

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Tese

**Formação de biofilme por *Vibrio parahaemolyticus* isolados de pescados e
resistência a sanitizantes**

Janaina Viana da Rosa

Pelotas, 2018

Janaina Viana da Rosa

**Formação de biofilme por *Vibrio parahaemolyticus* isolados de pescados e
resistência a sanitizantes**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Dr. Cláudio Dias Timm

Coorientador: Dra. Rita de Cássia dos Santos da Conceição

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

R788f Rosa, Janaina Viana da

Formação de biofilme por *Vibrio parahaemolyticus* isolados de pescados e resistência a sanitizantes / Janaina Viana da Rosa ; Cláudio Dias Timm, orientador ; Rita de Cássia dos Santos da Conceição, coorientadora. — Pelotas, 2018.

74 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Camarão. 2. Estresse subletal. 3. Hipoclorito de sódio. 4. Peixes. 5. Superfícies. I. Timm, Cláudio Dias, orient. II. Conceição, Rita de Cássia dos Santos da, coorient. III. Título.

CDD : 636.089

Janaina Viana da Rosa

Formação de biofilme por *Vibrio parahaemolyticus* isolados de pescados e
resistência a sanitizantes

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências,
Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária,
Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 22/02/2018

Banca examinadora:

Prof. Dr. Cláudio Dias Timm (Orientador)
Doutor em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dra. Rita de Cássia dos Santos da Conceição
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dra. Fernanda de Rezende Pinto
Doutora em Medicina Veterinária Preventiva pela Universidade Júlio de Mesquita
Filho

Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Agradecimentos

Gostaria de agradecer aos meus pais, Elsa e Jorge e meu irmão Wagner por sempre me apoiarem em todas etapas da minha vida e, da melhor maneira, me proporcionarem uma vida maravilhosa.

Ao meu namorado, Alan, por toda paciência, auxílio e apoio em todos momentos.

Ao meu professor e orientador Dr. Cláudio Dias Timm, pela confiança e valioso ensinamento em todo período do doutorado.

As minhas amigas do Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal por tornarem meus dias mais leves e pelo apoio em todos momentos.

Muito obrigada!

Resumo

DA ROSA, Janaina Viana. **Formação de biofilme por *Vibrio parahaemolyticus* isolados de pescados e resistência a sanitizantes**. 2018. 74f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

Vibrio parahaemolyticus é um patógeno que pode causar gastroenterite pelo consumo de pescados contaminados. Biofilme bacteriano é uma comunidade de micro-organismos sésseis embebidos em uma matriz extracelular formada por exopolissacarídeos, que pode dificultar a eliminação de micro-organismos indesejáveis em alimentos. O objetivo deste trabalho foi verificar a capacidade de *V. parahaemolyticus* isolados de pescados provenientes do estuário da Lagoa dos Patos-RS, formarem biofilme em diferentes superfícies e após exposição a estresses subletais e testar o efeito do biofilme sobre a resistência a sanitizante. Para obtenção das amostras, foram realizadas 12 coletas de *Farfantepenaeus paulensis* (Camarão-rosa) e de peixes capturados no estuário da Lagoa dos Patos. Os isolados de *Vibrio* foram analisados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) para identificação da espécie. Além dos isolados obtidos, também foram estudados 15 outros isolados de *V. parahaemolyticus* previamente obtidos em outros trabalhos. Os isolados foram avaliados quanto à capacidade de produção de biofilme em placas de microtitulação. A capacidade de produção de biofilme após os isolados serem submetidos a diferentes tipos de estresse subletal (42 °C, 20 °C, 4 °C e pH ácido) também foi testado. Os isolados de *V. parahaemolyticus* formadores de biofilme foram testados quanto à capacidade de formar biofilme em superfícies de polietileno de alta densidade, aço inoxidável, vidro, exoesqueleto de *F. paulensis* e opérculo de *Micropogonias furnieri* (Corvina). A eficiência do sanitizante hipoclorito de sódio foi avaliada frente às bactérias nos biofilmes. Dentre os 120 peixes analisados, *V. parahaemolyticus* foi isolado de quatro (3,33%) peixes e de duas (16,66%) amostras de *F. paulensis*. Dos 19 isolados, 89,5% foram capazes de formar biofilme e, desses, 25% aumentaram a capacidade de formar biofilme após algum tipo de estresse. Um dos dois isolados obtidos de *F. paulensis* foi capaz de formar biofilme, o outro foi classificado como não formador de biofilme. Nenhum desses isolados alterou sua capacidade de formar biofilme quando submetido aos estresses de 4 °C e 20 °C; contudo, com relação aos estresses de 42 °C e pH ácido, cada isolado respondeu de uma maneira diferente. Oito isolados foram testados quanto à capacidade de formar biofilme em diferentes superfícies, cinco foram considerados formadores de biofilme, sendo que mais de um isolado formou biofilme na superfície do opérculo de *M. furnieri* e do polietileno de alta densidade. Um isolado formou biofilme em vidro e um em aço inoxidável. Nenhum isolado formou biofilme na carapaça de camarão. O sanitizante reduziu a formação do biofilme em todas as superfícies. Com base nos resultados, conclui-se que peixes da espécie *M. platanus* e camarões da espécie *F. paulensis* são hospedeiros de *V.*

parahaemolyticus geralmente formador de biofilme. A exposição a condições subletais de estresse tem efeito distinto sobre os diferentes isolados, cuja capacidade de formar biofilme pode ser alterada em função da superfície. O hipoclorito de sódio, na concentração comumente usada nas indústrias de pescado, reduz a população bacteriana de *V. parahaemolyticus* em biofilme, mas não elimina a bactéria.

Palavras-chave: camarão; estresse subletal; hipoclorito de sódio; peixes; superfícies

Abstract

DA ROSA, Janaina Viana. ***Vibrio parahaemolyticus* biofilm formation isolated from fish and resistance to sanitizers**. 2018. 74f. Thesis (Doctor degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

