

Formação in vitro de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* na superfície de canetas odontológicas de alta rotação

Valdionir da Rosa FREITAS^{a,b}, Sueli Teresinha van der SAND^b, Amauri Braga SIMONETTI^b

^aPrograma de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90050-170 Porto Alegre - RS, Brasil

^bDepartamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90050-170 Porto Alegre - RS, Brasil

Freitas VR, van der Sand ST, Simonetti AB. In vitro biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* on the surface of high-speed dental handpieces. Rev Odontol UNESP. 2010; 39(4): 193-200.

Resumo

Em consultórios odontológicos, são utilizadas canetas de alta rotação que funcionam conectadas a circuitos de água. Estudos já demonstraram contaminação microbiana em amostras de água coletada de tubulações desses circuitos. Durante sua utilização, essas canetas entram em contato com a microbiota oral, o que pode favorecer a formação de biofilme em sua superfície e influir na qualidade e na segurança dos procedimentos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a formação in vitro de biofilme na superfície de canetas odontológicas utilizando-se *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Os experimentos foram executados em fragmentos de alumínio provenientes do corte de canetas odontológicas e a formação do biofilme foi verificada pela contagem de bactérias viáveis (CBV) e por microscopia eletrônica de varredura (MEV). O número de células aderidas atingiu 9×10^6 ufc.cm⁻² para *Pseudomonas aeruginosa* e 6×10^8 ufc.cm⁻² para *Staphylococcus aureus*. A MEV mostrou a adesão de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* aos fragmentos e a presença de matriz polimérica a partir do sexto dia de incubação. Também foi testada a produção de biofilme por essas bactérias na superfície de placas de poliestireno, pelo método do Cristal Violeta. Ambos os micro-organismos exibiram valores de absorvância superiores ao ponto de corte estabelecido, indicando resultados positivos. Foi demonstrada, ainda, a capacidade de ambas as bactérias produzirem cápsula, utilizando-se o método do Ágar Vermelho Congo. Nas condições testadas, os experimentos realizados neste trabalho mostraram a formação in vitro de biofilme na superfície de material proveniente de canetas odontológicas, um evento importante considerando-se que sua presença representa um potencial risco para o estabelecimento de contaminação cruzada.

Palavras-chave: Canetas odontológicas de alta rotação; biofilme; *Pseudomonas* sp.; *Staphylococcus* sp.; cristal violeta.

Abstract

High-speed handpieces connected to running water circuits are used in dental offices. Studies have shown microbial contamination in water samples collected from the tubing of these circuits. Handpieces come in contact with oral microorganisms during use, which can promote the formation of biofilm on the handpiece and affect procedural quality and safety. The aim of this study was to evaluate in vitro biofilm formation on the surface of high-speed dental handpieces using *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. The assays were performed on aluminum fragments cut from dental handpieces and biofilm formation assessed by viable bacteria counting (VBC) and scanning electron microscopy (SEM). The number of adhered cells was 9×10^6 ufc.cm⁻² for *Pseudomonas aeruginosa* and 6×10^8 ufc.cm⁻² for *Staphylococcus aureus*. SEM showed the adherence of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* to handpiece fragments and the presence of a polymer matrix after six days of incubation. We also tested biofilm production by these bacteria on the surface of polystyrene plates using the Crystal Violet method. Both microorganisms displayed absorbance values above the established cut-off point, indicating positive results. The ability of these bacteria for capsule (slime) production was shown using the Congo Red Agar method. Within the limits of these experiments, this study demonstrated in vitro biofilm formation on the surface of material from dental handpieces, indicating a potential cross contamination risk.

Keywords: High-speed dental handpieces; biofilm; *Pseudomonas* sp.; *Staphylococcus* sp.; crystal violet.

INTRODUÇÃO

Dentro da atual concepção, biofilme é um conjunto formado por um ou mais micro-organismos envolvidos numa matriz polimérica extracelular, aderido a uma superfície¹. Os biofilmes apresentam uma composição heterogênea, configurando uma estrutura complexa de microcolônias e canais que permitem fluxo de fluidos e nutrientes². Em estudos *in vitro*, alguns autores relacionam biofilme ao número de células aderidas à superfície³.

As bactérias são capazes de aderir a superfícies bióticas e abióticas. Dentre as inúmeras bactérias envolvidas nos estudos de biofilme, destacam-se *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. São micro-organismos considerados ubíquos e estão frequentemente presentes em superfícies de tubulações de água^{4,5}. Alguns estudos demonstraram a presença de biofilme em amostras de água de equipamentos odontológicos⁶⁻⁸, mas é escassa a literatura sobre a ocorrência de biofilme na superfície desses equipamentos⁹. A presença de bactérias formando biofilme em canetas odontológicas aumentaria o risco de contaminação cruzada, podendo as células permanecer viáveis mesmo após a limpeza e a desinfecção das superfícies, afetando a qualidade e a segurança de procedimentos^{6,10}.

