

TESTAGEM RÁPIDA DO VERMELHO-CONGO PARA PRESUMIR ADESÃO DE PSEUDOMONADAS APÓS EXPOSIÇÃO À IRRADIAÇÃO DE LED AZUL (460 NM)

RAPID CONGO RED TESTING TO PRESUME ADHESION OF PSEUDOMONADS AFTER EXPOSURE TO BLUE LED IRRADIATION (460 NM)

Victor Targino Gomes¹

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal da Paraíba, Campus I, João Pessoa-PB, Brasil
<https://orcid.org/0000-0002-8188-106X>
victor.gomes@fpb.edu.br

Hueliton Borchardt²

Universidade Federal da Paraíba, Centro de Biotecnologia, Via Ipê Amarelo s/n Campus I, João Pessoa-PB, Brasil
<https://orcid.org/0000-0002-9137-9313>
hb@academico.ufpb.br

Luiz Gustavo Pragana²

Universidade Federal da Paraíba, Centro de Biotecnologia, Via Ipê Amarelo s/n Campus I, João Pessoa-PB, Brasil
<https://orcid.org/0000-0002-9760-3013>
prngustavo@gmail.com

Débora Conceição da Silva Amaral²

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal da Paraíba, Campus I, João Pessoa-PB, Brasil
debora.amaral.bio@gmail.com

Ulrich Vasconcelos³

Departamento de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, Via Ipê Amarelo s/n Campus I, João Pessoa-PB, Brasil
<http://orcid.org/0000-0001-8289-2230>
u.vasconcelos@cbiotec.ufpb.br

¹Desenvolvimento dos protocolos; Análise crítica dos resultados; Escrita: 1ª redação e revisão

²Desenvolvimento dos protocolos; Análise e discussão dos resultados em grupo

³Administração do Projeto; Orientação; Análise formal; Revisão e Edição

Recebido: 27/07/2024. Aprovado: 01/11/2024. Publicado: 14/11/2024



Esta obra está licenciada com uma Licença [Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

RESUMO

O tratamento por irradiação com luz de LED representa uma perspectiva sustentável no controle do crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* em alimentos. O presente trabalho apresenta a aplicação do teste rápido do vermelho-Congo na verificação da presença de células com alta capacidade de formar biofilmes após tratamento com luz azul. Quatro isolados de *P. aeruginosa* foram testados quanto à capacidade de formar biofilmes antes e após 2h de exposição à luz de LED azul de alta frequência (460 nm). O biofilme foi quantificado pelo teste do cristal violeta. Não houve redução significativa das células, tampouco perda da capacidade de formar biofilme. O teste do vermelho-Congo indicou que apenas um isolado tinha potencial de manter as características de adesão antes do tratamento, porém os resultados sugerem que a avaliação deve ser conduzida em células previamente expostas à luz, como um teste rápido e complementar às práticas de higiene.

Palavras-chave: Biofilme. Espoliação de alimentos. *Pseudomonas aeruginosa*.

ABSTRACT

Treatment by irradiation with LED light represents a sustainable perspective in controlling the growth of *Pseudomonas aeruginosa* in food. The present work presents the application of the rapid Congo red test to verify the presence of cells with a high capacity to form biofilms after treatment with blue light. Four *P. aeruginosa* isolates were tested for their ability to form biofilms before and after 2 h of exposure to high-frequency blue LED light (460 nm). Biofilm was quantified by the crystal violet test. There was no significant reduction in cells, nor loss of the ability to form biofilm. The Congo red test indicated that only one isolate had the potential to maintain adhesion characteristics before treatment, however our results suggest that the evaluation should be conducted on cells previously exposed to light, as a rapid and complementary test after hygiene practices.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*. Biofilm. Food spoilage.

1 INTRODUÇÃO

A luz de LED pode ser utilizada para controlar o crescimento microbiano em alimentos (Chen *et al.*, 2023). *Pseudomonas aeruginosa* é um bacilo Gram-negativo não fermentador produtor de piocianina, proteases e outros fatores de virulência (Algammal *et al.*, 2020), comumente associado à colonização em biofilmes que podem levar ao processo de deterioração de carnes e diversos outros alimentos frescos ou processados, sendo reconhecido como o principal microrganismo espoliador em termos de contaminação de alimentos (Stellato *et al.*, 2016).

