspensos no reator, com auxílio de

fita teflon e incubados nos tempos determinados (Figura 2A). O mesmo procedimento foi realizado para os cupons confeccionados em resina poliamida para os ensaios de impedância (Figura 2B e 2C).

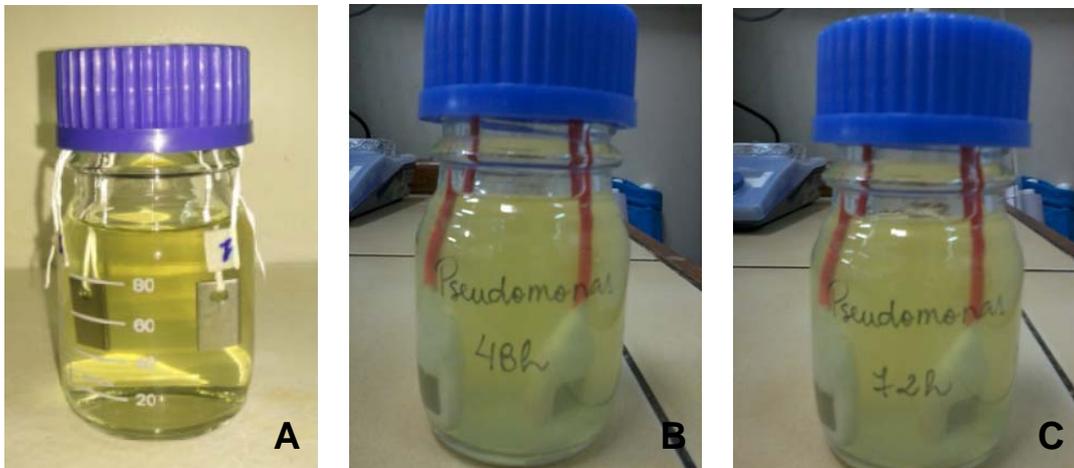


Figura 2: (A) cupons para quantificação do biofilme e observação microscópica, (B) e (C) cupons para avaliação eletroquímica nos tempos 48h e 72h, respectivamente.

5. Quantificação do número de células sésseis do biofilme

Após o período de incubação, os corpos de prova foram retirados do reator, lavados duas vezes por imersão em frascos contendo água destilada estéril, para eliminar as bactérias livres. Em seguida, foram transferidos individualmente para um tubo de plástico com tampa rosqueável, que continha 10 mL de solução 0,9% m/v de NaCl e agitado em vórtex por 4 minutos, e 2 minutos em ultrassom para extrair o biofilme ali aderido. Após a remoção do biofilme, foi retirada uma alíquota de 1 mL da suspensão para fazer diluições sucessivas e seguidamente aplicar a técnica de plaqueamento *pour-plate*, em meio seletivo Agar cetrimide (9). As placas de *Petri* foram incubadas durante 48 h a 30°C e após esse período foi contado o número de unidades formadoras de colônias (UFC).

6. Observação microscópica

Após a eliminação das bactérias livres, conforme descrito no item anterior, os cupons metálicos foram levados para a estufa a 37°C durante 60 minutos para a secagem. Em seguida, foi observada a formação do biofilme no Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV-LEO 1450VP da Carl Zeiss do Brasil), nos tempos de 48 h e 72 h, realizado a baixo vácuo com o aumento de 1000X. Os cupons sem o desenvolvimento do biofilme foram preparados conforme descrito no item 1 e armazenados em dessecador até o momento da observação microscópica.

7. Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE)

Foram realizados ensaios de espectroscopia de impedância eletroquímica na ausência e presença do biofilme de *P. aeruginosa* no cupom metálico. Utilizou-se o mesmo corpo de prova do início ao fim em cada série de experimento, ou seja, os cupons A e B utilizados eram os mesmos nos ensaios sem tratamento na superfície e com a superfície lixada.

