

Formação de biofilme por *Vibrio parahaemolyticus* isolados de pescados¹

Janaina V. da Rosa^{2*}, Karoline Käefer², Natália V. da Conceição²,
Rita C.S. da Conceição² e Cláudio D. Timm²

ABSTRACT.- Rosa J.V., Käefer K., Conceição N.V., Conceição R.C.S. & Timm C.D. 2017. [Bio-film formation by *Vibrio parahaemolyticus* isolated from fish.] Formação de biofilme por *Vibrio parahaemolyticus* isolados de pescados. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 37(4):339-345. Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Departamento de Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão, prédio 34, Pelotas, RS 96010-900, Brazil. E-mail: janavrosa@yahoo.com.br

Fish is a highly perishable food, has a neutral pH, high water activity and high content nutrient, which makes it favorable to the microorganisms multiplication. *Vibrio parahaemolyticus* may be found in environments with a salinity of 3% and 8% and has optimal pH for multiplication between 7.8 and 8.6. This pathogen can cause acute gastroenteritis by consumption of contaminated raw or undercooked seafood. There is difficulty in reducing *Vibrio* contamination during fish processing, being supposed that this bacterial genus can form biofilm on different surfaces. The aim of this study was to verify the ability of *V. parahaemolyticus* isolated from fish from biofilm after sublethal stress. In the course of one year, 12 monthly samples of fish caught in the Lagoa dos Patos Estuary were analyzed for the presence of *V. parahaemolyticus*. Concurrently, water samples from estuary were collected aseptically for salinity analysis and pH. *Vibrio* isolates were analyzed by polymerase chain reaction (PCR) to identification of the species by presence of the *toxR* gene. In addition to the isolates obtained in this study were also studied 15 other strains of *V. parahaemolyticus* previously isolated in other works. The strains were evaluated for biofilm production capacity in microtiter plates. The biofilm production capacity after the strains had being subjected to different types of sublethal stress (42°C, 20°C, 4°C and acid pH) was also tested. Among the 120 analyzed fish, *V. parahaemolyticus* were isolated from four (3.33%) fishes, and *Mugil platanus* was the only species in which the microorganism was found. Among the 19 strains analyzed, 89.5% were able to form biofilm, which seems to indicate that this ability has an important role in the microorganism survival in the fish. Among these strains, 25% increased the ability to form biofilm after sublethal exposure. Based on the results, we concluded that fish of the species *M. platanus* of the Lagoa dos Patos Estuary are hosts of *V. parahaemolyticus* and that almost all of these strains are forming biofilm. Exposure to sublethal stress conditions has distinct effect on different strains, inducing an increase in the ability to form biofilm in some. This was the first study about the effects of stress on the *V. parahaemolyticus* biofilms formation.

INDEX TERMS: Biofilm, *Vibrio parahaemolyticus*, fish, *Mugil platanus*, sublethal stress.

RESUMO.- O pescado é um alimento altamente perecível, possui pH próximo a neutralidade, elevada atividade de água e alto teor de nutrientes facilmente utilizáveis por

micro-organismos. *Vibrio parahaemolyticus* pode ser encontrado em ambientes com salinidade entre 3% e 8% e tem pH ideal para multiplicação entre 7,8 e 8,6. É um patógeno que pode causar gastroenterite aguda pelo consumo de frutos do mar contaminados, crus ou mal cozidos. Mesmo os processos de tratamento de água como cloração, adição de antibióticos e filtros apresentam dificuldade em reduzir a contaminação por *Vibrio*, sendo suposto que este gênero bacteriano pode formar biofilmes em diferentes superfícies. O objetivo do trabalho foi verificar a capacidade

¹Recebido em 21 de setembro de 2016.

Aceito para publicação em 13 de abril de 2017.

²Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Departamento de Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Campus Capão do Leão, prédio 34, Pelotas, RS 96010-900, Brasil. E-mails: kaeferkarol@gmail.com, natalia-volpato@hotmail.com, claudiotimm@hotmail.com, *Autor para correspondência: janavrosa@yahoo.com.br

de de *V. parahaemolyticus* isolados de pescados formarem biofilme após estresse subletal. No decorrer de um ano, foram realizadas 12 coletas mensais de amostras de peixes capturados no estuário da Lagoa dos Patos, as quais foram analisadas quanto à presença de *V. parahaemolyticus*. Concomitantemente, foram coletadas assepticamente amostras de água do estuário para análise de sanidade e pH. Os isolados de *Vibrio* foram analisados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) para identificação da espécie pela presença dos genes *toxR*. Além dos isolados obtidos no presente trabalho, também foram estudadas 15 outras cepas de *V. parahaemolyticus* previamente isoladas em outros trabalhos. As cepas foram avaliadas quanto à capacidade de produção de biofilme em placas de microtitulação. A capacidade de produção de biofilme após as cepas serem submetidas a diferentes tipos de estresse subletal (42°C, 20°C, 4°C e pH ácido) também foi testada. Dentre os 120 peixes analisados, foram isolados *V. parahaemolyticus* de quatro (3,33%) pescados, sendo *Mugil platanus* a única espécie de peixe na qual o micro-organismo foi encontrado. Das 19 cepas analisadas, 89,5% foram capazes de formar biofilme, o que parece indicar que essa capacidade tem um papel importante na sobrevivência do micro-organismo nos pescados. Dessas, 25% das cepas aumentaram a capacidade de formar biofilme. Com base nos resultados, conclui-se que peixes da espécie *M. platanus* do estuário da Lagoa dos Patos são hospedeiros de *V. parahaemolyticus* e que a quase totalidade das cepas são formadoras de biofilme. A exposição a condições subletais de estresse tem efeito distinto sobre as diferentes cepas, induzindo aumento na capacidade de formar biofilme em algumas. Este foi o primeiro estudo realizado com *V. parahaemolyticus*, para avaliar o efeito de fatores de estresse sobre a formação de biofilme.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Biofilme, *Vibrio parahaemolyticus*, pescados, *Mugil platanus*, estresse subletal, peixe.

