

## FORMAÇÃO DE BIOFILME POR *Vibrio parahaemolyticus* EM DIFERENTES SUPERFÍCIES E RESISTÊNCIA A SANITIZANTES

JANAINA VIANA DA ROSA<sup>1</sup>; NATÁLIA VOLPATO<sup>2</sup>; RITA DE CÁSSIA DOS SANTOS DA CONCEIÇÃO<sup>3</sup>; CLÁUDIO DIAS TIMM<sup>4</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 – ritinhaconceicao@hotmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – timm@ufpel.tche.br

### 1. INTRODUÇÃO

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* é um micro-organismo abundante em ambientes aquáticos, considerado como a principal causa de gastroenterite em humanos associada ao consumo de frutos do mar contaminados (LETCHUMANAN; CHAN; LEE, 2014). 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).

Na indústria alimentícia, os biofilmes são associados à contaminação de instalações e equipamentos (GÁMEZ et al., 2004). Conforme as características dos micro-organismos, os biofilmes podem ser produzidos sobre uma variedade de substratos, como aço inoxidável, vidro, borracha, entre outros (PARIZZI et al., 2004). A lavagem e sanitização podem não garantir a eliminação completa dos biofilmes, já que muitas das superfícies em contato com o alimento, como as tubulações e equipamentos, apresentam cantos, sulcos, rachaduras, onde os biofilmes facilmente se desenvolvem (NITSCHKE, 2006). Estes micro-organismos em biofilmes podem permanecer aderidos e viáveis por longos períodos mesmo após a higienização, acarretando prejuízo financeiro à indústria e constituindo fonte de contaminação para os alimentos e, consequentemente, representando riscos à saúde do consumidor (FLACH et al., 2005). Este estudo teve como objetivo verificar a formação de biofilme em diferentes superfícies e o efeito do biofilme sobre a resistência a sanitizantes.

### 2. METODOLOGIA

Oito cepas previamente isoladas, sendo uma de *Micropogonias furnieri* (corvina), quatro de *Mugil platanus* (tainha) e três de *Farfantepenaeus paulensis* (camarão-rosa), por ROSA et al. (2017) e consideradas formadoras de biofilme foram testadas quanto à capacidade de formarem biofilme em diferentes superfícies, conforme técnica utilizada por MILAN et al. (2015). Foram utilizados cupons de

plástico (polietileno de alta densidade), aço inoxidável e vidro estéreis com superfícies planas de 4 cm<sup>2</sup>. Também foram utilizados cupons de 1 cm<sup>2</sup> de exoesqueletos de *F. paulensis* e opérculos de *M. furnieri*, preparados de acordo com o método aplicado por CASTRO-ROSAS; ESCARTÍN (2002). Os opérculos e exoesqueletos foram removidos manualmente, lavados durante 30 s e agitados para remover qualquer líquido remanescente e tecidos moles. Os cupons foram armazenados a -20°C até a sua utilização. Todas as diferentes superfícies foram colocadas dentro de placas de Petri, contendo 100 mL de Água Peptonada Alcalina com 1% de NaCl (APA - 1% NaCl, Himedia, Mumbai, Índia) e 2 mL de cultura *overnight* de cada isolado. A cada 48 horas de incubação, as placas foram lavadas suavemente duas vezes com APA - 1% NaCl para remoção de células não aderidas e novamente inseridas em placas de Petri com 100 mL de APA - 1% NaCl, porém sem o inóculo. Após cinco repetições do procedimento, foram passadas zaragatoas estéreis sobre toda a superfície de cada cupom e transferidas para tubos de ensaio contendo 10 mL de APA - 1% NaCl. A partir desta, foram feitas diluições seriadas para contagem dos micro-organismos em Ágar Padrão para Contagem (PCA - 2% NaCl, Acumedia, Lansing, Michigan, USA). Uma cepa não formadora de biofilme foi utilizada como controle negativo.