Foi montada uma célula composta por três eletrodos: aço inox 304L como eletrodo de trabalho, o qual foi previamente submetido a etapas de crescimento do biofilme descritas no item 4; platina como contra eletrodo; e calomelano saturado (ECS) como eletrodo de referência. Utilizou-se um potenciostato/galvanostato Autolab modelo PGSTAT302N, variando-se a frequência de 10^5 Hz a 0,02 Hz, com amplitude de 10 mV e taxa de aquisição de 10 pontos de frequência por década. Os ensaios de EIE foram realizados utilizando-se eletrodos com área exposta de 1 cm^2 de aço inox 304L (Figura 1B), em solução 0,50 mol/L de NaNO_3 a 25°C e no potencial de circuito aberto.

Resultados e discussão

Avaliação do número de bactérias no biofilme

A Figura 3 mostra o número de células presentes no biofilme formado sobre os cupons de aço inox 304L, no CP recém-recebido e CP lixado, nos tempos de 48h e 72h.

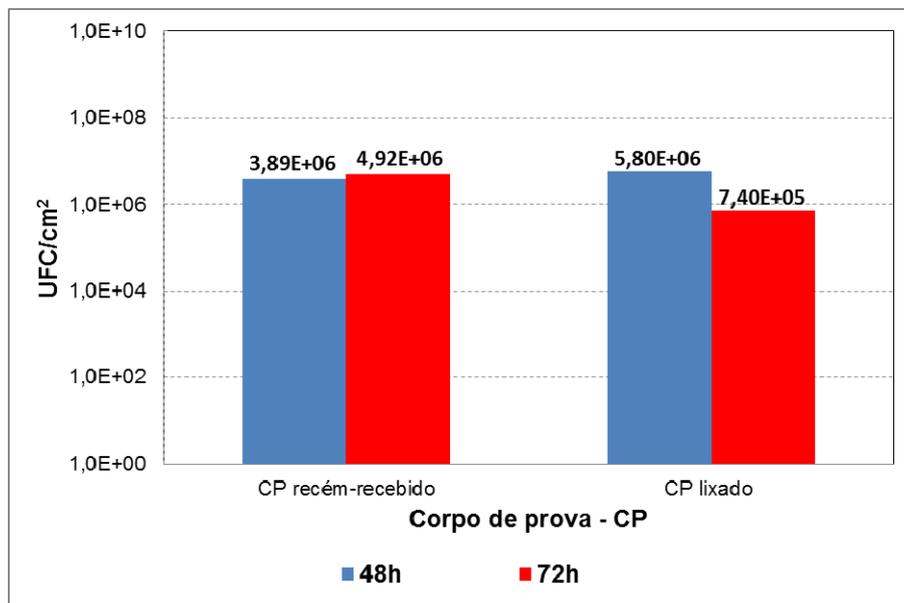


Figura 3: Quantificação dos micro-organismos do biofilme.

Percebe-se que no corpo de prova recém-recebido, que simula uma tubulação nova, houve um discreto aumento com o tempo do número de células no biofilme. É provável que haja uma menor influência da rugosidade da superfície quando esta já possui biofilme formado (10).

No entanto, a contagem das bactérias no biofilme do cupom metálico polido foi menor no tempo de 72 h, ou seja, com o aumento do tempo há uma diminuição no número de células sésseis. Segundo Ulloa (8) o tempo ideal para o recobrimento completo de uma superfície do aço inox 304L por biofilmes de *P. aeruginosa* é de 48h, após esse período a adesão poderá

diminuir devido ao desprendimento do biofilme. Cabe ressaltar, que neste caso pelo fato da adesão inicial ter ocorrido numa superfície polida, a qual não favorece a adesão, o desprendimento do biofilme foi provavelmente maior que o ocorrido nos cupons recém-recebidos.

Avaliação microscópica

As figuras a seguir mostram as imagens obtidas por MEV dos cupons de aço inox 304L recém-recebido (Figura 4) e lixado (Figura 5), sem biofilme e com o desenvolvimento do biofilme nos tempos de 48h e 72h.