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), proporcionando mais de 20% da proteína animal na dieta em países que possuem população com baixa renda e *deficits* alimentares (FAO 2015). Segundo pesquisa da Organização Mundial de Saúde (OMS), os brasileiros ultrapassaram o consumo mínimo de pescado recomendado pela OMS, que é de 12 kg/habitante/ano. Em 2013, o consumo chegou a 14,5 kg/habitante/ano, sendo que entre 2003 e 2013, o consumo nacional de pescado aumentou mais de 100% (MAPA 2014). Segundo a Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO 2014), será necessário um aumento na produção de pescados para satisfazer as crescentes necessidades mundiais.

O pescado é um alimento altamente perecível, possui pH próximo a neutralidade, elevada atividade de água e alto teor de nutrientes facilmente utilizáveis por micro-organismos. Entre os processos de captura e processamento,

o pescado já está sujeito à deterioração e contaminação devido às condições de armazenamento e à sua composição natural (Gaspar 1997). Segundo Jay (2005), a microbiota do pescado é decorrente da microbiota da água onde vivem, o que se reflete na qualidade microbiológica do produto final. Devido a estes fatores, o pescado torna-se suscetível à contaminação por diferentes micro-organismos, dentre os quais algumas espécies do gênero *Vibrio*.

As bactérias do gênero *Vibrio* spp. são Gram-negativas, que possuem formato de bastonete e são móveis, contendo em sua maioria um único flagelo polar (Baumann & Schubert 1984). São encontrados naturalmente em ambientes marinhos ou estuarinos, podendo estar livres ou ligados a sedimentos (Austin 2009). São conhecidas cerca de uma dúzia de espécies capazes de causar doenças em seres humanos (Austin 2009). *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* são as espécies de *Vibrio* melhor documentadas como patógenos humanos (Sakazaki et al. 1963).

V. parahaemolyticus é mais facilmente encontrado em locais onde a temperatura da água não ultrapassa valores inferiores a 15°C (Su & Liu 2007). Essa espécie de micro-organismo é halofílica, podendo ser encontrada em ambientes com salinidade entre 3% e 8% (Kaysner & Depaola, 2004) e tem pH ideal para multiplicação entre 7,8 e 8,6 (Mancilla 2005). Segundo Kudo et al. (2013), as brânquias e vísceras são capazes de disseminar agentes patogênicos para a carne dos peixes. Nascimento et al. (2014) isolaram de peixes da espécie *Rachycentron canadum* uma maior quantidade de *V. parahaemolyticus* de fígado, quando comparado a outros órgãos, como rins e cérebro. 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. Um pequeno número de células de *V. parahaemolyticus* já pode causar doenças em animais e seres humanos (Su & Liu 2007). Em casos raros, a infecção por *V. parahaemolyticus* pode ser fatal (Morris & Black 1985). A expressão dos genes de virulência de *V. parahaemolyticus* é coordenada pelo gene *ToxR* (Lee et al. 1999). Este gene foi descoberto pela primeira vez como regulador da expressão dos genes que codificam para a síntese da toxina da cólera (DiRita 1992), mas posteriormente foi encontrado também em *V. parahaemolyticus*. O uso do gene *ToxR* para identificação de *V. parahaemolyticus* através da PCR é específico e rápido, sendo útil para a investigação da suspeita da presença de *V. parahaemolyticus* em espécimes clínicos e amostras de alimentos (Kim et al. 1999).

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 mesmo os processos de tratamento de água como cloração, adição de antimicrobianos e filtros apresentam dificuldade em reduzir a contaminação por *Vibrio*, sendo suposto que este gênero bacteriano pode formar biofilmes em diferentes superfícies. Biofilme bacteriano é uma comunidade de micro-organismos sésseis que são capazes de se agregar e aderir em uma superfície, em

bebidos em uma matriz extracelular formada por exopolissacarídeos (Donlan & Costerton 2002). Na indústria, a capacidade de formação de biofilme é preocupante, já que a lavagem e a sanitização podem não garantir a eliminação completa dos micro-organismos, pois muitas das superfícies em contato com o alimento, como plástico (polietileno de alta densidade), aço inoxidável e vidros, apresentam sulcos e podem ter rachaduras, onde os biofilmes facilmente são formados (Nitschke 2006). Castro-Rosas & Escartín (2002) levantaram 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.

