

FORMAÇÃO DE BIOFILME POR *Vibrio parahaemolyticus* ISOLADOS DE PESCADOS

JANAINA VIANA DA ROSA¹; AGNES ISADORA ADAMATTI DE SOUZA²; NATÁLIA VOLPATO DA CONCEIÇÃO³; KAROLINE KAEFER⁴; RITA DE CÁSSIA DOS SANTOS DA CONCEIÇÃO⁵; CLÁUDIO DIAS TIMM⁶

¹*Universidade Federal de Pelotas – janavrosa@yahoo.com.br*

²*Universidade Federal de Pelotas – agnes_isadora@hotmail.com*

³*Universidade Federal de Pelotas – natalia-volpato@hotmail.com*

⁴*Universidade Federal de Pelotas – kaeferkarol@gmail.com*

⁵*Universidade Federal de Pelotas – ritinhaconceicao@hotmail.com*

⁶*Universidade Federal de Pelotas – timm@ufpel.tche.br*

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o consumo de peixes tem aumentado devido às propriedades nutricionais da carne, considerada rica em proteínas de elevado valor biológico, vitaminas, sais minerais e ácidos graxos insaturados, como ômega-3. Apresenta, ainda, alta digestibilidade e possui baixa quantidade de gordura saturada, o que propicia benefícios para a saúde humana (FDA, 2009). A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda o consumo de peixes uma ou duas vezes por semana (WHO, 2003).

A espécie *Vibrio parahaemolyticus* é um patógeno que causa doença de origem alimentar em humanos (MC LAUGHLIN, 1995), sendo responsável por uma proporção significativa de infecções relacionadas ao consumo de pescados crus ou mal cozidos ou que tenham sido recontaminados (RIPPEY, 1994). *V. parahaemolyticus* se distribui em todo o mundo, sendo mais abundante nas regiões quentes. Pode ser isolado de pescados e a sua presença, mesmo com pequeno número de células bacterianas, já representa perigo para os consumidores (SU, 2007). Este micro-organismo pode causar diarreia, dor abdominal, vômitos, febre e dores de cabeça (HUSS, 1997).

Segundo McCARTER (1999), *V. parahaemolyticus* possui uma eficiência acentuada na colonização da superfície de organismos e outros materiais, o que é determinado pela sua capacidade de formar biofilmes. Biofilme é uma comunidade de micro-organismos sésseis caracterizada por células que se aderem a uma superfície, embebidas em uma matriz extracelular formada por exopolissacarídeos (DONLAN e COSTERTON, 2002). Existe uma alta prevalência de infecções relacionadas com biofilme, já que as bactérias, quando em biofilmes, podem ser até 1000 vezes mais resistentes a antibióticos e pode conter suficiente número de bactérias para representar uma potencial dose infectiva. Na indústria alimentícia, os biofilmes são associados à contaminação de instalações e equipamentos (GÁMEZ et al., 2004). A temperatura ótima para *V. parahaemolyticus* formar biofilme, de acordo com a Comissão Internacional em Especificações Microbiológicas para Alimentos (1995), é 37°C. Este estudo teve como objetivo avaliar a capacidade de cepas de *V. parahaemolyticus* isoladas a partir de pescados formarem biofilmes em placas de microtitulação.

2. METODOLOGIA

Foram utilizadas sete cepas de *V. parahaemolyticus* previamente isoladas por ROSA (2014), três de peixes inteiros, duas de *Mugil platanus* (tainha) e uma de *Micropogonias furnieri* (corvina), e quatro de *M. platanus* limpos e prontos para comércio, e ainda quatro isolados obtidos por MILAN et al. (no prelo), dois de *Farfantepenaeus paulensis* (camarão-rosa) e dois de *Paralichthys orbignyanus* (linguado).