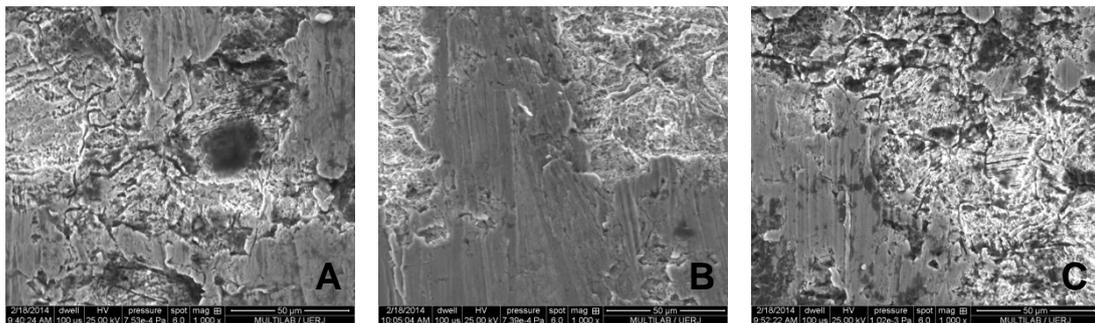


Figura 4: Cupons de aço inox 304L recém-recebidos: sem biofilme (A), com biofilme 48 h (B) e com biofilme 72 h (C).

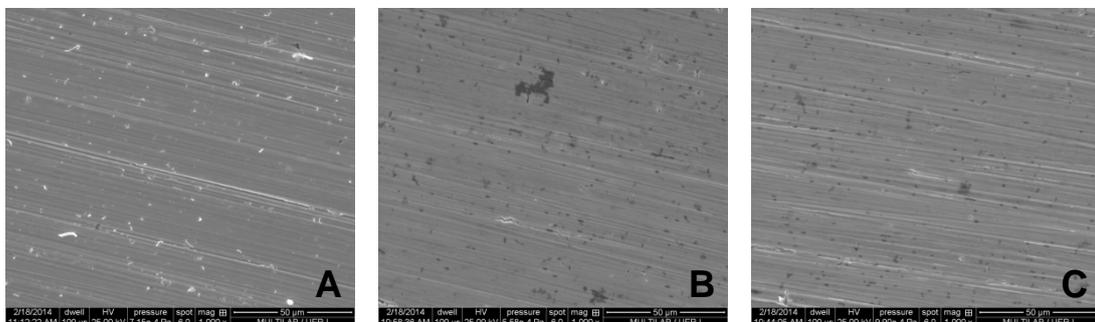


Figura 5: Cupons de aço inox 304L lixados: sem biofilme (A), com biofilme 48 h (B) e com biofilme 72 h (C).

Comparando a Figura 4A e 5A pode-se perceber uma diferença significativa em relação à superfície dos corpos de prova. O aço inox 304L recém-recebido (4A) apresenta uma superfície irregular enquanto o aço inox lixado apresenta uma superfície mais uniforme, ou seja, menos rugosa. Neste estudo não foi possível acompanhar o desenvolvimento do biofilme no aço inox 304L através da observação no MEV conforme se verifica nas Figuras 4A, 4B, 5A e 5B.

Avaliação dos resultados de impedância

Os resultados da avaliação eletroquímica dos eletrodos de aço inoxidável 304L são mostrados nas Figuras 6 e 7 para os corpos de prova recém-recebidos e lixados, respectivamente. Todas as análises foram realizadas em duplicata, referenciadas como A e B, nas seguintes condições: sem biofilme, com biofilme 48h, após a remoção do biofilme 48h, com biofilme 72h e após a remoção do biofilme 72h.