Para garantir a qualidade dos pescados é necessário o correto manuseio durante captura, processamento, armazenamento, transporte e comercialização. Segundo Baldissotto (2009), não há estudos sobre a qualidade do pescado continental vendido ao consumidor no Rio Grande do Sul. Também faltam estudos que permitam conhecer a ocorrência de agentes etiológicos de DTA (doenças transmitidas por alimentos) em pescados da região, em especial do estuário da Lagoa dos Patos, o que constitui a base indispensável para traçar planos efetivos de controle da sua transmissão para os consumidores. As exceções são os trabalhos de Milan et al. (2015) e Rosa et al. (2016), que, analisando pescados capturados no estuário da Lagoa dos Patos, registraram o isolamento de *V. parahaemolyticus* de *Farfantepenaeus paulensis* (camarão-rosa), *Paralichthys orbignyanus* (linguado), *Mugil platanus* (tainha) e *Micropogonias furnieri* (corvina). O estuário da Lagoa dos Patos, no extremo sul do Brasil, ocupa uma área de 963,8 km² (10% da área total desta laguna), recebendo água dos rios localizados na sua porção norte e da Lagoa Mirim, ao sul, através do Canal São Gonçalo (Calliari 1998). O estuário representa uma importante área de criação para várias espécies de peixes e crustáceos de valor comercial, configurando-se como um polo pesqueiro artesanal de importância destacada no abastecimento de pescados no sul do Brasil (Reis 1999).

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das amostras. Foram realizadas 12 coletas durante um ano, uma por mês, de amostras aleatórias de peixes capturados no estuário da Lagoa dos Patos. As coletas, 10 unidades de peixes de cada vez, foram realizadas logo após o desembarque dos pescados, os quais foram acondicionados em sacos plásticos estéreis. Estes pescados permaneciam no máximo 12 horas nas embarcações e eram armazenados com gelo dentro das mesmas. Concomitantemente aos pescados, também foram coletadas assepticamente, amostras de 100mL água do estuário para análise de sanidade e pH, as quais foram obtidas de local afastado das margens, a uma profundidade de 10 a 15 cm abaixo da superfície e acondicionadas em frascos estéreis. As amostras foram imediatamente encaminhadas ao laboratório em caixas isotérmicas com gelo.

Análises da água. A análise de salinidade foi realizada com refratômetro específico, segundo Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (Apha 2005). A aferição do pH

foi feita através de fitas de pH-Fix 0-14 (Macherey-Nagel, Duren, Alemanha).

Temperatura. As médias mensais de temperatura ambiente nos locais de coleta referentes ao período em que o trabalho foi realizado foram obtidas dos dados disponibilizados pela Embrapa Clima Temperado (2016).

Obtenção dos isolados. A pesquisa de *Vibrio* spp. foi feita conforme recomendado por U. S. Food and Drug Administration - FDA (Kaysner & Depaola 2004), com modificações. As brânquias e os fígados dos peixes foram colocados em sacos plásticos estéreis contendo 225 mL de Água Peptonada Alcalina- 3% NaCl (APA, Himedia, Mumbai, Índia), homogeneizados por 5 minutos e incubados a 37°C por 24 horas. A partir do material dessas culturas foram feitas sementeiras por esgotamento em ágar Tiossulfato Citrato Bili Sacarose (TCBS, Himedia) e incubação a 37°C por 24 horas para obtenção de colônias isoladas. Até três colônias típicas de cada placa foram semeadas em APA- 3% NaCl e, após incubação a 37°C por 24 horas, misturadas com 20% de glicerol para manutenção de estoque a -70°C. Os isolados foram recuperados em APA- 3% NaCl a 37°C por 24 horas, quando necessário.

Extração de DNA. Os DNAs dos isolados foram extraídos conforme Sambrook & Russel (2001). O *pellet* obtido por centrifugação de 1 mL de cultura em APA- 3% NaCl foi ressuscitado em 100 µL de tampão STES [Tris-HCl 0,2 M, NaCl 0,5 M, SDS 0,1% (m/v), EDTA 0,01 M, pH 7,6], aos quais foram adicionados 50 µL de pérolas de vidro e 100 µL de fenol/clorofórmio. Após homogeneização por 1 min, a mistura foi centrifugada a 13.000 g por 5 min. O sobrenadante foi coletado e precipitado em 2 volumes de etanol absoluto e 0,1 volume de NaCl 5 M a -70°C por 30 min. Uma nova centrifugação foi realizada a 13.000g por 20 min, o sobrenadante descartado e o *pellet* lavado com etanol a 70%. Após eluição em 40µL de tampão de eluição (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 7,4), foi adicionado 1µL de RNase (10µg/µL). O DNA extraído foi estocado a -70°C.