Vibrio parahaemolyticus is a pathogen can cause gastroenteritis by consumption of contaminated fish. Bacterial biofilm is a community of sessile microorganisms embedded in an extracellular matrix formed by exopolysaccharides, which may hinder the elimination of undesirable microorganisms in food. The objective this study was to verify the ability of *V. parahaemolyticus* isolated from fish from the estuary of Lagoa dos Patos-RS to form biofilm on different surfaces and after exposure to sublethal stress and test the effect of biofilm on resistance to sanitizing. To obtain the samples, 12 collections of *Farfantepenaeus paulensis* (Pink shrimp) and of fish captured in the estuary of Lagoa dos Patos. *Vibrio* isolates were analyzed by polymerase chain reaction (PCR) to identification of the species. In addition to the isolates obtained in this study were also studied 15 other isolates of *V. parahaemolyticus* previously isolated in other works. The isolates were evaluated for biofilm production capacity in microtiter plates. The biofilm production capacity after the isolates had being subjected to different types of sublethal stress (42 °C, 20 °C, 4 °C and acid pH) was also tested. The isolates of *V. parahaemolyticus* able to form biofilm were tested for the capacity of forming biofilm on high density polyethylene, stainless steel, glass, exoskeleton of *Farfantepenaeus paulensis* and operculum of *Micropogonias furnieri* (Corvina). The sanitizer sodium hypochlorite efficiency was evaluated against the bacteria in the biofilms formed on the surface of the materials used. Among the 120 analyzed fish, *V. parahaemolyticus* were isolated from four (3.33%) fishes and two (16.66%) samples of *F. paulensis*. Among the 19 isolates analyzed, 89.5% were able to form biofilm and of these 25% increased the ability to form biofilm after some kind of stress. One of the two isolated was able to form biofilm, being classified as weak biofilm-forming; the other one was classified as non-biofilm-forming. None of the isolates altered their ability to form biofilm when subjected to the stresses of 4 °C and 20 °C; however, regarding the stresses of 42 °C and pH acid, each strain responded differently. Eight isolates were tested for their ability to form biofilm on different surfaces, five were considered biofilm forming and more than one isolate formed biofilm on the surface of the *M. furnieri* operculum and high density polyethylene. One isolate formed biofilm in glass and one in stainless steel. None isolate formed biofilm in the shrimp shells. The sanitizer reduced biofilm formation on all surfaces. Based on the results, we concluded fishes of the species *M. platanus* and shrimp of the specie *F. paulensis* are hosts of *V. parahaemolyticus* usually a form biofilm. Exposure to sublethal stress conditions has distinct effect on different isolates, whose ability to form biofilm can be altered depending on the surface. The sodium hypochlorite at a concentration generally used in fish industries,

reduces bacterial population of *V. parahaemolyticus* in biofilm, but does not eliminate the bacteria.

Keywords: shrimp; sublethal stress; sodium hypochlorite; fish; surfaces

Lista de Figuras

Artigo 1

- Figura 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..... 35

Artigo 3

- Figura 1 Efeito do hipoclorito de sódio sobre cepas de *V. parahaemolyticus* (A, B, C, F e G) formadoras de biofilme em superfícies de polietileno de alta densidade, vidro, aço inoxidável e opérculo de *M. furnieri*..... 61

Lista de Quadros

Artigo 1

Quadro 1	<i>Primers</i> utilizados na identificação de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> isolados de pescados (<i>Mugil platanus</i> , <i>Micropogonias furnieri</i> e <i>Paralichthys orbignyanus</i>) capturados no estuário da Lagoa dos Patos.....	32
Quadro 2	Ocorrência de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> em pescados capturados no estuário da Lagoa dos Patos e temperatura do ambiente, pH e salinidade da água.....	33
Quadro 3	Classificação de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> isolados de pescados quanto à capacidade de formar biofilme.....	34

Lista de Tabelas

Artigo 2

Tabela 1	<i>Primers</i> utilizados na identificação de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	40
----------	--	----

Artigo 3

Tabela 1	Formação de biofilme por <i>V. parahaemolyticus</i> em diferentes superfícies.....	60
----------	--	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

APA	Água Peptonada Alcalina
ATCC	American Type Culture Collection
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetracético
FDA	Food and Drug Administration
HCl	Ácido Clorídrico
HClO	Ácido Hipocloroso
ICMSF	International Commission on Microbiological Specifications for Foods
NaCl	Cloreto de Sódio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCA	Ágar Padrão para Contagem
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
PEAD	Polietileno de Alta Densidade
PET	Politereftalato de Etileno
RNase	Ribonuclease
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
spp	Espécies
TCBS	Tiosulfato Citrato Bile Sacarose

Lista de Símbolos

°C	Grau Celsius
®	Marca registrada
%	Porcentagem
‰	Por mil
<	Menor
Cm	Centímetro
Cm ²	Centímetro quadrado
Cl ₂	Cloro
DO	Densidade ótica
G	Gramas
H	Horas
Kg	Quilograma
Km ²	Quilômetro Quadrado
M	Massa
M	Molar
Min	Minuto
µL	Microlitro
mM	Micromolar
mL	Mililitro
Na ₂ S ₂ O ₃	Tiosulfato de sódio
PB	Pares de base
pH	Potencial hidrogeniônico
ppm	Partes por milhão
V	Volume

Sumário

1 Introdução.....	14
2 Artigos.....	21
2.1 Artigo 1.....	21
2.2 Artigo 2.....	36
2.3 Artigo 3.....	47
3 Considerações Finais.....	62
Referências.....	63

1 Introdução

Entende-se por pescado os peixes, crustáceos, moluscos, anfíbios, répteis, equinodermos e outros animais aquáticos usados na alimentação humana (RIISPOA, 2017). O grande atrativo desta carne, em relação às demais, é conter proteínas de alta qualidade e rápida digestibilidade, todos os aminoácidos essenciais, alto teor de lisina, ser fonte de vitaminas A, D, E, K e complexo B, de ferro, fósforo e cálcio, de ômega- 3 e ainda ter baixo teor de colesterol (OETTERER, 2002). A carne de pescado é muito perecível, já que possui pH próximo a neutralidade, elevada atividade de água e alto teor de nutrientes, fatores que favorecem a proliferação de micro-organismos (JAY, 2005).

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) são um problema a ser enfrentado em todo o mundo. No Brasil, no ano de 2016, foram registrados 543 surtos, afetando 9.907 pessoas (BRASIL, 2017). Na indústria de processamento de pescados, os equipamentos e a qualidade da água são considerados as principais fontes de contaminação (GUTIÉRREZ et al., 2012). Por motivos econômicos, algumas indústrias utilizam a água do mar em vez de água doce, a qual, mesmo após o tratamento (adição de cloro e sistema de radiação Ultravioleta), pode continuar contaminada, especialmente se houver formação de biofilmes no sistema de distribuição da água. *Vibrio* spp. é um gênero de bactérias que tem sido encontrado nessas situações (SREY et al., 2013). As espécies de *Vibrio* que, além de serem encontradas em produtos da pesca, podem formar biofilme são *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* e *V. alginolyticus*. Além destes, muitos outros micro-organismos, incluindo *Escherichia* spp., *Clostridium* spp., *Listeria* spp., *Staphylococcus* spp. e *Pseudomonas* spp., já foram detectados em biofilmes em unidades de processamento (GUTIÉRREZ et al., 2012).

