

## FORMAÇÃO DE BIOFILME POR *Vibrio parahaemolyticus* ISOLADOS DE PESCADOS, APÓS ESTRESSE SUBLETAL

JANAINA VIANA DA ROSA<sup>1</sup>; NATÁLIA VOLPATO<sup>2</sup>; KAROLINE KAEFER<sup>3</sup>; RITA DE CÁSSIA DOS SANTOS DA CONCEIÇÃO<sup>4</sup>; CLÁUDIO DIAS TIMM<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas–janavrosa@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas–natalia-volpato@hotmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas–kaeferkarol@gmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – ritinhaconceicao@hotmail.com

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – timm@ufpel.tche.br

### 1. INTRODUÇÃO

Os pescados são considerados a proteína animal mais saudável e consumida no mundo, já que possuem elevada digestibilidade, alto valor biológico e elevado teor de ácidos graxos poli-insaturados (ORDÓÑEZ, 2005). O pescado é um alimento altamente perecível, possui pH próximo à neutralidade, elevada atividade de água e alto teor de nutrientes facilmente utilizáveis por micro-organismos. Devido a estes fatores, o pescado torna-se suscetível à contaminação por diferentes micro-organismos, dentre os quais algumas espécies do gênero *Vibrio*.

*Vibrio parahaemolyticus* são encontrados naturalmente em ambientes marinhos ou estuarinos, podendo estar livres ou ligados a sedimentos (AUSTIN, 2009). É um patógeno que pode causar gastroenterite aguda pelo consumo de frutos do mar contaminados, crus ou mal cozidos, e pode também provocar infecções em feridas abertas que tenham sido expostas à água do mar. As principais práticas que estão ligadas aos surtos causados por esse micro-organismo são: refrigeração inadequada, cozimento insuficiente, contaminação cruzada ou recontaminação (KAYSNER; DEPAOLA, 2004). KARUNASAGAR; OTTA (1996) citaram que *Vibrio* pode formar biofilmes em diferentes superfícies, sendo biofilme bacteriano uma comunidade de micro-organismos sésseis que são capazes de se agregar e aderir em uma superfície, embebidos em uma matriz extracelular formada por exopolissacarídeos (DONLAN; COSTERTON, 2002). CASTRO-ROSAS; ESCARTÍN (2002) lavantaram a possibilidade das células de *Vibrio* se tornarem resistentes a fatores ecológicos, tais como altas ou baixas temperaturas ou pH baixo. Isso pode ter importantes consequências, como aumento da capacidade de formar biofilme, dificultando a eliminação da bactéria durante a preparação dos pescados para o consumo. Este estudo teve como objetivo verificar os efeitos de diferentes tipos de estresse na formação de biofilme em placas de microtitulação.

### 2. METODOLOGIA

Foram estudadas 19 cepas de *V. parahaemolyticus*, onze previamente isoladas de *Mugil platanus*, quatro por ROSA (2016), duas por ROSA et al. (2016) e cinco por MILAN et al. (2015), uma isolada de *Micropogonias furnieri* por ROSA et al. (2016), seis isoladas de *Farfantepenaeus paulensis* por MILAN et al. (2015) e ainda uma de *Paralichthys orbignyanus* também isolada por MILAN et al. (2015). Todos os pescados foram obtidos no estuário da Lagoa dos Patos.

A capacidade de produção de biofilme após as cepas serem submetidas a estresse subletal foi testada. Para exposição das células ao choque de calor, culturas *overnight* em Água Peptonada Alcalina com 3% de NaCl (APA-3% NaCl,