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a formação *in vitro* de biofilme por *P. aeruginosa* e *S. aureus* em fragmentos de alumínio provenientes do corte de canetas odontológicas de alta rotação.

MATERIAL E MÉTODO

1. Micro-organismos e Condições de Cultivo

Foram utilizadas cepas de *S. aureus* (ATCC 25923), *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *S. epidermidis* (ATCC 35984) e isolados de *Klebsiella pneumoniae* e *Citrobacter sp.*, provenientes do Departamento de Microbiologia-ICBS-UFRGS. As bactérias foram mantidas em meio sólido de Ágar Nutriente a 4 °C, distribuído em tubos de ensaio inclinados.

Para o cultivo bacteriano, utilizaram-se os meios Caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI, HIMEDIA, Mumbai, Índia), Ágar Triptona de Soja (TSA, HIMEDIA, Mumbai, Índia) e Caldo Triptona de Soja (TSB, HIMEDIA, Mumbai, Índia). Os meios foram preparados de acordo com as recomendações dos fabricantes. Os micro-organismos foram inoculados primeiramente em TSB e incubados por um período de 24 horas a 37 °C, a fim de se obterem as amostras para os ensaios.

Em relação ao inóculo, um pequeno número de colônias de *P. aeruginosa* e *S. aureus* cultivadas previamente em TSA foi adicionado individualmente a 100 mL de caldo BHI e incubado sob fraca agitação a 30 °C por 6 horas, período estabelecido previamente por curvas de crescimento. A cada 30 minutos, foram retirados 2 mL e realizadas medidas de absorbância até ser atingida a absorbância de 0,1, valor correspondente a 7 Log de unidades formadoras de colônia (ufc) por mililitro da suspensão. Posteriormente, 1 mL da suspensão foi transferido para 99 mL de

caldo BHI para se obter um inóculo inicial de 5 Log de ufc.mL⁻¹, que foi utilizado nos experimentos descritos a seguir.

2. Indução de Biofilme *In Vitro*

Primeiramente, um total de 24 fragmentos de alumínio retangulares apresentando dimensões de 1 × 1 cm foi obtido a partir do corte de canetas odontológicas de alumínio (Figura 1).

Os fragmentos foram limpos e descontaminados individualmente com acetona p.a. (Casquímica, Diadema, Brasil), lavados com água destilada e finalmente limpos e secos com álcool 70%. Após esta etapa, os fragmentos foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 20 minutos¹¹.

Para indução de biofilme sobre os fragmentos, foram realizados ensaios individuais utilizando-se *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Para tanto, o inóculo (5 Log de ufc.mL⁻¹) foi transferido a um frasco Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de BHI. Os cupons foram imersos no meio contendo a suspensão bacteriana com o auxílio de uma pinça longa estéril e foram incubados a 30 °C, sob agitação contínua a 50 rpm pelo período de 14 dias, conforme estabelecido por testes preliminares. Um frasco contendo somente os fragmentos e o meio nutriente, preparado e incubado sob condições semelhantes, foi utilizado como controle negativo do experimento.

A cada dois dias, os fragmentos foram transferidos para um novo meio nutriente contendo 100 mL de BHI, sendo lavados previamente com solução salina para remoção de células planctônicas. Durante as transferências, três fragmentos foram retirados e submetidos à contagem de bactérias viáveis (CBV) e à microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para cada bactéria testada, o experimento foi realizado em duplicata.

Para efetuar a contagem de bactérias viáveis aderidas, o fragmento, após ser retirado do meio nutriente, foi lavado brevemente em solução salina. Em seguida, o biofilme que permaneceu aderido foi removido da superfície metálica com o auxílio de um suabe e imerso em tubo contendo 2 mL de água destilada estéril. O suabe, contendo células removidas, foi submetido



Figura 1. a) Canetas odontológicas de alta rotação; e b) fragmentos confeccionados para a realização dos experimentos.