A eficiência dos sanitizantes hipoclorito de sódio (solução contendo 20 ppm de Cl<sub>2</sub>) e iodofor (solução com 50 ppm de I<sub>2</sub>) foi avaliada frente às bactérias nos biofilmes formados sobre a superfície dos diferentes materiais utilizados. O mesmo processo descrito anteriormente foi repetido com os isolados que formaram biofilme e os materiais em que houve formação de biofilme. Após a última lavagem, os cupons com biofilme foram imersos em frascos contendo sanitizantes, onde permaneceram durante 10 minutos. Alcançado o tempo de contato estabelecido, os cupons foram imersos em solução neutralizante (0,1 M Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) por 30 segundos. Após lavagem com APA, foi passada uma zaragatoa estéril na superfície de cada cupom e realizada contagem em PCA - 2% NaCl. Como controles, biofilmes formados pelos mesmos isolados, porém sem entrar em contato com os sanitizantes, foram objeto de contagens em PCA - 2% NaCl.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata. A análise de variância das contagens de *V. parahaemolyticus* foi realizada e os resultados foram avaliados pelo teste de Tukey usando o Statistix® (2003).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das oito cepas analisadas, cinco foram consideradas formadoras de biofilme em diferentes superfícies (Tabela 1).

Tabela 1. Formação de biofilme por *V. parahaemolyticus* em diferentes superfícies.

Cepa	Vidro	Plástico	Aço inoxidável	Opérculo	Carapaça
A	-	-	+	-	-
B	-	+	-	-	-
C	-	+	-	+	-
D	-	-	-	-	-
E	-	-	-	-	-
F	+	-	-	-	-
G	-	-	-	+	-
H	-	-	-	-	-

(-) Sem formação de biofilme; (+) com formação de biofilme.

Os resultados mostraram uma variação entre as superfícies, sendo que mais de uma cepa formou biofilme na superfície do opérculo de *M. furnieri* e do plástico. As superfícies plásticas, com o tempo, podem tornar-se ásperas e ainda com o uso pode haver formação de fendas que por sua vez abrigam resíduos que podem proteger as bactérias e favorecer a formação de biofilmes (SHI; ZHU, 2009), o que ressalta a importância dos nossos resultados encontrados nesta superfície. Em trabalho publicado por HAN et al. (2016), foram testadas diferentes cepas de *V. parahaemolyticus* na formação de biofilme em carapaças de camarão e caranguejo, sendo que as cepas foram capazes de formar biofilme nestas superfícies, o que difere de nosso trabalho, pois nenhuma das cepas testadas formou biofilme nas carapaças de camarão. No nosso estudo, observou-se que *V. parahaemolyticus* é capaz de formar biofilme em opérculos, o que pode dificultar a eliminação do micro-organismo da superfície do peixe, tornando-o potencial fonte de contaminação para outros pescados, utensílios e equipamentos, tanto na embarcação quanto na indústria. ABDALLAH et al. (2009) e HAN et al. (2016) observaram que cepas de *V. parahaemolyticus* podem formar biofilme em vidro e aço inoxidável, respectivamente, o que também foi demonstrado nos nossos resultados com algumas cepas nas duas superfícies. Observou-se que cada cepa apresenta um comportamento distinto quanto à formação de biofilme em diferentes superfícies.

*V. parahaemolyticus* pode formar biofilme em diferentes superfícies, inclusive no próprio pescado, os cuidados com higiene tanto em indústrias de pescado como na residência do consumidor devem ser sempre imprescindíveis.

Para avaliar a eficiência dos sanitizantes, as superfícies nas quais as cepas formaram biofilme foram imersas em frascos contendo hipoclorito de sódio e iodo. Os sanitizantes reduziram a formação do biofilme em todas as superfícies. As cepas sem contato com sanitizantes tiveram contagem média de  $1,6 \cdot 10^6$  UFC/mL, já com sanitizantes a contagem média foi de  $6,8 \cdot 10^3$  UFC/mL. Ambos sanitizantes agiram de forma semelhante nas cepas de *V. parahaemolyticus*. A única contagem bacteriana que apresentou diferença entre o uso de hipoclorito de sódio e iodo foi no biofilme formado sobre o plástico, com  $6,4 \cdot 10^3$  e  $5,9 \cdot 10^2$  UFC/mL, respectivamente.