Himedia, Mumbai, Índia) foram mantidas em banho-maria a 42°C por 45min, segundo CHANG et al. (2004). Para exposição ao choque de frio, culturas *overnight* em APA-3% NaCl foram mantidas a 20°C durante 4h, de acordo com LIN et al. (2004). As células também foram estressadas a 4°C durante 4h. Os procedimentos descritos por WONG et al. (1998) foram utilizados para estressar as células bacterianas em ambiente ácido. Culturas *overnight* em APA-3% NaCl tiveram o pH ajustado para 5,0 com HCl 6N e foram incubadas a 37°C durante 30min. Após a indução ao estresse subletal, as cepas foram avaliadas quanto à capacidade de produção de biofilme em placas de microtitulação (Nunc, 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 APA em cada poço da placa de microtitulação adicionados de 2 µL de culturas padronizadas em espectrofotômetro a 600 nm para valor 0,7 de densidade ótica (DO) e previamente estressadas. Poços com 200 µL de caldo APA, sem cultura bacteriana, foram utilizados como controle e também poços de caldo APA com cada cultura bacteriana sem terem sido submetidas aos estresses. Então, a tampa foi colocada sobre a placa e incubada durante 48h 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 30min 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 30min. O corante que permaneceu ligado ao biofilme foi extraído com ácido acético glacial 30% (200 µL). A DO<sub>570</sub> de cada poço foi medida utilizando espectrofotômetro. 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.

$DO \leq DOc$  = não formadora

$DOc < DO \leq 2 \times DOc$  = fraca formadora

$2 \times DOc < DO \leq 4 \times DOc$  = moderada formadora

$4 \times DOc < DO$  = forte formadora

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A maioria das cepas de *V. parahaemolyticus* (59,2%) manteve a capacidade de formar biofilme inalterada após ser estressada (Figura 1). Entretanto, 25% das cepas aumentaram essa capacidade. As cepas que mais aumentaram sua capacidade de formar biofilme foram as que eram consideradas moderadas formadoras e passaram a fortes formadoras, mas também foram as moderadas formadoras de biofilme que mais reduziram sua capacidade, passando a fracas formadoras. Nenhuma cepa classificada como fraca formadora passou a ser forte formadora após a exposição ao estresse, nem o inverso aconteceu, indicando que o estresse subletal não é capaz de modificar de forma drástica a capacidade de *V. parahaemolyticus* formar biofilme, embora as duas cepas que eram não formadoras de biofilme tenham se tornado fracas formadoras após passarem pelo estresse térmico a 20°C. Os resultados mostraram que cada cepa apresenta um comportamento distinto quando submetida a diferentes formas de estresse. O

estresse subletal, ao induzir o aumento na capacidade de formar biofilme por algumas cepas do micro-organismo, poderia levar à seleção dessas cepas por serem mais dificilmente eliminadas das superfícies em que se encontram, agravando o problema de sanitização dos equipamentos industriais.

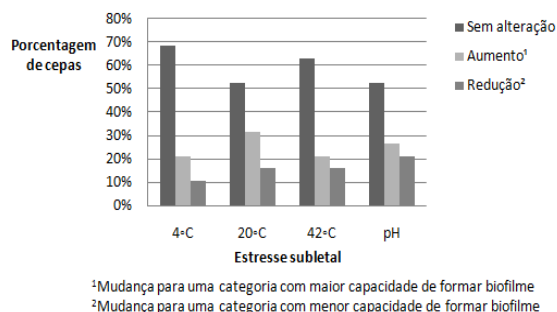


Figura 1: Alterações na capacidade de formação de biofilme por *V. parahaemolyticus* isolados de pescados após as cepas serem submetidas a diferentes tipos de estresse subletal.

Este é o primeiro estudo realizado com *V. parahaemolyticus*, para avaliar o efeito de fatores de estresse sobre a formação de biofilme, entretanto outros trabalhos têm sido realizados para avaliar a consequência sobre outras características ou utilizando outros micro-organismos. LIN et al. (2013) expuseram células de *V. parahaemolyticus* a várias tensões subletais como frio a 20°C, calor a 42°C e pH ácido para depois analisar sua resistência a sanitizantes e verificaram que essas tensões subletais aumentaram a resistência de *V. parahaemolyticus* aos produtos utilizados. CHANG et al. (2004) relataram que a extensão da resposta de *V. parahaemolyticus* ao choque por calor variou de acordo com a cepa e a duração do tratamento, como também observamos em nosso estudo. Como os pescados passam por diferentes temperaturas, tanto no seu habitat, como durante o processamento e também na residência do consumidor, essas variações podem funcionar como fatores de estresses e, dessa forma, afetar a capacidade de formação de biofilme por *V. parahaemolyticus*.

