

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

JANAINA VIANA DA ROSA¹; NATÁLIA VOLPATO²; RITA DE CÁSSIA DOS SANTOS DA CONCEIÇÃO³; CLÁUDIO DIAS TIMM⁴

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

²*Universidade Federal de Pelotas–natalia.volpato@hotmail.com*

³*Universidade Federal de Pelotas – ritinhaconceicao@hotmail.com*

⁴*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 (LETCHEUMANAN; 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 agrregar 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 cm². Também foram utilizados cupons de 1 cm² 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 Cl₂) e iodoform (solução com 50 ppm de I₂) 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 Na₂S₂O₃) por 30 segundos. Após lavagem com APA, foi passada uma zaragataa 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.; KARNOOPP, 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. Detección 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>. 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 differentinert 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.