

## Formação de biofilme por *Vibrio vulnificus* sob condições de diferentes tipos de estresse

KAUANA KAEFER<sup>1</sup>; DÉBORA SILVEIRA RODRIGUES<sup>2</sup>; CLÁUDIO DIAS TIMM<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [kauanakaef@gmail.com](mailto:kauanakaef@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [debora.rsilveira@hotmail.com](mailto:debora.rsilveira@hotmail.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – [timmm@ufpel.com.br](mailto:timmm@ufpel.com.br)

### 1. INTRODUÇÃO

Biofilmes são caracterizados como comunidades constituídas por células sésseis, mono ou multiespécies, capazes de se aderir a um substrato, embebidas em uma matriz de polímeros extracelulares (exopolissacarídeos). A associação dos organismos em biofilmes constitui uma forma de proteção ao seu desenvolvimento, permitindo a sobrevivência em ambientes hostis (DONLAN & COSTERTON, 2002).

Do ponto de vista da segurança alimentar e da degradação de alimentos, os biofilmes são importantes devido à sua formação em alimentos, utensílios e superfícies e à dificuldade encontrada em sua remoção. Uma vez formados em materiais da linha de produção da indústria de alimentos, principalmente devido à falha de higienização, podem acarretar risco à saúde do consumidor e prejuízo financeiro à indústria (FLACH et al., 2005).

*Vibrio* é um gênero de bactérias caracterizadas como bacilos Gram-negativos que naturalmente vivem em águas costeiras e estão presentes em maiores concentrações quando as temperaturas da água são mais quentes. Possui 38 espécies, sendo 10 consideradas patogênicas ao homem. As espécies *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* e *V. cholerae* são as mais relevantes em alimentos (CDC, 2016; FRANCO & LANDGRAF, 2005).

*V. vulnificus* é um dos patógenos humanos que apresenta maior poder de invasão e mortalidade. Pode infectar o organismo humano através da via cutânea, por lesões presentes na epiderme ou através da via alimentar, pela ingestão de alimentos marinhos crus contaminados, sendo o reservatório primário desse microrganismo a água do mar (FRANCO & LANDGRAF, 2005).

Ainda existem poucas informações quanto à capacidade desse microrganismo formar biofilme e quanto às condições que poderiam favorecer essa formação. Assim, o objetivo desse estudo foi verificar a capacidade de formação de biofilme por cepas selvagens de *V. vulnificus* e verificar possíveis efeitos na formação de biofilme após estresses subletais.

### 2. METODOLOGIA

Foram utilizadas duas cepas de *V. vulnificus*, ambas isoladas de *Paralichthys orbignyanus* (linguado), por ROSA et al. (2016) e posteriormente confirmados por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com *primers* específicos para a identificação da espécie *V. vulnificus*. Para efeito deste estudo, os isolados foram identificados como V37 e V38. Foi verificada a formação de biofilme em placas de microtitulação, seguindo a técnica descrita por Janssens et al. (2008), com modificações, de forma a adaptar o método para *V. vulnificus*. Foram colocados 200 µL de Água Peptonada Alcalina (APA, Himedia, Mumbai, Índia) em cada poço da placa de microtitulação e adicionados 2 µL de culturas *overnight* em APA de cada

cepa padronizadas em espectrofotômetro a 600 nm para valor 0,5 de densidade ótica (DO). Poços com 200 µL de caldo APA, sem cultura bacteriana, foram utilizados como controle. A tampa com vilosidades correspondentes a cada poço foi colocada sobre a placa e ambas foram incubadas durante 48 h a 37 °C sem agitação. Para quantificação da formação de biofilmes foram utilizadas as tampas que foram lavadas em 200 µL de solução salina tamponada com fosfato (PBS, 0,1 M, pH 7,0). O material (biofilme) 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 para nova placa com ácido acético glacial 30% (200 µL). A DO 570 de cada poço foi medida e 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;  $DOc \leq DO \leq 2 \times DOc$  = fraca formadora;  $2 \times DOc \leq DO \leq 4 \times DOc$  = moderada formadora;  $4 \times DOc \leq DO$  = forte formadora.