à agitação por “vortex” durante 2 minutos. Na sequência, após o descarte do suabe, o tubo contendo o fragmento foi novamente submetido ao “vortex” por mais 1 minuto. Posteriormente, foi retirado do tubo 1 mL da suspensão obtida e realizada a diluição à razão 10, até obtenção de diluições que variaram de 10^{-3} a 10^{-6} , de modo a se obterem colônias em número seguro para contagem em placa (30 e 300 colônias). Após a diluição, volumes de 100 μ L foram inoculados em placas contendo meio TSA, que foram incubadas por 24 horas a 37 °C. Este procedimento foi realizado em duplicata. A contagem de células foi realizada de acordo com cálculo descrito por Chaves¹².

As amostras para microscopia eletrônica de varredura foram preparadas de acordo com o método preconizado por Castro¹³, com algumas modificações. Os fragmentos, após serem retirados da suspensão, foram lavados em solução salina estéril por 1 minuto. Posteriormente, foram fixados em glutaraldeído 1% (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, Brasil) por um período mínimo de 12 horas. Após a fixação, os materiais foram imersos em etanol (Da Ilha Comercio de Álcool Ltda, Paraná, Brasil) para desidratação. A imersão ocorreu em concentrações crescentes de etanol 50, 70, 80, 95 e 100%, intercalando-se 20 minutos a cada troca. Ao final da desidratação, as amostras foram imersas em acetona 100% e submetidas à metalização em ouro, utilizando-se o equipamento Metalizador Sputter Coater Bal-Tec SDC 050. Os fragmentos foram observados ao microscópio eletrônico JEOL SCANNING MICROSCOPE - JSM 6060.

A formação de biofilme por *P. aeruginosa* e *S. aureus* também foi avaliada em placas de microtitulação de poliestireno pelo método de Cristal Violeta descrito por Stepanovic et al.¹⁴, com pequenas modificações. Foram preparados 200 mL de meio TSB suplementado com 1% de glicose e um inóculo de 8 Log de ufc.mL⁻¹ padronizado pela escala de McFarland no valor de 0,5. Os poços da placa de microtitulação foram preenchidos sequencialmente com alíquotas de 180 μ L de caldo TSB e 20 μ L do inóculo bacteriano. Cada micro-organismo a ser testado ocupou 32 poços da placa, ou seja, 32 repetições. No controle positivo, foram transferidos 180 μ L de TSB e um inóculo de 20 μ L de suspensão de *S. epidermidis* (ATCC 35984) para oito poços da placa (oito repetições). No controle negativo, transferiram-se somente 200 μ L de caldo TSB para oito poços (oito repetições). A metodologia seguiu as etapas de incubação, fixação, coloração e leitura das absorbâncias na placa de microtitulação, respectivamente.

A avaliação de formação de biofilme foi realizada através da leitura da absorbância de cada poço utilizando-se leitor de placas ADAP Versão 1.6, em comprimento de onda de 620 nm. O ponto de corte (cut-off) correspondeu ao valor médio das absorbâncias do controle negativo somado a três desvios padrão. Para interpretação dos dados, foram considerados os valores médios da leitura de absorbância de acordo com a equação de Stepanovic et al.¹⁴. As amostras foram classificadas como fortemente (absorbância média superior a quatro vezes o ponto de corte) ou moderadamente (absorbância média entre duas e quatro vezes o ponto de corte) produtoras de biofilme. As não produtoras apresentaram valor de absorbância igual ou inferior ao ponto de corte.

3. Avaliação da Produção de Cápsula

A avaliação da capacidade de *P. aeruginosa* e *S. aureus* em produzir cápsula como teste presuntivo para a formação de biofilme foi realizada pelo método de semeadura em Ágar Vermelho Congo (AVC), descrito por Freeman et al.¹⁵, com pequenas modificações. O AVC foi preparado a partir de 37 g.L⁻¹ de caldo de BHI, 50 g.L⁻¹ sacarose (Difco), 15 g.L⁻¹ ágar base (Difco) e 0,8 g.L⁻¹ Vermelho Congo (Difco). Colônias de *P. aeruginosa* e *S. aureus*, obtidas pelo crescimento prévio overnight em TSA, foram inoculadas por picada no meio AVC e incubadas a 37 °C por 24 horas. Colônias de *K. pneumoniae* e *Citrobacter* sp. também foram inoculadas neste meio como controles positivo e negativo, respectivamente. Os resultados foram avaliados de acordo com a coloração apresentada pelas colônias testadas e comparadas aos controles após os períodos de incubação. Para tanto, as amostras foram consideradas produtoras de cápsula quando apresentaram coloração preta e as não produtoras de cápsula quando apresentaram coloração vermelha. O teste foi realizado em duplicata, repetido e avaliado por dois observadores independentes.