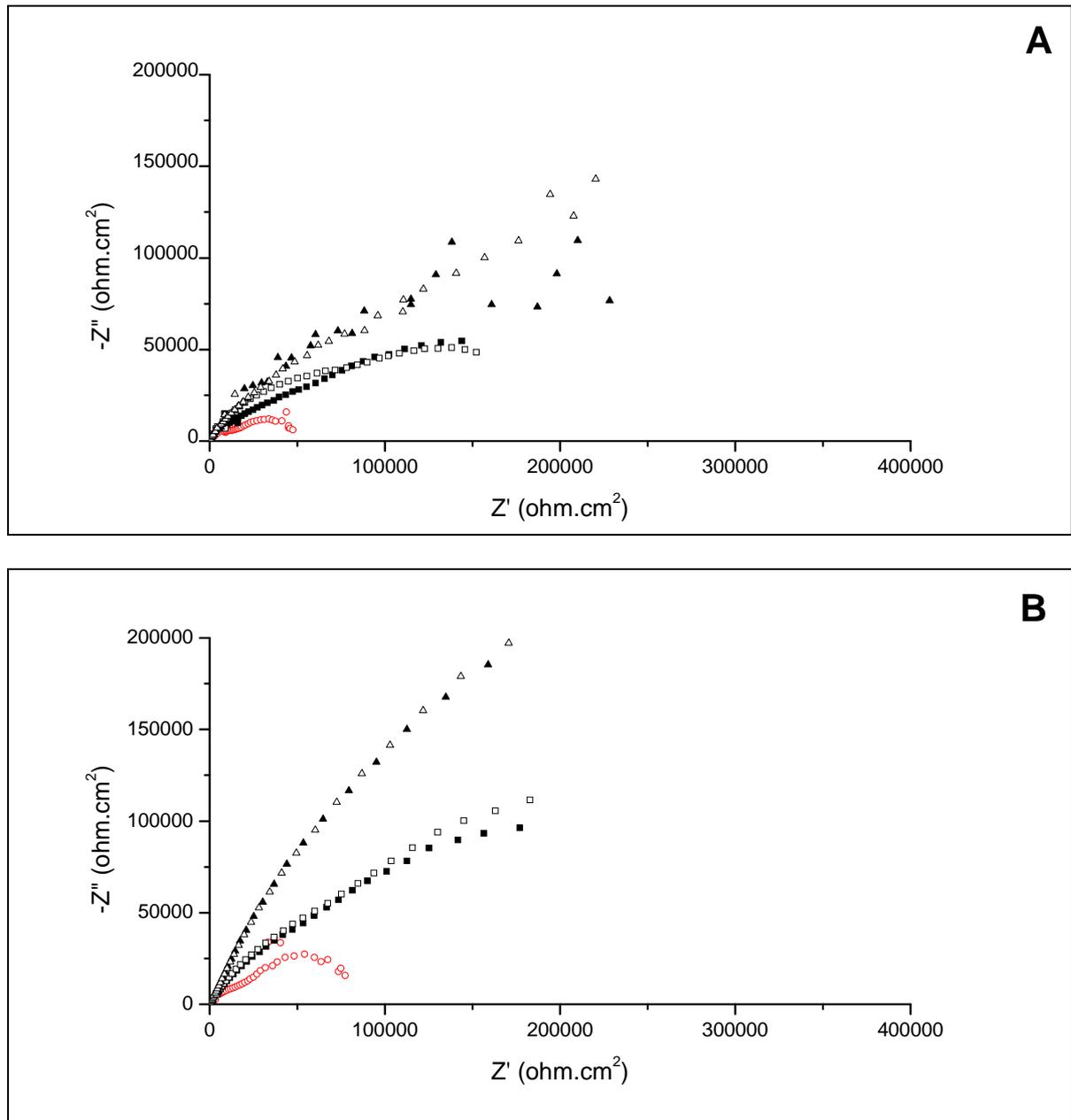


Figura 6: Diagramas de Nyquist dos cupons de aço inox 304L A e B na condição recém-recebido. Corpo de prova sem biofilme (○), com biofilme 48h (■), após a remoção do biofilme 48h (□), com biofilme 72h (▲), após a remoção do biofilme 72h (△).