Identificação de *Vibrio parahaemolyticus*. Os isolados de *Vibrio* foram analisados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) para pesquisa dos genes *toxR* (Quadro 1), para identificação de *V. parahaemolyticus* conforme Bilung et al. (2005), com modificações. Cada reação teve um volume final de 20µL. Foram utilizados 10µL de Master Mix, 1µL (10 pmol) de cada *primer*, 1,2µL de DNA e 6,8µL de água para completar o volume da reação. A amplificação foi realizada em termociclador TC-3000 com o seguinte programa: desnaturação inicial de 96°C por 5 min, seguido de 20 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento dos *primers* a 63°C por 1,5 min, extensão a 72°C por 1,5 min e extensão final a 72°C por 7 min. Os produtos da PCR foram corados com GelRed (Uniscience, São Paulo, Brasil) e a eletroforese foi realizada em gel de agarose a 1,8%. Como controle positivo, foi utilizada a cepa de *V. parahaemolyticus* ATCC 17802.

Verificação da formação de biofilme em placas. Foram estudados os isolados obtidos no presente trabalho e ainda 15 cepas de *V. parahaemolyticus*, três previamente isoladas por Rosa et al. (2016), duas de *M. platanus* e uma de *M. furnieri* e ainda doze isolados obtidos por Milan et al. (2015), seis de *F. paulensis*, um de *P. orbignyanus* e cinco de *M. platanus*, todas obtidas no estuário da

Quadro 1. Primers utilizados na identificação de *Vibrio parahaemolyticus* isolados de pescados (*Mugil platanus*, *Micropogonias furnieri* e *Paralichthys orbignyanus*) capturados no estuário da Lagoa dos Patos

Primer	Sequência (5' a 3')	Tamanho da (pb) amplificação	Referência
<i>ToxR</i> -a	GTCTTCTGACGCAATCGTTG	368	Kim et al. (1999)
<i>ToxR</i> -b	ATACGAGTGGTTGCTGTCATG		

Lagoa dos Patos. As cepas foram avaliadas quanto à 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 caldo APA- 3% NaCl em cada poço da placa de microtitulação adicionados de 2 µL de culturas *overnight* em APA- 3% NaCl de cada cepa padronizadas em espectrofotômetro a 600 nm para valor 0,5 de densidade ótica (DO). Poços com 200 µL de caldo APA- 3% NaCl, sem cultura bacteriana, foram utilizados como controle. Após, a tampa foi colocada sobre a placa, que foi 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 30 min com 200 µL de cristal violeta 0,1% (m/v), lavado em água destilada estéril (200µL) e a tampa foi seca em temperatura ambiente por 30 min. O biofilme com corante foi extraído com ácido acético glacial 30% (200µL). A DO_{570} 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. 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.

Formação de biofilme após estresse subletal. 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 APA- 3% NaCl foram mantidas em banho-maria a 42°C por 45 min, segundo Chang et al. (2004). Para exposição ao choque de frio, culturas *overnight* em APA- 3% NaCl foram mantidas a 20°C durante 4 h, 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 30 min.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Doze desembarques de pescados capturados no estuário da Lagoa dos Patos foram acompanhados e 120 peixes foram amostrados e analisados quanto à presença de *Vibrio parahaemolyticus*. As espécies capturadas e desembarcadas foram *Mugil furnieri* (corvina), *Mugil platanus* (tainha), ambas de desembarques realizados na colônia de pescadores Z-3, município de Pelotas e *Paralichthys orbignyanus* (linguado), obtido no mercado público de Rio Grande (Quadro 2). No Quadro 2, também são observados os resultados de aferição da temperatura, salinidade e pH relacionados a cada coleta.

Dentre os 120 peixes analisados, foram isolados *V. parahaemolyticus* de quatro (3,33%) pescados, sendo *Mugil platanus* a única espécie de peixe na qual o micro-organismo foi encontrado. *V. parahaemolyticus* já havia sido isolado de *M. platanus* capturados no estuário da Lagoa dos Patos por Milan et al. (2015) e por Rosa et al. (2016). Estes repetidos isolamentos são sugestivos de que *M. platanus* seja um hospedeiro regular de *V. parahaemolyticus* na região. *M. platanus* é um pescado que possui grande valor comercial, principalmente nas regiões sul e sudeste, e é uma espécie encontrada em abundância no estuário da Lagoa dos Patos (Silva 2003), sendo muito comercializada e consumida. No trabalho de Rosa et al. (2016), 13,3% (2/15) dos *M. platanus* recém-desembarcados analisados estavam contaminados por *V. parahaemolyticus*. Milan et al. (2015) encontraram percentual ainda mais elevado, 40% (4/10). No presente estudo, o micro-organismo estava presente em 8,9% (4/45) dos pescados dessa espécie. A ocorrência de *M. platanus* contaminados por *V. parahaemolyticus*

Quadro 2. Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* em pescados capturados no estuário da Lagoa dos Patos e temperatura do ambiente, pH e salinidade da água