Biofilme é uma comunidade de micro-organismos sésseis caracterizada por células que se aderem a uma superfície, embebidas em uma matriz extracelular formada por exopolissacarídeos (DONLAN e COSTERTON, 2002). Os biofilmes podem comprometer a segurança e a qualidade dos produtos, além da possibilidade da redução do fluxo, bloqueando tubulações e corrosão das tubulações de aço

inoxidável (PARKAR, FKLINT e BROOKS, 2004). Além disso, a partir do momento em que se encontram presentes em equipamentos e superfícies que entram em contato direto com alimentos, podem agir como fonte persistente de contaminação, podendo estar na origem de doenças veiculadas por alimentos e causar grandes perdas econômicas (VAN HOUDT e MICHIELS, 2010). Por isso, os biofilmes são considerados um ponto crítico em indústrias alimentares (SREY et al., 2013). Existe a possibilidade ainda dos biofilmes tornarem o micro-organismo mais resistente aos desinfetantes, devido às suas características intrínsecas. Uma das causas dessa maior resistência é a barreira constituída pela matriz de exopolissacarídeos, que previne ou diminui o contato com os agentes antimicrobianos (SREY et al., 2013).

1.1 Estresses subletais

Alguns pesquisadores, como Castro-Rosas e Escartín (2002), sugeriram que bactérias do gênero *Vibrio* podem se tornar resistentes a fatores ecológicos, tais como altas ou baixas temperaturas ou pH baixo, esses fatores são considerados tipos de estresses subletais e a resistência a eles pode gerar importantes consequências, como aumento da capacidade de formar biofilme, dificultando a eliminação da bactéria durante a preparação dos pescados para o consumo. Além disso, o próprio biofilme é causador de estresse para as cepas bacterianas, pois dentro dele as bactérias crescem mais lentamente, possivelmente devido à limitação de nutrientes (BROWN, 1999). Chang et al. (2004) chegaram a conclusão de que cada cepa apresenta um comportamento distinto quando submetida a diferentes formas de estresse em relação ao estresse por calor, relatando que a extensão da resposta de *V. parahaemolyticus* variou de acordo com a cepa e a duração do tratamento.

Diversas cepas de *V. parahaemolyticus* foram expostas a tensões subletais como pH ácido e temperaturas de 20°C e 42°C por Lin et al. (2013) para depois analisarem sua resistência a sanitizantes e verificaram que as tensões subletais aumentaram a resistência de *V. parahaemolyticus* aos produtos utilizados.

1.2 Sanitizantes

As indústrias de pescados possuem ambientes úmidos, que acabam propiciando as condições favoráveis à proliferação microbiana, por isso devem seguir protocolos particulares de higienização, que envolvem limpeza e desinfecção (ANDRADE, PINTO e ROSADO, 2008).

Os detergentes servem para remover resíduos orgânicos e minerais, conseqüentemente também diminuindo a carga bacteriana das superfícies. A sanitização visa a reduzir os micro-organismos a níveis considerados seguros e eliminar os patogênicos, sem prejudicar a qualidade do produto (SANTANA, 2016). As substâncias antimicrobianas agem sobre os micro-organismos de duas maneiras: provocando sua morte - ação bactericida, ou inibindo seu crescimento - ação bacteriostática (TRABULSI, 2000).

Há diversas opções de agentes químicos com diferentes princípios ativos. A escolha depende das características da superfície e a frequência de utilização. Os mais comumente utilizados nos serviços de alimentação são: compostos à base de cloro, iodo, peróxido de hidrogênio, ácido peracético e quaternário de amônio (GERMANO e GERMANO, 2001).

1.2.1 Hipoclorito de sódio

Esse tipo de sanitizante à base de cloro é o mais utilizado em entrepostos de pescado devido à sua ação antimicrobiana, também pela fácil aplicação e menor custo econômico quando comparado a outros produtos (LEITÃO, 2001). É amplamente utilizado contra bactérias, fungos e vírus (MACEDO, 2004).

Apesar das suas vantagens, o hipoclorito é altamente corrosivo, podendo danificar juntas de peças de borrachas e reagir com matéria orgânica, irritando a pele, mucosa e vias respiratórias dos manipuladores (EVANGELISTA, 2000).

A primeira reação que ocorre quando o hipoclorito de sódio é dissociado em água é com a matéria orgânica, a segunda reação é do componente clorado com amônia, formando as cloraminas, o restante é o cloro livre, contituído pelo ácido hipocloroso (VANETTI, 2005). As atividades biocida e oxidante deste composto aumentam com a formação do ácido hipocloroso (HClO) em sua forma não dissociada, quando em solução aquosa pura. O ácido hipocloroso é um ácido fraco, cuja formação é influenciada pelo pH do meio, ou seja, o aumento no pH diminui substancialmente a atividade biocida do cloro e a redução no pH aumenta essa atividade na mesma proporção (EMMANUEL et al., 2004).

O hipoclorito de sódio atua alterando a permeabilidade celular e interferindo nos processos enzimáticos (EVANGELISTA, 2000). É utilizado na desinfecção de ambientes, superfícies inanimadas, que entram em contato com o alimento e na água de abastecimento interno da indústria (ANVISA, 2016).

1.2.2 Quaternário de amônia

É largamente utilizado como antisséptico e desinfetante devido à sua ação surfactante e baixa toxicidade, aliado ao seu poder bactericida (GARCÍA et al., 1999). Esse sanitizante possui vários mecanismos de ação que possibilitam a atividade bactericida destes compostos, como a desnaturação protéica, inibição enzimática e lesão da membrana citoplasmática (AQUINO, GERMANO e GERMANO, 2003), têm adsorção forte e rápida às partículas sólidas (GARCÍA et al., 1999).

É utilizado contra bactérias Gram positivas, mas possui baixa ação contra Gram negativas. É pouco eficiente contra coliformes e bactérias psicrotróficas e ineficiente contra esporos. É usado em pisos, paredes, equipamentos (ANDRADE, PINTO e ROSADO, 2008), mas diversos autores já relataram a resistência microbiana a este sanitizante, o que acarreta em um grande problema na indústria de processamento de alimentos (HEIR, SUNDHEIM e HOLCK, 1995; SUNDHEIM et al., 1998; AASE et al., 2000).

1.2.3 Ácido Peracético

Conhecido também como ácido peróxiacético, é produzido pela reação do ácido acético com peróxido de hidrogênio na presença do ácido sulfúrico que age como catalisador (KITIS, 2004).

Não reage com proteínas para produzir compostos tóxicos ou carcinogênicos, tem baixo impacto ambiental e é muito efetivo contra biofilmes (ROSSONI e GAYLARDE, 2000), além disso, possui largo espectro de atividade mesmo na presença de matéria orgânica e necessita de curto tempo de contato (SOUZA e DANIEL, 2005). Entretanto, de acordo com Nascimento (2010), este produto possui baixa estabilidade durante a estocagem e é irritante à pele, devendo o manuseio ser realizado com cuidado. Além disso, quando apresentado na forma pura, é incompatível com ácidos, álcalis concentrados, borrachas naturais e sintéticas, ferro, cobre e alumínio.