A irradiação de LED é uma estratégia vantajosa porque, além de ser sustentável, apresenta características importantes, tais como disponibilidade de ampla faixa de comprimentos de onda, baixo consumo de energia e menos emissão de poluentes secundários (Mukunda *et al.*, 2020). A aplicação de energia luminosa de LED causa danos às células (Cheng *et al.*, 2020) e pode aumentar de 12 a 24h a manutenção da cor da carne na prateleira (Steele *et al.*, 2016).

O impacto da energia luminosa intensa nos microrganismos causa danos à membrana celular, transcrição gênica e

regulação metabólica (Gallé *et al.*, 2021). A luz incidente ao meio de crescimento e desenvolvimento dos microrganismos faz com que ocorra um desequilíbrio metabólico, bem como o consumo de substratos e redução da atividade enzimática no controle de Espécies Reativas de Oxigênio formadas (ERO's), as quais tendem a se concentrar intracelularmente (Kim e Kan, 2021; Pousty *et al.*, 2021).

A capacidade de formar biofilme por um microrganismo pode ser prevista por testes de fenotipagem (Lee *et al.*, 2016). Assim, este trabalho objetivou verificar a capacidade de isolados de *P. aeruginosa* em formar biofilmes, antes e após exposição de até 2h à irradiação de luz de LED, por meio de um teste simples utilizando vermelho-Congo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MICRORGANISMOS

O estudo utilizou quatro isolados de *P. aeruginosa*, obtidos de paredes internas de ralos de pias de laboratório didático de uma Instituição de ensino de saúde. Os isolados estão cadastrados no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob acessos: isolado 2A (ADBF7C7), isolado 2B (A630377), isolado 3A (AEC4165) e isolado 3B (A473A1B). Para fins de comparação foi utilizada a linhagem

padrão *P. aeruginosa* UFPEDA 416 (ATCC 27583).

Os isolados de *P. aeruginosa* foram mantidos em ágar nutriente e para os testes foram preparados inóculos de cultivo recente em NaCl a 0,9%, com turbidez padronizada com o tubo nº 0,5 da escala de MacFarland.

2.2 FENOTIPAGEM DAS BACTÉRIAS PRODUTORAS DE BIOFILME

Foi empregado o protocolo descrito por Mirani *et al.* (2018), seguido de alterações pontuais. Brevemente, os isolados foram incubados em ágar nutriente adicionado com sacarose (50 g/L) e vermelho-Congo (0,8 g/L). Após a incubação a 37°C por 24 h, a coloração das colônias foi observada e a capacidade das células em formar biofilme foi categorizada como fraca, se as colônias fossem rosas; e fortes, caso apresentassem pretas e com aspecto seco.

2.3 EXPOSIÇÃO À IRRADIAÇÃO DA LÂMPADA DE LED

Foi empregada o protocolo descrito por Kumar *et al.* (2017). Alíquotas de 1 mL do inóculo foram transferidas para placas de Petri contendo 9 mL de solução tampão fosfato (pH = 7,0) e em seguida, foi submetida a 2 h de exposição à irradiação de uma lâmpada de LED de alta potência (G-light, A60, China) a 460 nm, disposta a 13 cm do centro da placa, resultando na

emissão de energia de 487,01 mW/cm². (487.010 J/m²). Foram tomadas alíquotas nos tempos 0,5; 1 e 2 h.

2.4 ANÁLISE *IN VITRO* DA FORMAÇÃO DO BIOFILME

Nos intervalos marcados de exposição das células à irradiação luminosa de LED azul, alíquotas de 100 µL foram transferidas para microtubos contendo 900 µL de caldo BHI. Em seguida, os sistemas foram incubados por 24 h à 37°C. Para quantificar o biofilme formado foi realizado o teste do cristal violeta (Ommen *et al.*, 2017). Resumidamente, o sobrenadante nos poços foi descartado e as paredes foram cuidadosamente lavadas com água corrente e deixadas para secar por 1 h. Em seguida foram adicionados 1000 µL da solução de cristal violeta 1% e após repouso de 20 min, a solução de cristal violeta foi cuidadosamente desprezada. O excesso do corante foi removido com água corrente, preenchendo-se novamente os poços com 1000 µL de etanol absoluto. Após um breve repouso, a densidade óptica da solução cristal violeta-etanol do tratamento (OD_t) e do controle (OD_c) foi medida em 590 nm (Kasvi, 320-1020 nm, 4NM). Para o cálculo do percentual de inibição das células foi empregada a equação 1:

$$\% = [(OD_t - OD_c) \div OD_t] \times 100 \quad (1)$$

O percentual de inibição foi classificado de acordo com Kwasny e Opperman (2010), em que, é considerado alto ($\geq 80\%$), moderado (entre 40 e 80%) ou fraco ($\leq 40\%$). Os experimentos foram realizados em triplicata.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os isolados tiveram um percentual de inibição considerado fraco em até 2h de exposição à irradiação de LED, i.e., todos valores de redução na formação do biofilme, comparado aos achados no controle foram significativamente abaixo de 40%, alcançando valores ínfimos entre aproximadamente 0,2 e 6,0%; observando-se em alguns casos, nenhuma inibição.

Os valores foram muito semelhantes para três isolados (2A, 2B e 3A), enquanto a redução do biofilme do isolado 3B foi nula, porém todas estatisticamente similares ($p < 0,05$). Na tabela 1, os resultados estão apresentados, como as médias e seus respectivos desvios padrões.

Tabela 1 – Percentual de inibição do biofilme após exposição à irradiação da LED a 460nm

Isolado	Tempo de exposição à luz (h)		
	0,5	1,0	2,0
2A	4,1±0,2%	4,8±0,0%	4,6±0,1%
2B	6,3±0,0%	6,0±0,3%	5,3±0,2%
3A	5,1±0,1%	6,4±0,1%	6,1±0,3%
3B	0,2±0,2%	0,0%±0,0	0,4±0,3%

Com a ressalva de que no teste fenotípico deve-se considerar a subjetividade, apenas o isolado 2B apresentou potencial de formação de biofilme após exposição à irradiação de LED. Enquanto nos demais isolados ficou demonstrado um fraco potencial de formação de biofilme (Tabela 2). Embora tenha sido observada uma coloração mais clara das colônias após 2h de tratamento, isto não alterou o resultado do teste, contudo foi sugestivo de possíveis danos celulares, com conseguinte correção e reparo.

Tabela 02 – Análise fenotípica sobre o potencial de formação de biofilme

Isolados	Controle (antes)	Tempo de exposição à luz (h)		OD
		0,5	2,0	
2A	++	++	**	0,567
2B	***	***	***	0,568
3A	++	++	***	0,568
3B	+++	+++	***	0,572
UFPEDA 416	+++	++	**	0,580

+: colônias rosas (sem capacidade de formar biofilme);

*: colônias cinzas (com capacidade de formar biofilme); OD: densidade óptica a 590 nm (medida após o teste com luz. Os valores representam a média±erro de 0,002).

Fonte: Autores

Este trabalho utilizou o teste de fenotipagem com vermelho-Congo para verificar a resposta de isolados de *P. aeruginosa* a possíveis danos causados por irradiação de LED de alta potência, sob comprimento de onda na faixa que pode causar injúrias celulares (Hyun e Lee,

2020). Os comprimentos de onda na faixa da cor azul (405-470 nm) são reconhecidos pela sua ação antimicrobiana (Yang *et al.*, 2020). Em complemento, a emissão de luz azul é um inibidor do crescimento de *P. aeruginosa* (Maclean *et al.*, 2009). Um dos mecanismos de ação propostos versa sobre o fato de que o aquecimento e estímulo luminoso da célula tendem acelerar o metabolismo, resultando no consumo de mais substratos e nutrientes disponíveis e levando à liberação de metabólitos e estresse oxidativo por *P. aeruginosa* (Chen *et al.*, 2022; Feng *et al.*, 2021).