Os isolados foram avaliados quanto à sua capacidade de produção de biofilme em placas de microtitulação (Nunclon, Nune, Roskilde, Denmark), seguindo a técnica descrita por JANSSENS et al. (2008), com modificações, de forma a adaptar o método para *V. parahaemolyticus*. Foram colocados 200 µL de Água Peptonada Alcalina (APA, Himedia, Mumbai, Índia) em cada poço da placa de microtitulação adicionados de 2 µL de culturas *overnight* em APA de cada cepa padronizadas em espectrofotômetro a 600 nm para valor 0,7 de densidade ótica (DO). Poços com 200 µL de caldo APA, sem cultura bacteriana, foram utilizados como controle. Então, a tampa foi colocada sobre a placa e incubada durante 48 h a 37°C sem agitação. Durante a incubação, os biofilmes se formaram sobre a superfície das cavidades, nas tampas. Para quantificação da formação de biofilmes, as tampas foram lavadas em 200 µL de solução salina tamponada com fosfato (PBS, 0,1 M, pH 7,0). O material que permaneceu ligado à tampa foi corado durante 30 min com 200 µL de cristal violeta 0,1% (m/v), lavado em água destilada estéril (200 µL) e a tampa foi seca em temperatura ambiente por 30 min. O corante que permaneceu ligado ao biofilme foi extraído com ácido acético glacial 30% (200 µL). A DO₅₇₀ de cada poço foi medida utilizando leitor de placas de microtitulação. Cada cepa foi classificada como não formadora de biofilme, fracamente formadora, moderadamente formadora ou fortemente formadora, de acordo com os procedimentos sugeridos por STEPANOVIC et al. (2000). O ponto de corte (DOc) foi definido como três desvios padrões acima da média das DOs dos controles e a classificação foi determinada conforme segue.

DO ≤ DOc = não formadora

DOc < DO ≤ 2 x DOc = fraca formadora

2 x DOc < DO ≤ 4 x DOc = moderada formadora

4 x DOc < DO = forte formadora

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sete cepas isoladas por ROSA (2014) (63,6%) foram consideradas fortes formadoras de biofilme. Das cepas isoladas por MILAN et al. (no prelo), uma (9,1%) foi considerada fraca formadora e três (27,3%) foram não formadoras de biofilme. ELEXSON et al. (2014), trabalhando com 36 isolados de *V. parahaemolyticus* obtidos de *Anadara granosa* (berbigão), *Mya arenaria* (marisco-branco), *Penaeous spp.* (camarões) e *Loligo opalescens* (lula), obtiveram a porcentagem total de formação de biofilme a 37°C de 33,33% para cada uma das classificações: fraca, moderada e forte formadora de biofilme. Com os nossos resultados e os de ELEXSON et al. (2014) podemos observar que a maioria dos *V. parahaemolyticus* são formadores de biofilme, o que facilitaria sua permanência em alimentos, assim como em equipamentos e utensílios utilizados no processamento do pescado, já que, segundo MILAN et al. (2015), a formação de biofilme é causa de graves problemas na indústria, devido aos fatores citados anteriormente.

Todas as cepas de peixes limpos (*M. platanus*) analisadas em nosso trabalho, assim como as cepas de peixes inteiros de *M. platanus* e *M. furnieri* foram fortes

formadoras de biofilme, já as cepas isoladas de *F. paulensis* foram não formadoras, assim como com uma cepa de *P. orbignyanus*. Já a outra cepa de *P. orbignyanus* foi considerada como fraca formadora de biofilme. Estes resultados estão de acordo com a afirmação de McCARTER (1999), de que realmente *V. parahaemolyticus* possui capacidade elevada de formar biofilme, já que apenas três cepas estudadas foram consideradas não formadoras (27,3%).

A capacidade das cepas testadas de formar biofilme é preocupante, já que, segundo JEFFERSON (2004), o micro-organismo no biofilme consegue suportar por mais tempo a privação de nutrientes bem como mudanças de pH e desinfetantes.

4. CONCLUSÕES

V. parahaemolyticus isolados de *M. platanus* e *M. furnieri*, tanto inteiros como limpos e prontos para o comércio são fortemente capazes de formar biofilme.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.M. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Review**, Washington DC, v. 15, p. 167-193, 2002.