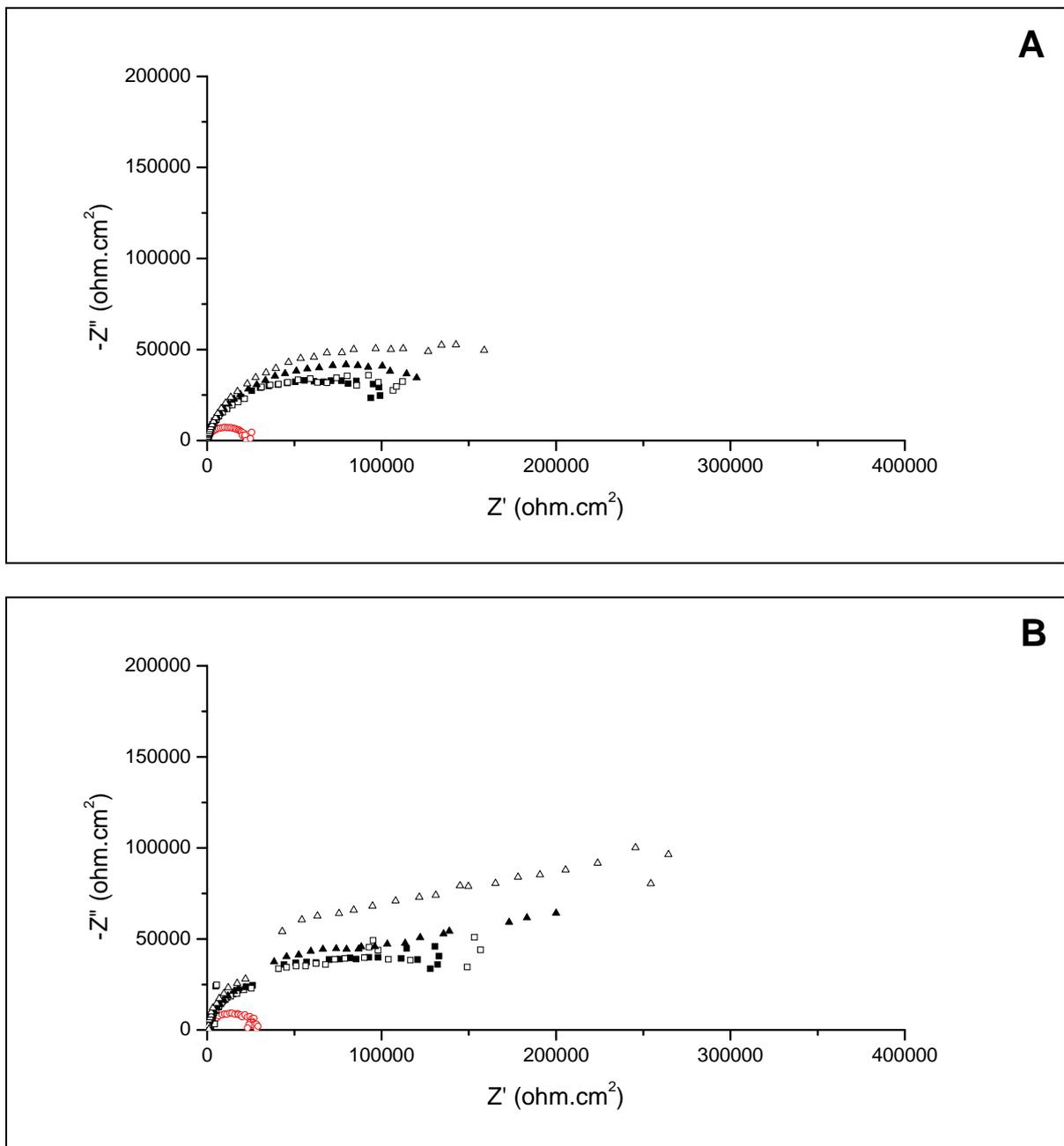


Figura 7: Diagramas de Nyquist dos cupons de aço inox 304L A e B na condição lixado. Corpo lixado sem biofilme (\circ), com biofilme 48h (\blacksquare), após a remoção do biofilme 48h (\square), com biofilme 72h (\blacktriangle), após a remoção do biofilme 72h (\triangle).

Comparando os diagramas de Nyquist apresentados nas Figuras 6 e 7 dos corpos de prova recém-recebido e lixado, ambos sem biofilme, é possível perceber uma diminuição no arco capacitivo do corpo de prova lixado. Este comportamento pode ser explicado pelo fato de que o processo de lixamento remove a camada protetora do aço inoxidável. Observa-se também que há variações nas curvas de impedância para os corpos de prova sem biofilme e após o biofilme desenvolvido, pois ocorre um aumento do arco capacitivo após a formação do biofilme.