4. Análise Estatística

Os dados obtidos nos testes foram submetidos à análise estatística utilizando-se análise de variância (ANOVA) do programa SSPS. Os níveis de significância estatística foram estabelecidos em $p < 0,05$.

RESULTADO

A formação de biofilme foi avaliada pela contagem de bactérias viáveis e por MEV. Os resultados das contagens de bactérias viáveis estão demonstrados nas Figuras 2 e 3. O número de células aderidas aos cupons atingiu 9×10^6 ufc.cm⁻² para *P. aeruginosa* e 6×10^8 ufc.cm⁻² para *S. aureus*, após 14 dias de incubação.

Os resultados obtidos por MEV estão demonstrados na Figura 4. As micrografias mostram uma adesão gradual de *P. aeruginosa* e *S. aureus* sobre os cupons à medida que aumenta o tempo de incubação. Pode-se observar a presença de matriz polimérica a partir do sexto dia de incubação.

Comparando-se as contagens de bactérias viáveis com as micrografias captadas por MEV, pode-se observar que em relação a *P. aeruginosa* houve um aumento gradual da adesão bacteriana aos fragmentos ao longo da incubação. Já em relação a *S. aureus*, ocorreu certa discrepância, pois não houve correspondência entre número de bactérias viáveis aderidas aos cupons e o tempo de incubação até seis dias após o início dos experimentos.

Os resultados da formação de biofilme em placas de microtitulação de poliestireno pelo método CV são mostrados na Tabela 1. O valor médio das absorbâncias de cada amostra foi calculado, após 32 repetições do teste. As médias e desvios padrão das absorbâncias de *P. aeruginosa* e de *S. aureus* foram $0,084 \pm 0,01$ e $0,232 \pm 0,07$, respectivamente. O ponto de corte correspondeu a 0,016. De acordo com o critério estabelecido neste trabalho, *P. aeruginosa* foi considerado moderado produtor de biofilme

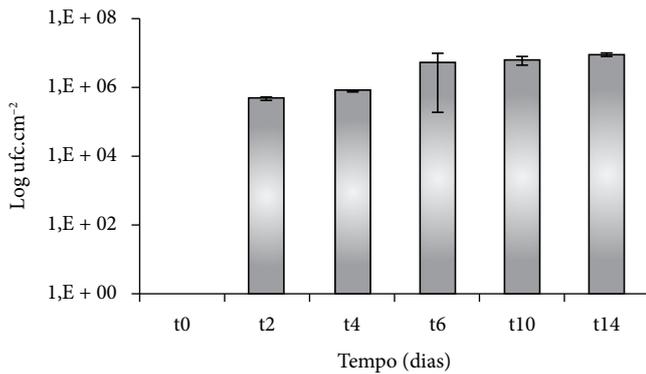


Figura 2. Avaliação da adesão in vitro de *P. aeruginosa* a fragmentos de alumínio, expressa em unidades formadoras de colônias, durante 14 dias de incubação.

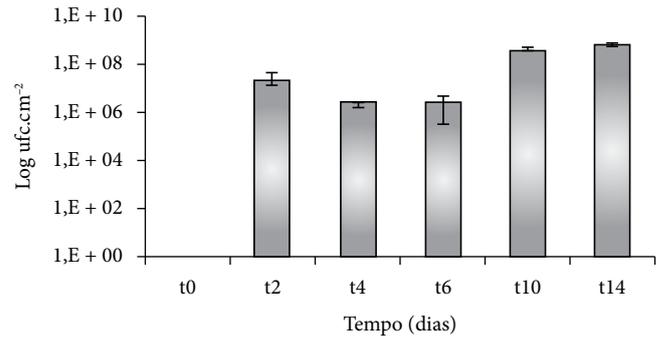


Figura 3. Avaliação da adesão in vitro de *S. aureus* a fragmentos de alumínio, expressa em unidades formadoras de colônias, durante 14 dias de incubação.

enquanto que *S. aureus* mostrou ser forte produtor. *S. epidermidis*, que foi utilizado como controle positivo, apresentou absorvância média e desvio padrão de $0,274 \pm 0,038$.

Na avaliação da produção de cápsula pelo método AVC, observou-se que as colônias de *P. aeruginosa* e *S. aureus* apresentaram coloração preta semelhantes à cor das colônias de *K. pneumoniae*, utilizado como controle positivo. As colônias do controle negativo *Citrobacter* sp. apresentaram coloração vermelha, mostrando-se não produtoras de cápsula (resultados não mostrados).

DISCUSSÃO

A razão da escolha de *P. aeruginosa* e *S. aureus* se deve ao fato de estes micro-organismos apresentarem grande capacidade para formação de biofilme, frequentemente presentes em ambientes úmidos e, especialmente *Pseudomonas*, nos circuitos de água em sistemas odontológicos.