1.2.4 Iodofor

São compostos de adição entre iodo elementar e tensoativos não iônicos em meio ácido. O tensoativo age como um transportador do iodo e como solubilizante na fase aquosa (FUJIHARA e SYLVIO, 2003). O iodo, que apresenta alta capacidade de penetração celular e de desnaturar proteínas bacterianas (EVANGELISTA, 2000), é utilizado para limpar e desinfetar equipamentos e

superfícies (MARRIOTT e GRAVANI, 2006). Possui uma boa estabilidade e é eficiente contra todos micro-organismos, com exceção de esporos bacterianos, que não são afetados. A desvantagem é que pode dar coloração em alguns materiais como o plástico, além de sua eficiência diminuir com o aumento de pH (ANDRADE e MACEDO, 1996).

1.2.5 Biguanida

A clorexidina é o desinfetante mais popular entre as biguanidas. Atua contra bactérias e fungos (ANDRADE, 2008), mas somente sobre as formas vegetativas, não demonstrando ação contra esporos, exceto em temperaturas elevadas (SIQUEIRA et al., 1998). Possui amplo espectro de atividade antibacteriana, alta taxa de mortalidade e baixa toxicidade em mamíferos (ANDRADE, 2008). Seu mecanismo de ação é a destruição parcial das membranas celulares e alteração dos equilíbrios de transporte metabólico (FUJIHARA e SYLVIO, 2003).

1.3 Superfícies

Existem diversos tipos de materiais utilizados na indústria alimentar, como por exemplo, o aço inoxidável e vidro (VAN HOUTT e MICHIELS, 2010), sobre os quais uma grande diversidade de micro-organismos possui capacidade de se aderir e formar biofilme (DUNNE JÚNIOR, 2002).

O vidro possui uma superfície de contato lisa e propriedades resistentes à corrosão, enquanto o aço inoxidável, apesar de mais resistente a danos causados por impacto, é mais vulnerável à corrosão (SREY et al., 2013). Ainda assim, o aço inoxidável é o material mais utilizado na construção de equipamentos para o processamento de alimentos (SECA, 2015). Rivas et al. (2007) avaliaram a capacidade de formação de biofilmes de dez diferentes cepas de *E.coli* em superfícies de aço inoxidável e todas as cepas apresentaram capacidade de formar biofilme em superfície de aço inoxidável. Tanto o vidro como o aço inoxidável, apresentam maior resistência a agentes oxidantes e outros agentes sanitizantes como ácido peracético, hipocloritos e iodóforos (ROSSONI e GAYLARDE, 2000).

Ainda são necessários mais estudos com objetivo de elucidar a capacidade de *V. parahaemolyticus* formar biofilme em diferentes superfícies, como também o efeito de diferentes tipos de estresse subletais sobre o micro-organismo e da formação de biofilmes sobre a ação dos sanitizantes. Por isso o objetivo deste trabalho foi pesquisar acerca da formação de biofilme por *V. parahaemolyticus* em

diferentes superfícies após estresses subletais e o efeito do biofilme sobre a resistência a sanitizantes.

2 Artigos

2.1 Artigo 1

Formação de biofilme por *Vibrio parahaemolyticus* isolados de pescados

Autores: Janaina V. da Rosa, Karoline Käefer, Natália V. da Conceição, Rita C.S. da Conceição e Cláudio D. Timm

Publicado na revista Pesquisa Veterinária Brasileira, v.37, n.4, p.339-345, abril 2017

Formação de biofilme por *Vibrio parahaemolyticus* isolados de pescados

Biofilm formation by *Vibrio parahaemolyticus* isolated from fish

Janaina V. da Rosa^{1*}, Karoline Käefer¹, Natália V. da Conceição¹, Rita C.S. da Conceição, Cláudio D. Timm¹

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 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 *M. 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.

Palavras- chave: *M. platanus*; estresse subletal; peixes.

ABSTRACT: 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,

¹ Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Departamento de Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Campus Capão do Leão, prédio 34, CEP 96010-900, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. kaeferkarol@gmail.com, natalia-volpato@hotmail.com, claudiotimm@hotmail.com

Autor para correspondência: janavrosa@yahoo.com.br

1 and *M. platanus* was the only species in which the microorganism was found. Among the 19
2 strains analyzed, 89.5% were able to form biofilm, which seems to indicate that this ability
3 has an important role in the microorganism survival in the fish. Among these strains, 25%
4 increased the ability to form biofilm after sublethal exposure. Based on the results, we
5 concluded that fish of the species *M. platanus* of the Lagoa dos Patos Estuary are hosts of *V.*
6 *parahaemolyticus* and that almost all of these strains are forming biofilm. Exposure to
7 sublethal stress conditions has distinct effect on different strains, inducing an increase in the
8 ability to form biofilm in some. This was the first study about the effects of stress on the *V.*
9 *parahaemolyticus* biofilms formation.

10 **Key words:** *M. platanus*; sublethal stress; fishes.

11 12 **INTRODUÇÃO**

13 Os pescados são considerados a proteína animal mais saudável e consumida no
14 mundo, já que possuem elevada digestibilidade, alto valor biológico e elevado teor de ácidos
15 graxos poli-insaturados (Ordóñez 2005), proporcionando mais de 20% da proteína animal na
16 dieta em países que possuem população com baixa renda e *deficits* alimentares (FAO
17 2015). Segundo pesquisa da Organização Mundial de Saúde (OMS), os brasileiros
18 ultrapassaram o consumo mínimo de pescado recomendado pela OMS, que é de 12
19 kg/habitante/ano. Em 2013, o consumo chegou a 14,5 kg/habitante/ano, sendo que entre
20 2003 e 2013, o consumo nacional de pescado aumentou mais de 100% (MPA 2014).
21 Segundo a Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO 2014), será
22 necessário um aumento na produção de pescados para satisfazer as crescentes
23 necessidades mundiais.

24 O pescado é um alimento altamente perecível, possui pH próximo a neutralidade,
25 elevada atividade de água e alto teor de nutrientes facilmente utilizáveis por micro-
26 organismos. Entre os processos de captura e processamento, o pescado já está sujeito à
27 deterioração e contaminação devido às condições de armazenamento e à sua composição
28 natural (Gaspar 1997). Segundo Jay (2005), a microbiota do pescado é decorrente da
29 microbiota da água onde vivem, o que se reflete na qualidade microbiológica do produto
30 final. Devido a estes fatores, o pescado torna-se suscetível à contaminação por diferentes
31 micro-organismos, dentre os quais algumas espécies do gênero *Vibrio*.