Pode-se observar, para todos os ensaios, que não existe uma variação significativa das curvas de impedância com biofilme e após sua remoção. Isso provavelmente ocorreu devido ao fato de que o processo de extração utilizado (vortex e ultrassom) removeu as células viáveis, mas não a proteína do biofilme. Chen e Stewart (11) analisaram vários tratamentos químicos, para a remoção da proteína da camada SPE em biofilmes de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*, e mostraram que não existe uma correlação entre o número de células sésseis do biofilme e a quantidade de proteína removida. Resultados semelhantes também foram encontrados por Ulloa (8). Isso significa que mesmo após a remoção das células sésseis do biofilme, a camada de SPE ainda se mantém na superfície do metal. Esse resíduo pode ser uma fonte adicional de nutrientes e/ou uma superfície para a colonização de células novas (11).

Conclusões

A simulação de uma tubulação nova através do corpo de prova recém-recebido permitiu observar um favorecimento da adesão microbiana. Enquanto que com o emprego do cupom lixado, o qual simula uma tubulação desgastada, observou-se uma menor adesão, uma vez que esta superfície favorece ao desprendimento do biofilme ao longo do tempo.

A observação no MEV permitiu perceber uma diferença significativa em relação à superfície dos corpos de prova. O aço inox 304L recém-recebido apresenta uma superfície irregular enquanto o aço inox lixado apresenta uma superfície mais uniforme, ou seja, menos rugosa. Não foi possível acompanhar o desenvolvimento do biofilme no aço inox 304L através da observação no MEV.

Verificou-se uma diminuição no arco capacitivo do corpo de prova lixado sem formação do biofilme, tendo em vista que o processo de lixamento remove a camada protetora do aço inoxidável.

Não existe uma variação significativa das curvas de impedância com biofilme e após sua remoção, provavelmente devido ao processo de extração remover as células sésseis, mas não a proteína do biofilme.

Referências bibliográficas

- (1) SIMÕES, M.; PEREIRA, M. O.; VIEIRA, M. J. Effect of mechanical stress on biofilms challenged by different chemicals. **Water Research**, v. 39, p. 5142-5152, Nov. 2005.
- (2) LOMANDER, A.; SCHREUDERS, P.; RUSSEK-COHEN, E.; ALI, L. Evaluations of chlorines impact on biofilms on scratched stainless steel surfaces. **Bioresource Technology**, v. 94, p.275–283, Feb. 2004.
- (3) MEYER, B. Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Germany, v. 51, p. 249-253. 2003.
- (4) VAN DER WENDE, E., CHARACKLIS, W.G. and Smith, D.B. Biofilms and bacterial drinking water quality. **Water Research**, 23, 1313–1322. 1989.

- (5) BERNARDO, S. P. C. **Avaliação da suscetibilidade a antimicrobianos e formação de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de água mineral.** 2009. 70p. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária) – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2009.
- (6) MORAES, J. E. **Estudo da corrosão microbiológica no aço inoxidável 316 em Na₂SO₄ 0,5 MOL L⁻¹.** 2009. 96p. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada) Universidade Estadual do Centro-Oeste, Paraná, 2009.
- (7) BERNARDES, P. C. **Modelagem da adesão de *Bacillus cereus* ao aço inoxidável em função do tempo e da temperatura e influencia da rugosidade e da hidrofobicidade sobre a adesão.** 2008. 67p. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2008.
- (8) ULLOA, Y. P. **Estudo do crescimento bacteriano e da aplicação de procedimentos de limpeza e desinfecção no aço inox 304L.** 2012. 127p. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química) Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.
- (9) RAMALHO, R.; CUHA, J.; TEIXEIRA, P.; GIBBS, P. Modified *Pseudomonas* agar: new differential médium for the detection/enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* in mineral water. **Journal of Microbiological Methods.** v. 49, p. 69–74, 2002.
- (10) MACHADO, S. M. O. **Avaliação do efeito antimicrobiano do surfactante cloreto de benzalcônio no controle da formação de biofilmes indesejáveis.** 2005. 129p. Dissertação (Departamento de Engenharia Biológica) Universidade do Ninho. Braga. 2005
- (11) CHEN, X.; STEWART, P. S. Biofilm removal caused by chemical treatments. **Water Research**, vol. 34, n. 17, p. 4229-4233, Feb. 2000.