Desembarque	Mês de coleta	Salinidade da água (‰)	Temperatura ambiente* (°C)	pH	Pescados analisados	Espécie do pescado	Pescados portadores de <i>V. parahaemolyticus</i>
1	Outubro	1	19,4	7	5	<i>M. furnieri</i>	0
					5	<i>M. platanus</i>	0
2	Novembro	0	18,9	7	5	<i>M. furnieri</i>	0
					5	<i>M. platanus</i>	0
3	Dezembro	0	22,1	7	5	<i>M. furnieri</i>	0
					5	<i>M. platanus</i>	0
4	Janeiro	1	23,9	7	5	<i>M. furnieri</i>	0
					5	<i>M. platanus</i>	0
5	Fevereiro	4	23,3	7	10	<i>P. orbignyanus</i>	0
					5	<i>M. furnieri</i>	0
6	Março	0	22,3	7	5	<i>M. platanus</i>	0
					5	<i>M. furnieri</i>	0
7	Abril	5	19,8	7	5	<i>M. furnieri</i>	0
					5	<i>M. platanus</i>	0
8	Maio	4	16,9	7	5	<i>M. furnieri</i>	0
					5	<i>M. platanus</i>	0
9	Junho	5	14,3	7	10	<i>P. orbignyanus</i>	0
					10	<i>M. platanus</i>	4
11	Agosto	2	18,1	7	10	<i>P. orbignyanus</i>	0
					10	<i>P. orbignyanus</i>	0
12	Setembro	5	16,5	7	10	<i>P. orbignyanus</i>	0

*Média mensal (Embrapa Clima Temperado, 2016).

em números tão significativos representa um perigo para a população e serve de alerta em relação à importância da inspeção e fiscalização durante a produção e comercialização dos pescados, no sentido de que medidas eficazes de controle microbiológico sejam aplicadas.

Segundo Su & Liu (2007), *V. parahaemolyticus* é encontrado principalmente em locais onde a temperatura da água não ultrapassa valores inferiores a 15°C. Outros estudos afirmam que nos meses frios a bactéria está presente principalmente no lodo e que ocorre livremente na água ou nos pescados durante os meses quentes do ano (Butt et al. 2004). Entretanto, nenhum mês em que *V. parahaemolyticus* foi isolado de *M. platanus* capturados no estuário da Lagoa dos Patos, julho de 2015, a temperatura média constatada na região foi de 13,9°C (Embrapa Clima Temperado, 2016), indicando que temperaturas relativamente baixas para o micro-organismo ser encontrado em pescados não constituíram impedimento para que isso ocorresse. O mês de julho foi o que apresentou temperaturas médias mensais mais baixas durante o período em que as coletas foram realizadas, portanto não foi possível fazer inferências sobre a ocorrência de *V. parahaemolyticus* em pescados em épocas ainda mais frias, mas essa possibilidade não pode ser descartada.

Segundo Kaysner & Depaola (2004), *V. parahaemolyticus* pode ser encontrado em ambientes com salinidade entre 3‰ e 8‰. No presente trabalho, o isolamento do micro-organismo realmente ocorreu em um mês no qual a salinidade estava dentro deste intervalo, em 4‰. Em estudo desenvolvido por Archer & Moretto (1994), foi analisada a presença de *V. parahaemolyticus* em mexilhões, aferindo temperatura e salinidade nos dias de coleta. Os autores isolaram o micro-organismo de 52,5% (21/40) das amostras obtidas de ambiente com 35,6‰ de salinidade e temperatura de 25,4°C. Estes valores mais elevados possivelmente favoreceram a ocorrência de *V. parahaemolyticus*, permitindo um maior número de isolamentos quando comparado ao nosso trabalho. Segundo ICMSF (1978), *V. parahaemolyticus* é encontrado com maior frequência em estuários, sedimentos, moluscos e crustáceos, portanto as espécies das quais Archer & Moretto (1994) obtiveram os isolamentos também pode ser um fator para as diferenças observadas.

O pH da água do estuário coletada no mesmo dia do desembarque dos pescados analisados foi 7 em todas as amostras. Esse pH não é considerado ideal para o desenvolvimento do *Vibrio*, o qual, segundo Mancilla (2005), deve estar entre 7,8 e 8,6. Entretanto, o pH da água não impediu a ocorrência de *V. parahaemolyticus* em *M. platanus*.

Conforme pode ser visto no Quadro 3, 89,5% (17/19) das cepas foram capazes de formar biofilme, o que parece indicar que essa capacidade tem um papel importante na sobrevivência ou na permanência do micro-organismo nos pescados.