Ocorre que nas condições testadas, a irradiação de lâmpada de LED azul (460 nm) não demonstrou atividade antimicrobiana sobre os isolados. Estes achados coincidiram com os resultados observados por Martegani *et al.* (2020), que descreveram pouca inibição do biofilme de *P. aeruginosa* no comprimento de onda da luz azul. Os autores atribuíram o resultado ao fato da presença do que denominaram por “substâncias endógenas” presentes na bactéria. Tais moléculas agiriam como elementos protetivo e regenerativo da célula quando exposta ao estresse.

Por outro lado, a inibição de *P. aeruginosa* pela luz azul está disponível bem descrita na literatura (Fila *et al.*, 2017), contudo, nem todos as células de *P. aeruginosa* se mostram sensíveis, uma vez

que muitos isolados exibem diversos mecanismos de adaptação ao estresse e estes, podem contribuir para a manutenção da integridade celular, tais como a produção de exopolímeros e pigmentos (Nizer *et al.*, 2021).

Já Ferrer-Espada *et al.* (2020) observaram que a ação antibiofilme da irradiação com lâmpada de LED a 405 nm ocorreu até 24 h de exposição. Após esse tempo, os danos celulares foram minimizados devido a síntese de lipídios fotoprotetores e moléculas antioxidantes que podem inativar os radicais livres e oxigênio singlete formados. Nestes termos, a ação antimicrobiana e antibiofilme da irradiação de LED depende da energia dirigida, estágio da cinética de crescimento, capacidade da célula em reparar e do desprendimento do biofilme (Galo *et al.*, 2022).

Isto pode explicar o fato da pouca mudança do fenótipo após exposição por 120 min à irradiação da lâmpada de LED, diferente do observado aos 30 min e no controle. Tal alteração pode decorrer devido injúria celular causada durante a exposição e conseguinte reparo intracelular de estruturas bacterianas. Em *P. aeruginosa* este evento também está possivelmente ligado à síntese de fenazinas (Jabir, 2022; Kowalska *et al.*, 2020).

A análise fenotípica com vermelho-Congo para o reconhecimento da célula da

sua capacidade de colonizar em biofilmes é qualitativa e não específica, e se torna uma boa opção de varredura de isolados, identificando possíveis falhas no tratamento com luz de LED azul em alimentos de prateleira. Anan *et al.* (2024), ao avaliarem 50 linhagens de *P. aeruginosa* verificaram que em caldo BHI, 38% testaram positivo para este elevado potencial de formação de biofilme. Isto alerta para o fato da necessidade de manejo rigoroso do alimento uma vez que em prateleira também está sujeito à contaminação cruzada de patógenos (Kirchner *et al.*, 2021). Em complemento, esta contaminação cruzada pode favorecer trocas de genes de resistência entre as células, magnificando o problema da espoliação do alimento (Karanth *et al.*, 2023), bem como representando ameaça à saúde do consumidor, uma vez que *P. aeruginosa* é responsável por infecções em diferentes partes do corpo, mas infelizmente, ainda subestimadas (Liang *et al.*, 2023).

4 CONCLUSÃO

A irradiação com lâmpada de LED azul não causou injúria desejada nos primeiros momentos de exposição, resultando a inibição do biofilme de moderada à fraca. O ensaio do vermelho-Congo mostrou que os isolados de *P. aeruginosa* após o tratamento com luz azul não perderam a capacidade de formar

biofilmes robustos e sugere-se que este teste rápido pode servir como indicativo de ameaças microbianas, em termos de deterioração do alimento fresco em prateleira, bem como em termos dos riscos à saúde que *P. aeruginosa* representa como patógeno. De acordo com os resultados obtidos neste estudo, recomenda-se que o teste do vermelho-Congo seja realizado com células que já tenham sido expostas à luz.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer ao Programa de Mestrado em Biologia Celular e Molecular (PGBCM/CCEN/UFPB), bem como ao Programa de Iniciação Científica promovido pela Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal da Paraíba.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Algammal, A.M.; Mabrok, M.; Sivaramasamy, E.; et al. Emerging MDR-*Pseudomonas aeruginosa* in fish commonly harbor *oprL* and *toxA* virulence genes and bla TEM, bla CTX-M, and *tetA* antibiotic-resistance genes. **Sci Rep.** v. 10, p. 15961, 2020. doi: 10.1038/s41598-020-72264-4