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

39 *V. parahaemolyticus* é mais facilmente encontrado em locais onde a temperatura da
40 água não ultrapassa valores inferiores a 15°C (Su & Liu 2007). Essa espécie de micro-
41 organismo é halofílica, podendo ser encontrada em ambientes com salinidade entre 3% e
42 8% (Kaysner & Depaola, 2004) e tem pH ideal para multiplicação entre 7,8 e 8,6 (Mancilla
43 2005). Segundo Kudo et al. (2013), as brânquias e vísceras são capazes de disseminar
44 agentes patogênicos para a carne dos peixes. Nascimento et al. (2014) isolaram de peixes
45 da espécie *Rachycentron canadum* uma maior quantidade de *V. parahaemolyticus* de
46 fígado, quando comparado a outros órgãos, como rins e cérebro. É um patógeno que pode
47 causar gastroenterite aguda pelo consumo de frutos do mar contaminados, crus ou mal
48 cozidos, e pode também provocar infecções em feridas abertas que tenham sido expostas à
49 água do mar. Um pequeno número de células de *V. parahaemolyticus* já pode causar
50 doenças em animais e seres humanos (Su & Liu 2007). Em casos raros, a infecção por *V.*
51 *parahaemolyticus* pode ser fatal (Morris, 1985). A expressão dos genes de virulência de *V.*
52 *parahaemolyticus* é coordenada pelo gene *ToxR* (Lee et al., 1999). Este gene foi descoberto
53 pela primeira vez como regulador da expressão dos genes que codificam para a síntese da
54 toxina da cólera (DiRita, 1992), mas posteriormente foi encontrado também em *V.*
55 *parahaemolyticus*. O uso do gene *ToxR* para identificação de *V. parahaemolyticus* através

1 da PCR é específico e rápido, sendo útil para a investigação da suspeita da presença de *V.*
2 *parahaemolyticus* em espécimes clínicas e amostras de alimentos (Kim et al., 1999).

3 As principais práticas que estão ligadas aos surtos causados por esse micro-
4 organismo são: refrigeração inadequada, cozimento insuficiente, contaminação cruzada ou
5 recontaminação (Kaysner & Depaola 2004). Karunasagar & Otta (1996) citaram que mesmo
6 os processos de tratamento de água como cloração, adição de antimicrobianos e filtros
7 apresentam dificuldade em reduzir a contaminação por *Vibrio*, sendo suposto que este
8 gênero bacteriano pode formar biofilmes em diferentes superfícies. Biofilme bacteriano é
9 uma comunidade de micro-organismos sésseis que são capazes de se agregar e aderir em
10 uma superfície, embebidos em uma matriz extracelular formada por exopolissacarídeos
11 (Donlan & Costerton 2002). Na indústria, a capacidade de formação de biofilme é
12 preocupante, já que a lavagem e a sanitização podem não garantir a eliminação completa
13 dos micro-organismos, pois muitas das superfícies em contato com o alimento, como
14 plástico (polietileno de alta densidade), aço inoxidável e vidros, apresentam sulcos e podem
15 ter rachaduras, onde os biofilmes facilmente são formados (Nitschke 2006). Castro-Rosas &
16 Escartín (2002) levantaram a possibilidade das células de *Vibrio* se tornarem resistentes a
17 fatores ecológicos, tais como altas ou baixas temperaturas ou pH baixo. Isso pode ter
18 importantes consequências, como aumento da capacidade de formar biofilme, dificultando a
19 eliminação da bactéria durante a preparação dos pescados para o consumo.

20 Para garantir a qualidade dos pescados é necessário o correto manuseio durante
21 captura, processamento, armazenamento, transporte e comercialização. Segundo
22 Baldisserotto (2009), não há estudos sobre a qualidade do pescado continental vendido ao
23 consumidor no Rio Grande do Sul. Também faltam estudos que permitam conhecer a
24 ocorrência de agentes etiológicos de DTA (doenças transmitidas por alimentos) em
25 pescados da região, em especial do estuário da Lagoa dos Patos, o que constitui a base
26 indispensável para traçar planos efetivos de controle da sua transmissão para os
27 consumidores. As exceções são os trabalhos de Milan et al. (2015) e de Rosa et al. (2016),
28 que, analisando pescados capturados no estuário da Lagoa dos Patos, registraram o
29 isolamento de *V. parahaemolyticus* de *Farfantepenaeus paulensis* (camarão-rosa),
30 *Paralichthys orbignyanus* (linguado), *Mugil platanus* (tainha) e *Micropogonias furnieri*
31 (corvina). O estuário da Lagoa dos Patos, no extremo sul do Brasil, ocupa uma área de
32 963,8 km² (10% da área total desta laguna), recebendo água dos rios localizados na sua
33 porção norte e da Lagoa Mirim, ao sul, através do Canal São Gonçalo (Calliari 1998). O
34 estuário representa uma importante área de criação para várias espécies de peixes e
35 crustáceos de valor comercial, configurando-se como um polo pesqueiro artesanal de
36 importância destacada no abastecimento de pescados no sul do Brasil (Reis 1999).

37 **MATERIAL E MÉTODOS**

38 **Coleta das amostras**

39 Foram realizadas 12 coletas durante um ano, uma por mês, de amostras aleatórias
40 de peixes capturados no estuário da Lagoa dos Patos. As coletas, 10 unidades de peixes de
41 cada vez, foram realizadas logo após o desembarque dos pescados, os quais foram
42 acondicionados em sacos plásticos estéreis. Estes pescados permaneciam no máximo 12
43 horas nas embarcações e eram armazenados com gelo dentro das mesmas.
44 Concomitantemente aos pescados, também foram coletadas assepticamente, amostras de
45 100 mL água do estuário para análise de sanidade e pH, as quais foram obtidas de local
46 afastado das margens, a uma profundidade de 10 a 15 cm abaixo da superfície e
47 acondicionadas em frascos estéreis. As amostras foram imediatamente encaminhadas ao
48 laboratório em caixas isotérmicas com gelo.

49 **Análises da água**

50 A análise de salinidade foi realizada com refratômetro específico, segundo Standard
51 Methods for the Examination of Water and Wastewater (Apha 2005). A aferição do pH foi
52 feita através de fitas de pH-Fix 0-14 (Macherey-Nagel, Duren, Alemanha).

53 **Temperatura**

54

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

4 **Obtenção dos isolados**

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

15 **Extração de DNA**

16 Os DNAs dos isolados foram extraídos conforme Sambrook & Russel (2001). O
17 *pellet* obtido por centrifugação de 1 mL de cultura em APA- 3% NaCl foi ressuspendido em
18 100 µL de tampão STES [Tris-HCl 0,2 M, NaCl 0,5 M, SDS 0,1% (m/v), EDTA 0,01 M, pH
19 7,6], aos quais foram adicionados 50 µL de pérolas de vidro e 100 µL de fenol/clorofórmio.
20 Após homogeneização por 1 min, a mistura foi centrifugada a 13.000 g por 5 min. O
21 sobrenadante foi coletado e precipitado em 2 volumes de etanol absoluto e 0,1 volume de
22 NaCl 5 M a -70°C por 30 min. Uma nova centrifugação foi realizada a 13.000 g por 20 min, o
23 sobrenadante descartado e o *pellet* lavado com etanol a 70%. Após eluição em 40 µL de
24 tampão de eluição (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM, pH 7,4), foi adicionado 1 µL de RNase (10
25 µg/µL). O DNA extraído foi estocado a -70°C.