Nossos resultados são semelhantes aos de Elexson et al. (2014), que também relataram a capacidade de *V. parahaemolyticus* formar biofilme. Esses autores analisaram 36 isolados de *V. parahaemolyticus* obtidos de *Anadara granulosa* (berbigão), *Mya arenaria* (marisco-branco), *Penaeus*

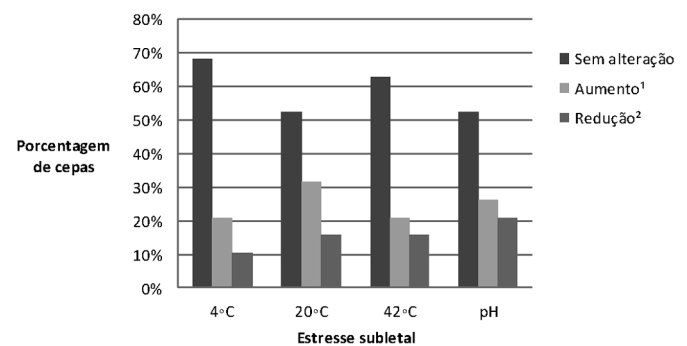
spp. (camarões) e *Loligo opalescens* (lula), e constataram que todos formavam biofilme, embora com diferentes intensidades, 33,33% para cada uma das classificações: fraca, moderada e forte formadora de biofilme.

A capacidade de formar biofilme apresentada pela maioria dos *V. parahaemolyticus* significa um problema potencial para as indústrias de processamento de pescados, uma vez que a eliminação do micro-organismo das superfícies de equipamentos e utensílios pode ser dificultada, aumentando o risco de que o patógeno permaneça nos alimentos. Segundo Flach et al. (2005), os 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. Segundo Urmersbach et al. (2015), bactérias em biofilme também podem se tornar mais resistentes a sanitização.

As cepas estudadas foram submetidas a diferentes tipos de estresse subletais, como frio (4° e 20°C), calor (42°C) e acidez (pH 5), e posteriormente avaliadas quanto à capacidade de formar biofilme. A maioria das cepas de *V. parahaemolyticus* (59,2%) manteve a capacidade de formar biofilme inalterada após ser estressada (Fig.1). Entretanto, 25% das cepas aumentaram essa capacidade. As cepas que mais aumentaram sua capacidade de formar biofilme foram as que eram 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 for-

Quadro 3. Classificação de *Vibrio parahaemolyticus* isolados de pescados quanto à capacidade de formar biofilme

Origem	Nº de isolados	Classificação			
		Forte formador	Moderado formador	Fraco formador	Não formador
<i>F. paulensis</i>	6	0	3	2	1
<i>M. furnieri</i>	1	0	1	0	0
<i>M. platanus</i>	11	1	3	6	1
<i>P. orbignyianus</i>	1	0	0	1	0
Total	19	1	7	9	2



¹Mudança para uma categoria com maior capacidade de formar biofilme

²Mudança para uma categoria com menor capacidade de formar biofilme

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

ma 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 indicam que cada cepa apresenta um comportamento distinto quando submetida a diferentes formas de estresse. Esta variação pode estar ligada à matriz extracelular que forma os biofilmes, cujos componentes são as próprias células bacterianas, exopolissacarídeos, proteínas, ácidos nucléicos, glicoproteínas, fosfolipídios, detritos e matéria inorgânica (Sutherland 2001). Esta matriz extracelular varia entre diferentes espécies bacterianas ou mesmo dentro da mesma espécie, de acordo com as diferentes condições ambientais. Ela protege as células, auxiliando na resistência a condições de estresse, como a diminuição e a exaustão de nutrientes e água, condições ambientais adversas (Caixeta 2008).

V. parahaemolyticus pode sofrer diferentes tipos de estresse subletais durante a permanência dos pescados na embarcação, no seu processamento ou mesmo na residência do consumidor. 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. Adicionalmente, segundo Lin et al. (2004), o estresse causado por baixas temperaturas deixaria as células bacterianas mais resistentes a temperaturas entre 5° e -18°C.

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 foi observado no presente estudo. Como os peixes 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 estresse e, dessa forma, afetar a capacidade de formação de biofilme de *V. parahaemolyticus*.

Lima (2014) testou a capacidade de inibição da formação do biofilme por *Candida albicans* após estresse ácido, mas não observou inibição, o que vai de encontro aos resultados obtidos, já que 11,8% das cepas capazes de formar biofilme não o formaram após o estresse ácido, mostrando mais uma vez que a variação da resposta depende da cepa estudada. Ainda, 26,3% das cepas testadas aumentaram a capacidade de formar biofilme, mostrando que tanto o estresse térmico (frio e calor) como o estresse com pH ácido podem não apenas manter a capacidade das cepas formarem biofilme como podem ainda levar ao incremento dessa capacidade.

Segundo Mancilla (2005), *V. parahaemolyticus* morre a temperaturas menores que 5°C, mas no presente estudo 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.

CONCLUSÕES

Peixes da espécie *Mugil platanus* são hospedeiros de *Vibrio parahaemolyticus* no estuário da Lagoa dos Patos. Temperaturas ambientais médias tão baixas quanto 13,9°C, assim como o pH neutro da água, não são impedimento para a ocorrência de *V. parahaemolyticus* em *Mugil platanus*.

A quase totalidade das cepas de *V. parahaemolyticus* isolados de pescados capturados no estuário da Lagoa dos Patos são formadoras de biofilme. As diferentes cepas 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.