ELEXSON, N.; YAYA, R.; NOR, A.M.; KANTILAL, H.K.; UBONG, A.; YOSHITSUGU, N.; NISHIBUCHI, M.; SON, R. Biofilm assessment of *Vibrio parahaemolyticus* from seafood using Random Amplified Polymorphism DNA-PCR. **International Food Research Journal**, Malaysia, v.21, n.1, p. 59-65, 2014.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Draft report of quantitative risk and benefit assessment of consumption of commercial fish, focusing on fetal neurodevelopmental effects (Measured by Verbal Development in Children) and on coronary heart disease and stroke in the general population.** FDA. Silver Spring, 15 jan. 2009. Acessado em: 23 jun. 2015. Online. Disponível em: <http://www.fda.gov/food/foodborneillnesscontaminants/metals/ucm088794.htm>

GÁMEZ, C. I.; Galavíz, J.R.G.; Silva, L.G.; Garza, Z.J.M.; Velarde, M.S.T. Detección y prevalencia de *Vibrio* spp em cultivo de camarón *Litopenaeus vannamei* en Sonora durante o ciclo 2003. **Revista Salud Pública y Nutrición**, San Nicolás de los Garza, n. 6, 2004.

HUSS, H.H. Control of indigenous pathogenic bacteria in seafood. **Food Control**, EUA, v. 8, p. 91-98, 1997.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOOD (ICMSF). **Microorganisms in foods 5**. London: Blackie Academic and Professional, 1995.

JANSSENS, J.C.A.; STEENACKERS, H.; ROBIJNS, S.; GELLENS, E.; LEVIN, J.; ZHAO, H.; HERMANS, K.; COSTER, D.D.; VERHOEVEN, T.L.; MARCHAL, K.; VANDERLEYDEN, J.; VOS, D.E.D.; KEERSMAECKER, S.C.J.D. Brominated Furanones Inhibit Biofilm Formation by *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium.

Applied and Environmental Microbiology, Washington DC v. 74, n. 21, p. 6639–6648, 2008.

JEFFERSON, K.K. What drives bacteria to produce a biofilm? **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v.236, n.2, p.163-173, 2004.

KAYSNER, C.A.; DEPAOLA Jr. **Vibrio**. U.S. Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual (BAM), 2004. Acessado em: 20 de jun. 2015. Online. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm070830.htm>

McCARTER, L. The multiple identities of *Vibrio parahaemolyticus*. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, Canadá, v.1, p.51–57, 1999.

McLAUGHLIN, J.C. *Vibrio*. In MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. **Manual of Clinical Microbiology**. Washington DC: ASM Press, 1995. p. 465-474.

MILAN, C.; AGOSTINETTO, A.; CONCEIÇÃO, R.C.S.; GONZALEZ, H.L.; TIMM, C.D. Sanitizer resistance of biofilm-forming *Salmonella* isolated from meat products. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Minas Gerais, v.67, n.2, p. 642-646, 2015.

MILAN, C.; SILVEIRA, D.R.; ROSA, J.V.; TIMM, C.D. *Vibrio parahaemolyticus* isolados de pescados do estuário da Lagoa dos Patos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, no prelo.

RIPPEY, S.R. Infectious diseases associated with molluscan shellfish consumption. **Clinical Microbiology**, Washington DC, v.7, p.419-425, 1994.

ROSA, J.V. **Micro-organismos patogênicos em pescados do estuário da lagoa dos patos**. 2014. 36f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)- Curso de Pós- graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, Netherlands, v.40, p.175-179, 2000.

SU, Y.C.; LIU, C. *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety. **Food Microbiology**, EUA, v.24, p.549-58, 2007.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Geneva, 2003. **Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases**. Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation. [WHO Technical Report Series 916]. Acessado em: 21 jun. 2015. Online. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/trs/who_trs_916.pdf