26 **Identificação de *V. parahaemolyticus***

27 Os isolados de *Vibrio* foram analisados pela reação em cadeia da polimerase (PCR)
28 para pesquisa dos genes *toxR* (Quadro 1), para identificação de *V. parahaemolyticus*
29 conforme Bilung et al. (2005), com modificações. Cada reação teve um volume final de 20
30 µL. Foram utilizados 10 µL de Master Mix, 1 µL (10 pmol) de cada *primer*, 1,2 µL de DNA e
31 6,8 µL de água para completar o volume da reação. A amplificação foi realizada em
32 termociclador TC-3000 com o seguinte programa: desnaturação inicial de 96°C por 5 min,
33 seguido de 20 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento dos *primers* a 63°C por
34 1,5 min, extensão a 72°C por 1,5 min e extensão final a 72°C por 7 min. Os produtos da
35 PCR foram corados com GelRed (Uniscience, São Paulo, Brasil) e a eletroforese foi
36 realizada em gel de agarose a 1,8%. Como controle positivo, foi utilizada a cepa de *V.*
37 *parahaemolyticus* ATCC 17802.

38 **Verificação da formação de biofilme em placas**

39 Foram estudados os isolados obtidos no presente trabalho e ainda 15 cepas de *V.*
40 *parahaemolyticus*, três previamente isoladas por Rosa et al. (2016), duas de *M. platanus* e
41 uma de *M. furnieri* e ainda doze isolados obtidos por Milan et al. (2015), seis de *F. paulensis*,
42 um de *P. orbignyianus* e cinco de *M. platanus*, todas obtidas no estuário da Lagoa dos Patos.
43 As cepas foram avaliadas quanto à capacidade de produção de biofilme em placas de
44 microtitulação (Nunclon, Nune, Roskilde, Denmark), seguindo a técnica descrita por
45 Janssens et al. (2008), com modificações, de forma a adaptar o método para *V.*
46 *parahaemolyticus*. Foram colocados 200 µL de caldo APA- 3% NaCl em cada poço da placa
47 de microtitulação adicionados de 2 µL de culturas *overnight* em APA- 3% NaCl de cada cepa
48 padronizadas em espectrofotômetro a 600 nm para valor 0,5 de densidade ótica (DO).
49 Poços com 200 µL de caldo APA- 3% NaCl, sem cultura bacteriana, foram utilizados como
50 controle. Após, a tampa foi colocada sobre a placa, que foi incubada durante 48 h a 37°C
51 sem agitação. Durante a incubação, os biofilmes se formaram sobre a superfície das
52 cavidades, nas tampas. Para quantificação da formação de biofilmes, as tampas foram
53 lavadas em 200 µL de solução salina tamponada com fosfato (PBS, 0,1 M, pH 7,0). O
54 material que permaneceu ligado à tampa foi corado durante 30 min com 200 µL de cristal
55 violeta 0,1% (m/v), lavado em água destilada estéril (200 µL) e a tampa foi seca em

1 temperatura ambiente por 30 min. O biofilme com corante foi extraído com ácido acético
 2 glacial 30% (200 µL). A DO₅₇₀ de cada poço foi medida utilizando leitor de placas de
 3 microtitulação. Cada cepa foi classificada como não formadora de biofilme, fracamente
 4 formadora, moderadamente formadora ou fortemente formadora, de acordo com os
 5 procedimentos sugeridos por Stepanovic et al. (2000). O ponto de corte (DOc) foi definido
 6 como três desvios padrões acima da média das DOs dos controles. A classificação foi
 7 determinada conforme segue.

8 $DO \leq DOc$ = não formadora

9 $DOc < DO \leq 2 \times DOc$ = fraca formadora

10 $2 \times DOc < DO \leq 4 \times DOc$ = moderada formadora

11 $4 \times DOc < DO$ = forte formadora

12 **Formação de biofilme após estresse subletal**

13 A capacidade de produção de biofilme após as cepas serem submetidas a estresse
 14 subletal foi testada. Para exposição das células ao choque de calor, culturas *overnight* em
 15 APA- 3% NaCl foram mantidas em banho-maria a 42°C por 45 min, segundo Chang et al.
 16 (2004). Para exposição ao choque de frio, culturas *overnight* em APA- 3% NaCl foram
 17 mantidas a 20°C durante 4 h, de acordo com Lin et al. (2004). As células também foram
 18 estressadas a 4°C durante 4h. Os procedimentos descritos por Wong et al. (1998) foram
 19 utilizados para estressar as células bacterianas em ambiente ácido. Culturas *overnight* em
 20 APA- 3% NaCl tiveram o pH ajustado para 5,0 com HCl 6N e foram incubadas a 37°C
 21 durante 30 min.

22 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

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

30
 31 Dentre os 120 peixes analisados, foram isolados *V. parahaemolyticus* de quatro
 32 (3,33%) pescados, sendo *M. platanus* a única espécie de peixe na qual o micro-organismo
 33 foi encontrado. *V. parahaemolyticus* já havia sido isolado de *M. platanus* capturados no
 34 estuário da Lagoa dos Patos por Milan et al. (2015) e por Rosa et al. (2016). Estes repetidos
 35 isolamentos são sugestivos de que *M. platanus* seja um hospedeiro regular de *V.*
 36 *parahaemolyticus* na região. *M. platanus* é um pescado que possui grande valor comercial,
 37 principalmente nas regiões sul e sudeste, e é uma espécie encontrada em abundância no
 38 estuário da Lagoa dos Patos (Silva 2003), sendo muito comercializada e consumida. No
 39 trabalho de Rosa et al. (2016), 13,3% (2/15) dos *M. platanus* recém-desembarcados
 40 analisados estavam contaminados por *V. parahaemolyticus*. Milan et al. (2015) encontraram
 41 percentual ainda mais elevado, 40% (4/10). No presente estudo, o micro-organismo estava
 42 presente em 8,9% (4/45) dos pescados dessa espécie. A ocorrência de *M. platanus*
 43 contaminados por *V. parahaemolyticus* em números tão significativos representa um perigo
 44 para a população e serve de alerta em relação à importância da inspeção e fiscalização
 45 durante a produção e comercialização dos pescados, no sentido de que medidas eficazes
 46 de controle microbiológico sejam aplicadas.