Anan, M.M.G.; Abu-El-Azayem, A.K.; Elkashef, S.M.M. Comparison of two *in vitro* phenotypic methods (tissue culture plate and Congo red agar) for detection of biofilm formation by Enterococci. **Egypt J Med Microbiol.** v. 33, p. 325935, 2024. doi: 10.21608/EJMM.2024.325935

Cheng, Y.; Chen, H.; Basurto, L.A.S.; et al. Inactivation of *Listeria* and *E. coli* by

deep-UV LED: effect of substrate conditions on inactivation kinetics. **Sci Rep.** v. 10, p. 3411, 2020. doi: 10.1038/s41598-020-60459-8

Chen, M.; Cai, Y.; Li, G.; et al. The stress response mechanisms of biofilm formation under sub-lethal photocatalysis. **Appl Catal Environ.** v. 307, p. 121200, 2022. doi: 10.1016/j.apcatb.2022.121200

Chen, H.; Cheng, Y.; Moraru, C.I. Blue 405 nm LED light effectively inactivates bacterial pathogens on substrates and packing materials used in food processing. **Sci Rep.** v. 13, p. 15472, 2023. doi: 10.1038/s41598-023-42347-z

Feng, Q.; Luo, L.; Chen, X.; et al. Facilitating biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* via exogenous N-Acy-L-homoserine lactones stimulation: Regulation on the bacterial motility, adhesive ability and metabolic activity. **Bioresour Technol.** v. 341, p. 125727, 2021. doi: 10.1016/j.biortech.2021.125727

Ferrer-Espada, R.; Wang, Y.; Goh, X.S.; et al. Antimicrobial blue light inactivation of microbial isolates in biofilms. **Lasers Surgery Med.** v. 52, n. 5, p. 472-478, 2020. doi: 10.1002/lsm.23159

Fila, G.; Kawiak, A.; Grinholc, M.S. Blue light treatment of *Pseudomonas aeruginosa*: strong bactericidal activity, synergism with antibiotics and inactivation of virulence factor. **Virulence.** v. 8, n. 6, p. 938-958, 2017. doi: 10.1080/21505594.2016.1250995

Galo, I.D.C.; Prado, R.P.; Santos, W.G. Blue and red light photoemitters as approach to inhibit *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* growth. **Braz J Biol.** v. 82, p. e231742, 2021. doi: 10.10590/1519-6984.231742

Gallé, Á.; Czekus, Z.; Toth, L.; et al. Pest and disease management by red light. **Plant Cell Environ.** v. 44, n. 10, p.

3197-3210, 2021. doi:
10.1111/pce.14142

Hyun, J-E; Lee, S-Y. Antibacterial effect and mechanisms of action of 460-470 nm light-emitting diode against *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas fluorescens* on the surface of packaged sliced cheese. **Food Microbiol.** v. 86, p. 103314, 2020. doi: 10.1016/j.fm.2019.103314

Jabir, D.M. Evaluation of the ability of some bacterial species isolated from UTI to form biofilm. **Al-Qadisiyah J Pure Sci.** v. 27, n. 1, p. 8-14, 2022. doi: 10.29350/qjps.2022.27.1.1492

Karanth, S.; Feng, S.; Patra, D.; et al. Linking microbial contamination to food spoilage and food waste: the role of smart packing, spoilage risk assessments, and date labeling. **Front Microbiol.** v. 14, p. 1198124, 2023. doi: 10.3389/fmicb.2023.1198124

Kim, D.; Kang, D. Efficacy of light-emitting diodes emitting 395, 405, 415, and 425 nm blue light for bacterial inactivation and the microbicidal mechanism. **Food Res Int.** v. 141, p. 110105, 2021. doi: 10.1016/j.foodres.2021.110105

Kirchner, M.; Coulter, R.M.; Chapman, B.J.; et al. Cross-contamination on atypical surfaces and venues in food service environments. **J Food Protec.** v. 84, n. 7, p. 1239-1251, 2021. doi: 10.4315/JFP-20-314