REFERÊNCIAS

- APHA 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21st ed. American Public Health Association (APHA/AWWA/WEF), Washington. 1268p.
- Archer R.M.B. & Moretto E. 1994. Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* em Mexilhões (*Perna perna* Linnaeus, 1758) de Banco Natural do Litoral do Município de Palhoça, Santa Catarina, Brasil. Cad. Saúde Pública 10(3):379-386.
- Austin B. 2009. *Vibrios* as causal agents of zoonoses. Vet. Microbiol. 140: 310-317.
- Baldisserotto B. 2009. Piscicultura continental no Rio Grande do Sul: situação atual, problemas e perspectivas para o futuro. Ciência Rural 39(1):291-299.
- Baumann P. & Schubert R.H.W. 1984. Family II: Vibrionaceae, p.516-550. In: Krieg N.R. & Holt J.G. (Eds), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Bilung M.L., Radu S., Bahaman A.R., Rahim R.A. & Napis S. 2005. Random amplified polymorphic DNA-PCR typing of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from local cockles (*Anadara granosa*). Am. J. Immunol. 1:31-36.
- Butt A.A., Aldridge K.E. & Sandres C.V. 2004. Infections related to the ingestion of seafood I. Viral and bacterial infections. Lancet Infect. Dis. 4(4):201-212.
- Caixeta D.S. 2008. Sanificantes químicos no controle de biofilmes formados por duas espécies de *Pseudomonas* em superfície de aço inoxidável. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 75p.
- Calliari L.J. 1998. O ambiente e a biota do Estuário da Lagoa dos Patos, p.13-18. In: Seeliger U., Odebrecht C. & Castello J.P. (Eds), Os Ecossistemas Costeiro e Marinho do Extremo Sul do Brasil. Ecossistematia, Rio Grande, RS.
- Castro-Rosas J. & Escartín E.F. 2002. Adhesion and colonization of *V. cholerae* O1 on shrimp and crab carapace. J. Food Protect. 65:492-498.
- Chang C.M., Chiang M.L. & Chou C.C. 2004. Responses of heat-shocked *Vibrio parahaemolyticus* to subsequent physical and chemical stresses. J. Food Protect. 67:2183-2188.
- DiRita V.J. 1992. Co-ordinate expression of virulence genes by *ToxR* in *Vibrio cholerae*. Mol. Microbiol. 6:451-458.
- Donlan R.M. & Costerton J.M. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin. Microbiol. Rev. 15:167-193.
- Elexson N., Yaya R., Nor A.M., Kantilal H.K., Ubong A., Yoshitsugu N., Nishi-