47 Segundo Su & Liu (2007), *V. parahaemolyticus* é encontrado principalmente em
 48 locais onde a temperatura da água não ultrapassa valores inferiores a 15°C. Outros estudos
 49 afirmam que nos meses frios a bactéria está presente principalmente no lodo e que ocorre
 50 livremente na água ou nos pescados durante os meses quentes do ano (Butt et al. 2004).
 51 Entretanto, nenhum mês em que *V. parahaemolyticus* foi isolado de *M. platanus* capturados
 52 no estuário da Lagoa dos Patos, julho de 2015, a temperatura média constatada na região
 53 foi de 13,9°C (Embrapa Clima Temperado, 2016), indicando que temperaturas relativamente
 54 baixas para o micro-organismo ser encontrado em pescados não constituíram impedimento
 55 para que isso ocorresse. O mês de julho foi o que apresentou temperaturas médias mensais

1 mais baixas durante o período em que as coletas foram realizadas, portanto não foi possível
2 fazer inferências sobre a de ocorrência de *V. parahaemolyticus* em pescados em épocas
3 ainda mais frias, mas essa possibilidade não pode ser descartada.

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

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

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

23 Nossos resultados são semelhantes aos de Elexson et al. (2014), que também
24 relataram a capacidade de *V. parahaemolyticus* formar biofilme. Esses autores analisaram
25 36 isolados de *V. parahaemolyticus* obtidos de *Anadara granosa* (berbigão), *Mya arenaria*
26 (marisco-branco), *Penaeus* spp. (camarões) e *Loligo opalescens* (lula), e constataram que
27 todos formavam biofilme, embora com diferentes intensidades, 33,33% para cada uma das
28 classificações: fraca, moderada e forte formadora de biofilme.

29 A capacidade de formar biofilme apresentada pela maioria dos *V. parahaemolyticus*
30 significa um problema potencial para as indústrias de processamento de pescados, uma vez
31 que a eliminação do micro-organismo das superfícies de equipamentos e utensílios pode ser
32 dificultada, aumentando o risco de que o patógeno permaneça nos alimentos. Segundo
33 Flach et al. (2005), os micro-organismos em biofilmes podem permanecer aderidos e viáveis
34 por longos períodos mesmo após a higienização, acarretando prejuízo financeiro à indústria
35 e constituindo fonte de contaminação para os alimentos. Segundo Urnersbach et. al. (2015),
36 bactérias em biofilme também podem se tornar mais resistentes a sanitização.

37 As cepas estudadas foram submetidas a diferentes tipos de estresse subletais, como
38 frio (4° e 20°C), calor (42°C) e acidez (pH 5), e posteriormente avaliadas quanto à
39 capacidade de formar biofilme. A maioria das cepas de *V. parahaemolyticus* (59,2%)
40 manteve a capacidade de formar biofilme inalterada após ser estressada (Figura 1).
41 Entretanto, 25% das cepas aumentaram essa capacidade. As cepas que mais aumentaram
42 sua capacidade de formar biofilme foram as que eram moderadas formadoras e passaram a
43 fortes formadoras, mas também foram as moderadas formadoras de biofilme que mais
44 reduziram sua capacidade, passando a fracas formadoras. Nenhuma cepa classificada
45 como fraca formadora passou a ser forte formadora após a exposição ao estresse, nem o
46 inverso aconteceu, indicando que o estresse subletal não é capaz de modificar de forma
47 drástica a capacidade de *V. parahaemolyticus* formar biofilme, embora as duas cepas que
48 eram não formadoras de biofilme tenham se tornado fracas formadoras após passarem pelo
49 estresse térmico a 20°C. Os resultados indicam que cada cepa apresenta um
50 comportamento distinto quando submetida a diferentes formas de estresse. Esta variação
51 pode estar ligada à matriz extracelular que forma os biofilmes, cujos componentes são as
52 próprias células bacterianas, exopolissacarídeos, proteínas, ácidos nucléicos, glicoproteínas,
53 fosfolipídios, detritos e matéria inorgânica (Sutherland 2001). Esta matriz extracelular varia
54 entre diferentes espécies bacterianas ou mesmo dentro da mesma espécie, de acordo com
55 as diferentes condições ambientais. Ela protege as células, auxiliando na resistência a

1 condições de estresse, como a diminuição e a exaustão de nutrientes e água, condições
2 ambientais adversas (Caixeta 2008).

3 *V. parahaemolyticus* pode sofrer diferentes tipos de estresse subletais durante a
4 permanência dos pescados na embarcação, no seu processamento ou mesmo na
5 residência do consumidor. O estresse subletal, ao induzir o aumento na capacidade de
6 formar biofilme por algumas cepas do micro-organismo, poderia levar à seleção dessas
7 cepas por serem mais dificilmente eliminadas das superfícies em que se encontram,
8 agravando o problema. Adicionalmente, segundo Lin et al. (2004), o estresse causado por
9 baixas temperaturas deixaria as células bacterianas mais resistentes a temperaturas entre
10 5° e -18°C.

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

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

32 Segundo Mancilla (2005), *V. parahaemolyticus* morre a temperaturas menores que
33 5°C, mas no presente estudo o micro-organismo não só sobreviveu à temperatura de 4°C,
34 como também manteve a capacidade de formar biofilme, sendo que 21% das cepas
35 testadas ainda aumentaram essa capacidade.

36 37 **CONCLUSÕES**

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

42 A quase totalidade das cepas de *V. parahaemolyticus* isolados de pescados
43 capturados no estuário da Lagoa dos Patos são formadoras de biofilme. As diferentes cepas
44 apresentam comportamento distinto sob condições de estresse. A exposição a estresses
45 subletais (calor a 42°C, frio a 4°C e a 20°C e pH ácido) aumenta a capacidade de formar
46 biofilme de algumas cepas.

47 48 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

49 American Public Health Association- APHA. 2005. Standard methods for the examination of
50 water and wastewater. 21th ed. APHA/ AWWA/ WEF, Washington. 1268p.

51
52 Archer R.M.B. & Moretto E. 1994. Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* em Mexilhões
53 (*Perna perna*, Linnaeus, 1758) de Banco Natural do Litoral do Município de Palhoça, Santa
54 Catarina, Brasil. Cad. Saúde Pública 10(3):379-386.