Kowalska, J.; Mackiw, E.; Stasiak, M.; et al. Biofilm-forming ability of pathogenic bacteria isolated from retail food in Poland. **J Food Protect.** v. 83, n. 12, p. 2032-2040, 2020. doi: 10.4315/JFP-20-135

Kwasny, S.M.; Opperman, T.J. Static biofilm cultures of gram-positive pathogens grown in a microtiter format used for anti-biofilm drug discovery. **Curr Protoc Pharmacol.** v. 50, n. 13-A8, 2010. doi: 10.1002/0471141755.ph13a08s50

Kumar, A.; Ghatge, V.; Kim, M-J.; et al. Inactivation and changes in metabolic profile of selected foodborne bacteria by 460 nm LED illumination. **Food Microbiol.** v. 63, p. 12-21, 2017. doi: 10.1016/j.fm.2016.10.032

Lee, J-S.; Bae, Y-M; Han, A.; et al. Development of Congo red broth method for the detection of biofilm-forming or slime-producing *Staphylococcus* sp. **LWT.** v. 73, p. 707-714, 2016, doi: 10.1016/j.lwt.2016.03.023

Liang, J.; Huang, T.Y.; Li, X.; et al. Germicidal effect of intense pulsed light on *Pseudomonas aeruginosa* in food processing. **Front Microbiol.** v. 14, p. 1247364, 2023. doi: 10.3389/fmicrb.2023.1247364

Martegani, E.; Bolognese, F.; Trivellini, N. et al. Effect of blue light at 410 and 455 nm on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. **J Photochem Photobiol A.** v. 204, p. 111790, 2020. doi: 10.1016/j.photobiol.2020.111790

Maclean, M., Macgregor, S.J., Anderson, J.G.; et al. Inactivation of bacterial pathogens following exposure to light from a 405-nanometer light-emitting diode array. **Appl Environ Microbiol.** vol. 75, no. 7, pp. 1932-1937, 2009. doi: 10.1128/AEM.01892-08

Mirani, Z.A.; Fatima, A.; Urooj, S.; et al. Relationship of cell surface hydrophobicity with biofilm formation and growth rate: A study on *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli*. **Iran J Basic Med Sci.** v. 21, n. 7, p. 760, 2018. doi: 10.22038/IJBMS.2018.28525.6917

Mukunda, D.C.; Joshi, V.K.; Mahato, K.K. Light emitting diodes (LEDs) in fluorescence-based analytical applications: a review. **Appl Spectroscopy Rev.** p. 1-38, 2020. doi: 10.1080/05704928.2020.1835939

Nizer, W.S.C.; Inkovskiy, V.; Versey, Z.; et al. Oxidative stress response in *Pseudomonas aeruginosa*. **Pathogens**. v. 10, n. 9, p. 1187, 2021. doi: 10.3390/pathogens10091187

Ommen, P.; Zobek, N.; Meyer, R. Quantification of biofilm biomass by staining: Nontoxic safranin can replace the popular crystal violet. **J Microbiol Methods**. v. 141, p. 87-89, 2017. doi: 10.1016/j.mimet.2017.08.003

Pousty, D.; Hofmann, R.; Gerchaman, Y.; et al. Wavelength-dependent time-dose reciprocity and stress mechanism for UV-LED disinfection of *Escherichia coli*. **J Photochem Photobiol Biol**. v. 217, p. 112129, 2021. doi: 10.16/j.jphotbiol.2021.112129

Steele, K.S.; Weber, M.J.; Boyle, E.A.E.; et al. Shelf life of fresh meat products under LED or fluorescent lighting. **Meat Sci**. v. 117, p. 75-84, 2016. doi: 10.1016/j.meatsci.2016.02.032

Stellato, G.; Utter, D.R.; Voorhis, A. A few *Pseudomonas* oligotypes dominate in the meat and dairy processing environment. **Front Microbiol**. v. 8, p. 264, 2017. doi: 10.3389/fmicb.2017.00264

Yang, Y.; Ma, S.; Xie, Y.; et al. Inactivation of *pseudomonas aeruginosa* biofilms by 405-nanometer-Light-Emitting Diode illumination. **Appl Environ Microbiol**. v. 86, n. 10, p. e00092-20, 2020. doi: 10.118/AEM.00092-20