Conforme mostram as Figuras 2 e 3, o número de bactérias viáveis aderidas aos fragmentos de alumínio foi bastante significativo após seis dias de incubação, atingindo valores máximos após 14 dias, tanto para *P. aeruginosa* como para *S. aureus*. Alguns pesquisadores¹⁶⁻¹⁸ consideraram como biofilme a adesão de um determinado número de bactérias à superfície de aço inoxidável e outros materiais, na ordem de 10^5 , 10^3 e 10^7 ufc.cm⁻², respectivamente. Utilizando-se este critério, os dados deste trabalho sugerem que as bactérias testadas produziram biofilme.

As micrografias obtidas por MEV mostram bactérias aderidas à superfície dos fragmentos após dois dias de incubação, cujo número aumenta gradualmente até 14 dias. A presença de substância amorfa envolvendo as bactérias, sugestiva de matriz polimérica, pode ser observada a partir do sexto dia de incubação conforme mostram as setas indicadas na Figura 4. O biofilme maduro, no entanto, se estabeleceu no 14º dia, pois neste período as bactérias atingiram o número máximo de células aderidas.

Em um estudo que utilizou metodologia similar à empregada nestes experimentos, foi verificado que *S. aureus* aderiu à superfície de vidro e aço inoxidável sob condições de incubação

de 37 °C durante 15 dias, atingindo um valor de 10^8 ufc.cm⁻²[19]. Em qualquer estudo sobre produção de biofilme, sempre se devem considerar as condições experimentais e a influência de fatores como temperatura e composição da superfície do material no processo de adesão bacteriana. Para alguns pesquisadores, a adesão bacteriana e a produção de biofilme resultam de um processo multifatorial^{20,21}.

A formação do filme condicionante é uma etapa precursora de todo o processo de desenvolvimento do biofilme em superfícies em contato com água, sendo esta película formada pela adsorção de moléculas orgânicas dissolvidas no meio aquoso sobre a superfície. Na sequência, ocorre o deslocamento de micro-organismos e partículas para a superfície sólida¹². Portanto, a adesão depende basicamente de fatores que envolvem características do micro-organismo, da superfície de adesão e das condições do meio.

Um dos fatores importantes em relação ao micro-organismo é a carga da sua superfície, que nas bactérias Gram-negativas e Gram-positivas é negativa devido à presença de lipopolissacarídeos e ácidos teicoicos, respectivamente²². Esse fato poderia explicar a expressiva adesão das bactérias utilizadas em nossos experimentos aos fragmentos de alumínio. Também é sabido que a adesão inicial por *P. aeruginosa* pode ser facilitada pela presença de flagelos, pois estas estruturas conferem mobilidade à bactéria, aproximando-a de seu substrato na superfície²³.

Uma observação importante no presente estudo se refere ao perfil de adesão de *S. aureus* ao longo do período de incubação. A Figura 3 mostra que houve uma redução da adesão no sexto dia de incubação, retomando seu crescimento gradual nos períodos subsequentes. Essa oscilação no processo de adesão pode ter ocorrido em razão da produção de substâncias poliméricas como, por exemplo, alguns polissacarídeos. A formação dessas substâncias pode ter provocado a redução de compostos necessários para o crescimento da bactéria, sendo que a alta atividade metabólica das bactérias poderia ter reduzido a sua taxa de crescimento. Em um determinado modelo teórico, foi descrito que a glicose possui grande influência na produção de matriz polimérica e que a falta de nutrientes pode induzir o desprendimento da bactéria séssil²¹.