Segundo MANCILLA (2005), *V. parahaemolyticus* morre a temperaturas menores que 5°C, mas em nosso trabalho o micro-organismo não só sobreviveu à temperatura de 4°C, como também manteve a capacidade de formar biofilme, sendo que 21% das cepas testadas ainda aumentaram essa capacidade.

#### 4. CONCLUSÕES

Diferentes cepas de *V. parahaemolyticus* apresentam comportamento distinto sob condições de estresse. A exposição a estresses subletais (calor a 42°C, frio a 4°C e a 20°C e pH ácido) aumenta a capacidade de formar biofilme de algumas cepas.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUSTIN B. *Vibrios* as causal agents of zoonoses. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.140, p.310-317, 2009.
- CASTRO-ROSAS, J., ESCARTÍN, E.F. Adhesion and colonization of *V. cholerae* O1 on shrimp and crab carapace. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.65, p.492-498, 2002.

- CHANG, C.M.; CHIANG, M.L.; CHOU, C.C. Responses of heat-shocked *Vibrio parahaemolyticus* to subsequent physical and chemical stresses. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.67, p.2183-2188, 2004.
- DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.M. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Review**, Washington DC, v.15, p.167-193, 2002.
- 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.
- KARUNASAGAR, I.; OTTA, S.K.; KARUNASAGAR, I. Biofilm formation by *Vibrio harveyi* on surfaces. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 140, p. 241-245, 1996.
- KAYSNER, C.A.; DEPAOLA Jr. **Vibrio**. U.S. Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual (BAM), 2004. Acessado em: 20 de jun. 2016. Online. Disponível em:  
<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm070830.htm>
- LIMA, C.P. de. **Avaliação da atividade do ácido gálico sobre a formação de biofilme por *Candida albicans***. 2014. 52f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação)- Universidade Estadual de Goiás, Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas, Goiás.
- LIN, C.; YU, R.C.; CHOU, C.C. Susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* to various environmental stresses after cold shock treatment. **International Journal of Food Microbiology**, Washington DC, v.92, p.207-215, 2004.
- LIN, M.H.; TSAI, T.Y.; HSIEH, S.C.; YU, R.C.; CHOU, C.C. Susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* to disinfectants after prior exposure to sublethal stress. **Food Microbiology**, Washington DC, v.34, p.202-206, 2013.
- MANCILLA, E.P. Intoxicación por *Vibrio parahaemolyticus*. **Cuadernos médico sociales**, Santiago, v. 45, p. 43-47, 2005.
- 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, v.74, n.2, p.149-153, 2015.
- ORDÓÑEZ, J.A. Características gerais do pescado. In: ORDÓÑEZ, J.A. (Org.) **Tecnologia de alimentos de origem animal**. São Paulo: Artmed, 2005. p. 219-229.
- ROSA, J.V. ; SILVA, C.J.; BARBOSA, F.; BAIRROS, J.; DUVAL, E.H.; HELBIG, E.; TIMM, C.D. *Vibrio parahaemolyticus* and *Salmonella enterica* isolated from fishes aptured from the Lagoa dos Patos estuary. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.37, n.3, p.1345-1354, 2016.
- ROSA, J.V. **Formação de biofilme por *Vibrio parahaemolyticus* isolados de pescados**. 2016. 39f. Qualificação (Doutorado em Ciências Veterinárias)- Programa 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.
- WONG, H.C.; PENG, P.Y.; HAN, J.M.; CHANG, C.Y.; LAN, S.L. Effect of mild acid treatment on the survival, enteropathogenicity, and protein production in *Vibrio parahaemolyticus*. **Infection and Immunity**, Washington DC, v. 66, n. 7, p. 3066-3071, 1998.