#### 4. CONCLUSÕES

*V. parahaemolyticus* é capaz de formar biofilme em superfícies de vidro, plástico, aço inoxidável e opérculo de *M. furnieri*, sendo que as cepas de *V. parahaemolyticus* apresentam distinta capacidade de formar biofilme em diferentes superfícies.

Os sanitizantes hipoclorito de sódio e iodo embora não tenham eliminado as bactérias que estavam no biofilme, reduziram a sua população.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLAH, F.B.; CHAIEB, K.; ZMANTAR, T.; KALLEL, H.; BAKHROUF, A. Adherence assays and Slime production of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus*. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.40, n.2, p.394-398, 2009.
- CASTRO-ROSAS, J.; ESCARTÍN, E.F. Adhesion and Colonization of *Vibrio cholerae* O1 on Shrimp and Crab Carapaces. **Journal of Food Protection**, v.65, n.3, p.492–498, 2002.
- DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.M. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Review**, v.15, p.167-193, 2002.

- FLACH, J.; KARNOPP, C.; CORÇÃO, G. Biofilmes formados em matéria- prima em contato com leite: fatores de virulência envolvidos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, n.3, p.291-296, 2005.
- GÁMEZ, C.I.; GALAVÍZ, J.R.G.; SILVA, L.G.; GARZA, Z.J.M. e VELARDE, M.S.T. Deteccion y prevalencia de *Vibrio* spp em cultivo de camarón *Litopenaeus vannamei* en Sonora durante o ciclo 2003. **Revista Salud Pública y Nutrición**, n. 6, 2004. Disponível em: <[http://www.respyn.uanl.mx/especiales/ee-6-2004/resumenes\\_juany/70.htm](http://www.respyn.uanl.mx/especiales/ee-6-2004/resumenes_juany/70.htm)>. Acesso em: 14 de setembro 2017.
- HAN, N.; MIZAN, M.F.R.; JAHID, I.K.; HA, S.D. Biofilm formation by *Vibrio parahaemolyticus* on food and food contact surfaces increases with rise in temperature. **Food Control**, v.70, p.161-166, 2016.
- KARUNASAGAR, I.; OTTA, S.K.; KARUNASAGAR, I. Biofilm formation by *Vibrio harveyi* on surfaces. **Aquaculture**, 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: 14 set. 2017. Online. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm070830.htm>
- LETCHUMANAN, V.; CHAN, K.G.; LEE, L.H. *Vibrio parahaemolyticus*: A review on the pathogenesis, prevalence, and advance molecular identification techniques. **Frontiers in Microbiology**, v.5, n. 705, p. 1 – 13, 2014.
- 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**. v.67, n.2, p. 642-646, 2015.
- NITSCHKE, M. Biotensoativos como agentes inibidores da adesão de patógenos em superfícies de materiais utilizados na indústria de alimentos. **Embrapa Agroindústria de Alimentos**. Rio de Janeiro. 2006.
- PARIZZI, S.Q.F.; ANDRADE, N.J.; SILVA, C.A.S.; SOARES, N.F.F.; SILVA, E.A.M. Bacterial adherence to different inert surfaces evaluated by epifluorescence microscopy and plate count method. **Brazilian Archives of Biology Technology**. v.47, n.1, p.77-83, 2004.
- ROSA, J.V.; KÄEFER, K.; CONCEIÇÃO, N.V.; CONCEIÇÃO, R.C.; TIMM, C.D. Formação de biofilme por *Vibrio parahaemolyticus* isolados de pescados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.37, n.4, p.339-345, 2017.
- SHI, X.; ZHU, X. Biofilm formation and food safety in food industries. **Trends in Food Science & Technology**. v.20, n.9, p.407-413, 2009.