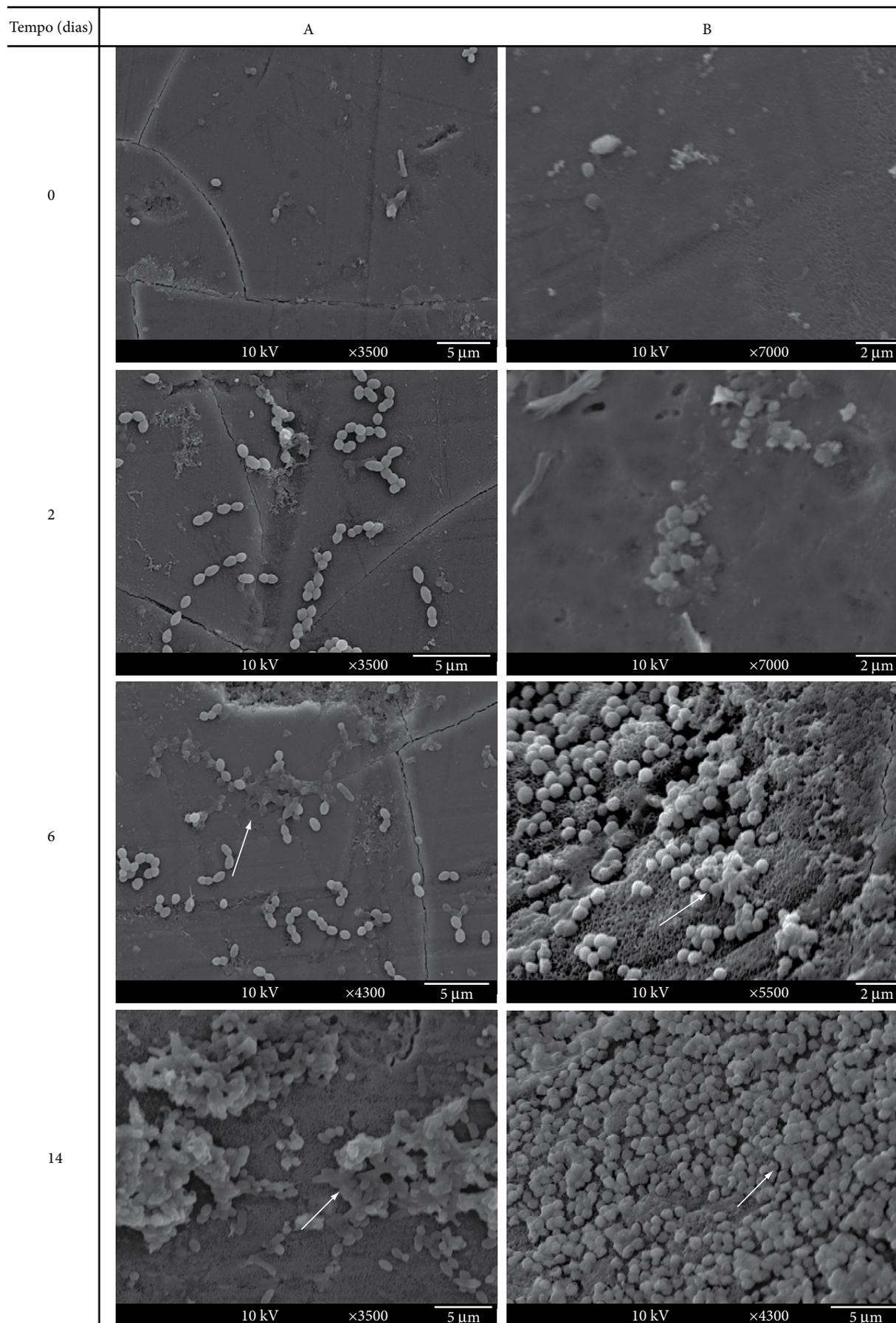


Figura 4. Fotomicrografias mostrando a adesão bacteriana a fragmentos de alumínio confeccionados a partir de canetas odontológicas, obtidas por microscopia eletrônica de varredura, em diferentes tempos de incubação. A coluna A é referente à *P. aeruginosa*. A coluna B é referente a *S. aureus*. As setas mostram estruturas sugestivas de matriz polimérica.

Tabela 1. Valores médios de absorvância com desvio padrão das amostras de *P. aeruginosa*, *S. aureus* e dos controles positivo e negativo, obtidos após leitura das placas de microtitulação pelo método do Cristal Violeta

Repetições	C-	C+	<i>Pseudomonas</i>				<i>Staphylococcus</i>			
1	0,007	0,548	0,08	0,102	0,103	0,089	0,249	0,31	0,239	0,25
2	0,01	0,499	0,09	0,098	0,113	0,11	0,228	0,25	0,269	0,26
3	0,008	0,531	0,11	0,126	0,112	0,1	0,247	0,22	0,272	0,23
4	0,009	0,562	0,09	0,099	0,107	0,112	0,294	0,27	0,253	0,35
5	0,011	0,575	0,1	0,1	0,113	0,108	0,214	0,22	0,314	0,24
6	0,013	0,477	0,11	0,093	0,115	0,098	0,252	0,32	0,28	0,28
7	0,009	0,529	0,1	0,12	0,101	0,102	0,406	0,24	0,505	0,27
8	0,01	0,588	0,09	0,101	0,098	0,106	0,469	0,42	0,266	0,31

(C-) Controle negativo (C+) Controle positivo.