- buchi M. & Son R. 2014. Biofilm assessment of *Vibrio parahaemolyticus* from seafood using Random Amplified Polymorphism DNA-PCR. *Int. Food Res. J.* 21(1):59-65.
- Embrapa Clima Temperado. Dados meteorológicos de Pelotas em tempo real. Disponível em <http://agromet.cpact.embrapa.br/online/Current_Monitor.htm> Acesso em 18 jan. 2016.
- FAO. 2014. Comércio global de peixes atinge níveis recordes. Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura. Disponível em <<https://www.fao.org.br/cgpanr.asp>> Acesso em 17 out. 2015.
- FAO 2015. Caminhar para a igualdade de gênero na indústria pesqueira. Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura. Disponível em <<https://www.fao.org.br/cpigip.asp>> Acesso em 17 out. 2015.
- Flach J., Karnopp C. & Corção G. 2005. Biofilmes formados em matéria-prima em contato com leite: fatores de virulência envolvidos. *Acta Scientiae Veterinariae* 33(3):291-296.
- Gaspar J., Vieira R. & Tapia M. 1997. Aspectos sanitários do pescado de origem de água doce e marinha, comercializado na feira de Gentilândia, Fortaleza, Ceará. *Ciênc. Tecnol. Alimentos* 11:20-28.
- Gil A. I., Miranda H., Lanata C.F., Prada A., Hall E.R., Barreno C.M., Nusrin S., Bhuiyan N.A., Sack D.A. & Nair G.B. 2007. O3:K6 Serotype of *Vibrio parahaemolyticus* identical to the global pandemic clone associated with diarrhea in Peru. *ISID* 11:324-328.
- ICMSF 1978. *Vibrio parahaemolyticus*, p.201-207, 287-350. In: International Commission on Microbiological Specifications for Foods (Ed.), *Micro-organisms in Food 1: their significance and methods of enumerations*. 2nd ed. University of Toronto Press, Toronto.
- Janssens J.C.A., Steenackers H., Robijns S., Gellens E., Levin J., Zhao H., Hermans K., Coster D., Verhoeven T.L., Marchal K., Vanderleyden J., De Vos D.E. & De Keersmaecker S.C.J. 2008. Brominated Furanones Inhibit Biofilm Formation by *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(21):6639-6648.
- Jay J.M. 2005. *Microbiologia de Alimentos*. 6th ed. Artmed, Porto Alegre. 711p.
- Karunasagar I., Otta S.K. & Karunasagar I. 1996. Biofilm formation by *Vibrio harveyi* on surfaces. *Aquaculture* 140:241-245.
- Kaysner C.A. & Depaola Jr 2004. *Vibrio*. *Bacteriological Analytical Manual-BAM*. U.S. Food and Drug Administration. Disponível em <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm070830.htm>> Acesso em 18 out. 2015.
- Kim Y.B., Okuda J., Matsumoto C., Takahashi N., Hashimoto S. & Nishibuchi M. 1999. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene. *J. Clin. Microbiol.* 37(4):1173-1177.
- Kudo Y.H., Kumagai S., Konuma H., Miwa N., Masuda T., Ozawa K. & Nishina T. 2013. Decontamination of *Vibrio parahaemolyticus* in fish by washing with hygienic seawater and impacts of the high level contamination in the gills and viscera. *J. Vet. Med. Sci.* 75(5):589-596.
- Lee S.H., Hava D.L., Waldor M.K. & Camilli A. 1999. Regulation and temporal expression patterns of *Vibrio cholerae* virulence genes during infection. *Cell Press* 99(6):625-634.
- Lima C.P. 2014. Avaliação da atividade do ácido gálico sobre a formação de biofilme por *Candida albicans*. Trabalho de Conclusão de Curso, Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, GO. 52p.
- Lin C., Yu R.C. & Chou C.C. 2004. Susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* to various environmental stresses after cold shock treatment. *Int. J. Food Microbiol.* 92:207-215.
- Lin M.H., Tsai T.Y., Hsieh S.C., Yu R.C. & Chou C.C. 2013. Susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* to disinfectants after prior exposure to sublethal stress. *Food Microbiol.* 34:202-206.
- Mancilla E.P. 2005. Intoxicación por *Vibrio parahaemolyticus*. *Cuadernos Médico Sociales* 45:43-47.
- Milan C., Silveira D.R., Rosa J.V. & Timm C.D. 2015. *Vibrio parahaemolyticus* isolados de pescados do estuário da Lagoa dos Patos. *Revta Inst. Adolfo Lutz, São Paulo*, 74(2):149-153.
- MAPA 2014. Potencial brasileiro. Ministério da Pesca e Aquicultura. Disponível em <<http://www.mpa.gov.br/aquicultura/potencial-brasileiro>> Acesso em 21 out. 2015.
- Morris Jr J.G. & Black R.E. 1985. Cholera and other vibrioses in the United States. *N. Engl. J. Med.* 312(6):343-350.
- Nascimento D.L., Barros C.N., Silva A.D.R., Guimarães J.M., Pedrosa V.F. & Mendes E.S. 2014. Bactérias potencialmente patogênicas isoladas de beijupirá (*Rachycentron canadum*) cultivadas em sistema *offshore*. *Med. Vet.* 8(2):12-21.
- Nitschke M. 2006. Biotensoativos como agentes inibidores da adesão de patógenos em superfícies de materiais utilizados na indústria de alimentos. Projeto de Pesquisa, Embrapa Agroindústria de Alimentos. Embrapa-CTAA, Rio de Janeiro, RJ.
- Ordóñez J.A. 2005. Características gerais do pescado, p.219-229. In: Ordóñez J.A. (Ed.), *Tecnologia de Alimentos de Origem Animal*. Artmed, São Paulo.
- Reis E.G. 1999. Pesca artesanal na Lagoa dos Patos: história e administração pesqueira, p.81-84. In: Alves F.N. (Ed.), *Por uma História Multidisciplinar do Rio Grande*. FURG, Rio Grande.
- Rosa J.V., Silva C.J., Barbosa F., Bairros J., Duval E.H., Helbig E. & Timm, C.D. 2016. *Vibrio parahaemolyticus* and *Salmonella enterica* isolated from fishes captured from the Lagoa dos Patos estuary. *Semina, Ciênc. Agrárias*. (Em publicação)
- Sakazaki R., Iwanami S. & Fukumi H. 1963. Studies on the enteropathogenic, facultatively halophilic bacteria, *Vibrio parahaemolyticus*. I. Morphological, cultural and biochemical properties and its taxonomic position. *Jpn J. Med. Sci. Biol.* 16:161-188.
- Sambrook J. & Russel D.W. 2001. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 999p.
- Silva S.R.C. 2003. Material didático-pedagógico sobre a tainha (*Mugil platanus*): pesca e biologia. Monografia do Curso de Especialização em Ecologia Aquática Costeira, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS. 45p.
- Stepanovic S., Vukovic D., Dakic I., Savic B. & Svabic-Vlahovic M. 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J. Microbiol. Methods* 40:175-179.
- Su Y.C. & Liu C. 2007. *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety. *Food Microbiol.* 24:549-558.
- Sutherland I.W. 2001. The biofilm matrix: an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol.* 9(5):222-227.
- Urmersbach S., Aho T., Alter T., Hassan S.S., Autio R. & Huehn S. 2015. Changes in global gene expression of *Vibrio parahaemolyticus* induced by cold- and heat-stress. *BMC Microbiol.* 15(1):229-241.
- Wong H.C., Peng P.Y., Han J.M., Chang C.Y. & Lan S.L. 1998. Effect of mild acid treatment on the survival, enteropathogenicity, and protein production in *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect. Immun.* 66(7):3066-3071.