Concomitantemente aos testes de avaliação da capacidade de produção de biofilme em placas de microtitulação, foram testadas culturas dos isolados após serem submetidos a estresses subletais. Para a preparação das células aos choques de calor e frio, culturas *overnight* em APA foram mantidas em banho-maria a 42 °C por 45 min e em 20 °C durante 4 h, de acordo com os métodos descritos por Chang et al. (2004) e Lin et al. (2004), respectivamente. As células também foram estressadas a 4 °C durante 4 h. Os procedimentos descritos por Wong et al. (1998) foram utilizados para estressar as células bacterianas em ambiente ácido. Culturas *overnight* em APA tiveram seu pH ajustado para 5,0 com HCl 6N e foram incubadas a 37 °C durante 30 min. Para a análise em diferentes concentrações salinas, no teste de formação de biofilme em microplacas, foi utilizada APA com concentrações de 0% e 5% de NaCl, que correspondem às concentrações extremas detectadas no estudo de Rosa et. al. (2017) realizado no estuário da Lagoa dos Patos. O experimento foi realizado em triplicata.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As duas cepas foram capazes de formar biofilme quando não submetidas a estresses subletais, sendo um isolado (V37) considerado fraco formador e o outro (V38) forte formador de biofilme. Não houve formação de biofilme pela cepa V37 quando submetida a condições de estresse. Já a cepa V38, quando submetida a uma temperatura de 4°C tornou-se fraca formadora de biofilme. O mesmo aconteceu quando essa cepa foi submetida à concentração de 0% de NaCl. Quanto às outras condições de estresse, também não foi observada formação de biofilme pela cepa V38.

Jefferson (2004) relata que a razão da formação do biofilme é a defesa, sendo uma resposta contra condições de estresse. Porém, nesse estudo foi observada maior formação de biofilme em condições ótimas de multiplicação.

Este é o primeiro estudo realizado com cepas selvagens de *V. vulnificus* para avaliar o efeito de fatores de estresse sobre a formação de biofilme. No entanto, um estudo semelhante realizado por Rosa et al. (2017) avaliou a formação de biofilme por *V. parahaemolyticus* submetido aos mesmos fatores de estresse aqui apresentados e foi observado que a maioria das cepas testadas manteve sua

capacidade de formar biofilme inalterada e apenas 25% das cepas aumentaram sua capacidade de formar biofilme, ao contrário do que foi encontrado no presente estudo em que a formação de biofilme foi reduzida ou anulada quando em estresse.

Estudos similares também foram realizados com diferentes microrganismos. Galvão et al. (2012) testaram a capacidade de formação de biofilme por *Listeria monocytogenes* em diferentes concentrações de inóculo, disponibilidade de nutrientes, concentração de NaCl, tempo de incubação e pH, e não encontraram relação entre fatores estressantes e aumento da adesão, assim como encontrado no presente estudo. Por outro lado, Lianou & Koutsoumanis (2012) avaliando *Salmonella enterica* isoladas de humanos e bovinos observaram maior formação de biofilme em condições de pH, temperatura e concentração de NaCl menos favoráveis ao desenvolvimento desse microrganismo. Esses resultados distintos demonstram que cada microrganismo apresenta suas particularidades frente a ambientes hostis, podendo formar ou não biofilme.

#### 4. CONCLUSÕES

As cepas testadas foram capazes de formar biofilme em condições favoráveis à multiplicação microbiana e a exposição a estresses subletais limitou ou inibiu essa capacidade.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CDC. **Vibrio Species Causing Vibriosis**. Atlanta, 13 de maio, 2016. Acessado em 16 de set. 2017. Online. Disponível em: <https://www.cdc.gov/vibrio/faq.html>

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**, v.67, n.10, p.2183-2188, 2004.

DA ROSA, J.V.; DA SILVA, C.J.; BARBOSA, F.; BAIRROS, J.; DUVAL, E.H.; HELBIG, E.; TIMM, C.D. *Vibrio parahaemolyticus* and *Salmonella enterica* isolates in fish species captured from the Lagoa dos Patos estuary. **Semina: Ciências Agrárias**, v.37, n.3, p.1345-1354, 2016.

DA ROSA, J.V.; KÄEFER, K.; DA CONCEIÇÃO, N.V.; DA 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.

DONLAN R.M.; COSTERTON J.M. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**. Washington, v. 15, n. 2, 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**. Porto Alegre, v. 33, n.3, p. 291-296, 2005.

FRANCO, B.D.G.M; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2005.



GALVÃO, N. N.; CHIARINI, E.; DESTRO, M. T.; AGUIAR FERREIRA, M. DE; NERO, L. A. PFGE characterisation and adhesion ability of *Listeria monocytogenes* isolates obtained from bovine carcasses and beef processing facilities. **Meat science**, v. 92, n. 4, p. 635–643, 2012.

JANSSENS, J.C.; STEENACKERS, H.; ROBIJNS, S.; GELLENS, E.; LEVIN, J.; ZHAO, H.; HERMANS, K.; COSTER, D.; VERHOEVEN, T.; MARCHAL, K.; VANDERLEYDEN, J.; VOS, D.; KEERSMAECKER, S. Brominated Furanones Inhibit Biofilm Formation by *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, n.21, p.6639–6648, 2008.

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

LIANOU, A.; KOUTSOUMANIS, K. P. Strain variability of the biofilm-forming ability of *Salmonella enterica* under various environmental conditions. **International journal of food microbiology**, v. 160, n. 2, p. 171–178, 2012.

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**, v.92, n.2, p.207-215, 2004.

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**, New York, v.40, n. 2, 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**, v.66, n.7, p.3066-3071, 1998.