Outra hipótese que pode justificar essa queda na adesão é a possível produção de metabólitos secundários que tenham afetado de alguma forma a adesão, temporariamente. Existe relato de que a produção e o acúmulo de metabólitos secundários tóxicos podem iniciar o processo de morte bacteriana e a desintegração do biofilme²⁴.

No presente modelo, os ensaios realizados pelo MCV forneceram informações sobre a adesão dos micro-organismos testados a uma superfície abiótica, na medida em que *P. aeruginosa* e *S. aureus* formaram biofilme sobre uma placa de microtitulação de poliestireno. A adesão de *P. aeruginosa* à superfície foi menor que a adesão exibida por *S. aureus* (Tabela 1). Resultado semelhante já havia sido descrito anteriormente a partir de um estudo experimental que observou menor adesão de *P. aeruginosa* em relação a outros micro-organismos testados, incluindo *S. aureus*²⁵.

Uma possível explicação para a menor adesão de *P. aeruginosa* se deve à composição da sua matriz, que é extremamente hidratada. Essa característica pode ter influenciado a adesão da bactéria durante o período de incubação de 24 horas. Outra explicação é que cepas com características hidrofóbicas tendem a ter melhor adesão às superfícies hidrofóbicas do que às superfícies hidrofílicas.

Em alguns estudos, o emprego do MCV para avaliação do biofilme envolvendo bactérias Gram-negativas como *P. aeruginosa*²⁶ e *E. coli*^{27,28} produziu resultados variáveis. Essa variabilidade pode gerar dúvidas nos pesquisadores quando estes realizam a extrapolação dos resultados que foram obtidos in vitro para outras aplicações. Essas dificuldades na interpretação dos dados foram relatadas por Stepanovic et al.¹⁴, que elaboraram um protocolo de padronização para etapas de execução da técnica e da análise de seus resultados. Por esta razão, tal protocolo foi utilizado no presente trabalho.

Um dos fatores relativos ao micro-organismo que pode influir na formação de biofilme é a presença de cápsula, como foi constatado recentemente²⁹. Neste estudo, foi demonstrado que *P. aeruginosa* e *S. aureus* produziram cápsula. Em outro estudo, no entanto, não foi possível estabelecer relação entre a produção de

cápsula e a adesão bacteriana em material de polimetilmetacrilato e silicone, embora todos os micro-organismos testados produzissem biofilme neste material³⁰.

Sabe-se que é muito importante a qualidade da água utilizada em consultórios odontológicos e que a sua contaminação por biofilme microbiano nas tubulações ao longo do tempo pode acarretar, principalmente através de aerossóis produzidos por turbinas de alta rotação, a disseminação dos micro-organismos para pessoas, produtos e equipamentos contidos nesse ambiente¹⁰. Embora os presentes experimentos tenham sido realizados in vitro e sob condições padronizadas, a metodologia utilizada permitiu claramente evidenciar a produção de biofilme por dois micro-organismos potencialmente patogênicos no mesmo tipo de material utilizado na fabricação das canetas odontológicas.

CONCLUSÃO

Nas condições experimentais desenvolvidas neste estudo, foi observada formação de biofilme por *P. aeruginosa* e *S. aureus* em fragmentos de canetas odontológicas a partir do sexto dia de incubação, com maior eficiência por *S. aureus*. Houve boa concordância entre os métodos de contagem de bactérias viáveis e de microscopia eletrônica de varredura. Os métodos do Ágar Vermelho Congo e Cristal Violeta, utilizados para uma avaliação indireta da produção de biofilme, se mostraram bastante sensíveis e poderiam ser utilizados para demonstrar característica presuntiva de um micro-organismo na formação de biofilme.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Michele Mann e Luciana Senter pelo apoio técnico durante a execução dos experimentos e a Eva Semensato, que permitiu a liberação do aluno do Tribunal de Contas do Estado (TCE) para a realização do Mestrado. Também agradecemos à CAPES, pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Davey ME, O'toole G. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000; 64: 847-67.
2. Costerton JW, Lewandowski Z. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol.* 1995; 49: 711-45.
3. Macedo JAB. Biofilmes bacterianos, uma preocupação da indústria farmacêutica. *Rev FÁrmac Medicam.* 2000; 2(7): 19-24.
4. Moreira ACA, Pereira AF, Menezes AR. Contaminação da água de equipamentos odontológicos por *Pseudomonas* sp. *Rev Ci Méd Biol.* 2006; 5: 146-50.
5. Rohde H, Frankenberger S, Zähringer U, Mack D. Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections. *Eur J Cell Biol.* 2010; 89: 103-11.
6. Walker JT, Bradshaw DJ, Bennett A, Fulford MR, Martin MV, Philip D, et al. Microbial biofilm formation and contamination of dental-unit water systems in general dental practice. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66: 3363-7.
7. Souza-Gugelmin MCM, Lima CDT, Lima SNM, Mian H, Ito IY. Microbial contamination in dental unit waterlines. *Braz Dent J.* 2003; 14: 55-7.
8. Szymanska J. Electron microscopic examination of dental unit waterlines biofilm. *Ann Agric Environ Med.* 2005; 12: 295-8.
9. Franco FFS, Spratt D, Leao JC, Porter SR. Biofilm formation and control in dental unit waterlines. *Biofilms.* 2005; 2: 9-17.
10. Simoes M, Simoes LC, Vieira MJ. Species association increases biofilm resistance to chemical and mechanical treatments. *Water Res.* 2009; 43: 229-37.
11. Parizzi SQF, Andrade NJ, Silva CAS, Soares NFF, Silva EAM. Bacterial adherence to different inert surfaces evaluated by epifluorescence microscopy and plate count method. *Braz Arch Biol Technol.* 2004; 47: 77-83.
12. Chaves LCD. Estudo da cinética de formação de biofilmes em superfícies em contato com água potável [dissertação mestrado]. Jaboticabal: Universidade do Minho; 2004.
13. Castro LAS. Processamento de mostras para microscopia eletrônica de varredura. Pelotas: Embrapa Clima Temperado; 2002.
14. Stepanovic S, Vukovic D, Hola V, Bonaventura GD, Djukic S, Cirkovic I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand.* 2007; 115: 891-9.
15. Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol.* 1989; 42: 872-4.
16. Ronner AB, Wong ACL. Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and buna-n rubber. *J Food Prot.* 1993; 56: 750-8.
17. Wirtanen G, Husmark U, Mattila-Sandholm T. Microbial avaluation of the biotranfer potencial from surfaces whih bacillus biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food-processing systems. *J Food Prot.* 1996; 59: 727-33.
18. Andrade NJ, Bridgeman TA, Zottola EA. Bacteriocidal activity of sanitizer against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. *J Food Prot.* 1998; 61: 833-8.
19. Marques SC, Rezende JGOS, Alves LAF, Silva BC, Alves E, Abreu LR, et al. Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass sufaces and its resistance to some chemical sanitizers. *Braz J Microbiol.* 2007; 38: 538-43.
20. Bott TR. Aspects of biofilm formation and destruction. *Corros Rev.* 1993; 11: 1-24.
21. Jefferson KK. What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol Lett.* 2004; 236: 163-73.
22. Melo PC. Estudo fenotípico e genotípico da produção de biofilmes por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas dos casos de mastite subclínica bovina [dissertação mestrado]. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista; 2008.
23. O'Toole G, Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol.* 1998; 30: 295-304.
24. Vermelho AB. Nutrição e crescimento das células procarióticas. In: Vermelho AB, Bastos MCF, Sa MHB. *Bacteriologia geral.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2007. p. 123-83.
25. Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Methods.* 2007; 72: 157-65.
26. Hentzer M, Teitzel GM, Balzer GJ, Heydorn A, Molin S, Givskov M, et al. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. *J Bacteriol.* 2001; 183: 5395-401.
27. Rivas L, Dykes GA, Fegan N. A comparative study of biofilm formation by Shiga toxigenic *Escherichia coli* using epifluorescence microscopy on stainless steel and a microtitre plate method. *J Microbiol Methods.* 2007; 69: 44-51.
28. Reisner A, Krogfelt KA, Klein BM, Zechner EL, Molin S. "In vitro" biofilm formation of commensal and pathogenic *Escherichia coli* strains: impact of environmental and gentic factors. *J Bacteriol.* 2006; 188: 3572-81.
29. Jain A, Agarwal A. Biofilm production, a marker of pathogenic potential of colonizing and commensal staphylococci. *J Microbiol Methods.* 2009; 76: 88-92.
30. Locatelli CI, Englert GE, Kwitko S, Simonetti AB. Aderência bacteriana in vitro a lentes intra-oculares de polimetilmetacrilato e de silicone. *Arq Bras Oftalmol.* 2004; 67: 241-8.

AUTOR PARA CORRESPONDÊNCIA

Prof. Dr. Amauri Braga Simonetti

Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
Rua Sarmento Leite, 500, 90050-170 Porto Alegre - RS, Brasil

e-mail: amauri@ufrgs.br

Recebido: 28/05/2010

Aceito: 24/08/2010