- 1 Austin B. 2009. *Vibriosis* as causal agents of zoonoses. *Vet Microbiol* 140:310-317.
- 2
- 3 Baldisserotto B. 2009. Piscicultura continental no Rio Grande do Sul: situação atual,
4 problemas e perspectivas para o futuro. *Ciênc. Rural* 39(1):291-299.
- 5
- 6 Baumann P., Schubert R.H.W. 1984. Family II: Vibrionaceae, p.516-550. In: Krieg N. R.;
7 Holt J.G. (Eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams & Wilkins Co.,
8 Baltimore LON.
- 9
- 10 Bilung M.L., Radu S., Bahaman A.R., Rahim R.A. & Napis S. 2005. Random amplified
11 polymorphic DNA-PCR typing of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from local cockles
12 (*Anadara granosa*). *American Journal of Immunology*, 1:31-36.
- 13
- 14 Butt A.A., Aldridge K.E. & Sandres C.V. 2004. Infections related to the ingestion of seafood
15 Part I: viral and bacterial infections. *Lancet Infect Dis*, 4(4):201-212.
- 16
- 17 Caixeta D.S. 2008. Sanificantes químicos no controle de biofilmes formados por duas
18 espécies de *Pseudomonas* em superfície de aço inoxidável. Dissertação de Mestrado em
19 Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 75p.
- 20
- 21 Calliari L.J. 1998. O ambiente e a biota do Estuário da Lagoa dos Patos, p.13-18. In:
22 Seeliger U., Odebrecht C., Castello J.P. (Eds.), *Os Ecossistemas Costeiro e Marinho do*
23 *Extremo Sul do Brasil*. Ecocientia, Rio Grande RS.
- 24
- 25 Castro-Rosas J. & Escartín E.F. 2002. Adhesion and colonization of *V. cholerae* O1 on
26 shrimp and crab carapace. *J Food Protect*, 65:492-498.
- 27
- 28 Chang C.M., Chiang M.L. & Chou C.C. 2004. Responses of heat-shocked *Vibrio*
29 *parahaemolyticus* to subsequent physical and chemical stresses. *J Food Protect*, 67:2183-
30 2188.
- 31
- 32 DiRita, V. J. 1992. Co-ordinate expression of virulence genes by *ToxR* in *Vibrio cholerae*.
33 *Mol. Microbiol.* 6:451-458.
- 34
- 35 Donlan R.M. & Costerton J.M. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant
36 microorganisms. *Clin Microbiol Rev*, 15:167-193.
- 37
- 38 Elexson N., Yaya R., Nor A.M., Kantilal H.K., Ubong A., Yoshitsugu N., Nishibuchi M. & Son
39 R. 2014. Biofilm assessment of *Vibrio parahaemolyticus* from seafood using Random
40 Amplified Polymorphism DNA-PCR. *Int Food Res J*, 21(1):59-65.
- 41
- 42 Embrapa Clima Temperado. Dados meteorológicos de Pelotas em tempo real. Disponível
43 em <http://agromet.cpact.embrapa.br/online/Current_Monitor.htm> Acesso em 18 jan. 2016.
- 44
- 45 Flach J., Karnopp C. & Corção G. 2005. Biofilmes formados em matéria- prima em contato
46 com leite: fatores de virulência envolvidos. *Acta Scientiae Veterinariae*, 33(3):291-296.
- 47
- 48 Gaspar J., Vieira R. & Tapia M. 1997. Aspectos sanitários do pescado de origem de água
49 doce e marinha, comercializado na feira de Gentilândia, Fortaleza, Ceará. *Ciênc Tecnol de*
50 *Aliment*, 11:20-28.
- 51
- 52 Gil, A. I.; Miranda, H.; Lanata, C. F.; Prada, A.; Hall, E. R.; Barreno, C. M.; Nusrin, S.;
53 Bhuiyan, N. A.; Sack, D. A.; Nair, G. B. 2007. O3:K6 Serotype of *Vibrio parahaemolyticus*
54 identical to the global pandemic clone associated with diarrhea in Peru. *ISID*, v. 11:324-328.
- 55

- 1 International Commission on Microbiological Specifications for Foods-ICMSF. 1978. *Vibrio*
2 *parahaemolyticus*, p.201-207, 287-350. In: ICMSF. Micro-organisms in food 1: Their
3 significance and methods of enumerations. 2th ed. University of Toronto Press, Toronto.
4
- 5 Janssens J.C.A., Steenackers H., Robijns S., Gellens E., Levin J., Zhao H., Hermans
6 K., Coster D., Verhoeven T.L., Marchal K., Vanderleyden J., De Vos D.E. & De
7 Keersmaecker S.C.J. 2008. Brominated Furanones Inhibit Biofilm Formation by *Salmonella*
8 *enterica* Serovar Typhimurium. Appl Environ Microbiol 74(21):6639–6648.
9
- 10 JAY, J. M. 2005. Microbiologia de alimentos. 6th ed. Artmed, Porto Alegre. 711 p.
11
- 12 Karunasagar I., Otta S.K. & Karunasagar I. 1996. Biofilm formation by *Vibrio harveyi* on
13 surfaces. Aquaculture, 140:241-245.
14
- 15 Kaysner C.A. & Depaola Jr. *Vibrio*. 2004. U.S. Food and Drug Administration, Bacteriological
16 Analytical Manual- BAM. Disponível em
17 <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm070830.htm>> Acesso em 18 out. 2015.
18
19
- 20 Kim Y.B., Okuda J., Matsumoto C., Takahashi N., Hashimoto S. & Nishibuchi M. 1999.
21 Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the
22 *toxR* gene. J Clin Microbiol, 37(4):1173-1177.
23
- 24 Kudo Y.H., Kumagai S., Konuma H., Miwa N., Masuda T., Ozawa K. & Nishina T. 2013.
25 Decontamination of *Vibrio parahaemolyticus* in Fish by Washing with Hygienic Seawater and
26 Impacts of the High Level Contamination in the Gills and Viscera. J Vet Med Sci,75(5):589-
27 596.
28
- 29 Lee, S.H.; Hava, D.L.; Waldor, M.K.; Camilli, A. Regulation and temporal expression patterns
30 of *Vibrio cholerae* virulence genes during infection. Cell press, v.99, n. 6, p. 625-634, 1999.
31
- 32 Lima C.P.de. 2014. Avaliação da atividade do ácido gálico sobre a formação de biofilme por
33 *Candida albicans*. Trabalho de Conclusão de Curso, Unidade Universitária de Ciências
34 Exatas e Tecnológicas, Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, GO. 52p.
35
- 36 Lin C., Yu R.C. & Chou C.C. 2004. Susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* to various
37 environmental stresses after cold shock treatment. Int J Food Microbiol, 92:207-215.
38
- 39 Lin M.H., Tsai T.Y., Hsieh S.C., Yu R.C. & Chou C.C. 2013. Susceptibility of *Vibrio*
40 *parahaemolyticus* to disinfectants after prior exposure to sublethal stress. Food Microbiol,
41 34:202-206.
42
- 43 Mancilla E.P. Intoxicación por *Vibrio parahaemolyticus*. 2005. Cuadernos médico sociales,
44 45:43-47.
45
- 46 Milan C., Silveira D.R., Rosa J.V. & Timm C.D. 2015. *Vibrio parahaemolyticus* isolados de
47 pescados do estuário da Lagoa dos Patos. Rev Inst Adolfo Lutz, 74(2):149-153.
48
- 49 Ministério da Pesca e Aquicultura- MPA. 2014. Potencial brasileiro. Disponível em
50 <<http://www.mpa.gov.br/aquicultura/potencial-brasileiro>> Acesso em 21 out. 2015.
51
- 52 Morris J.G.Jr. & Black R.E. 1985. Cholera and other vibrioses in the United States. N Engl J
53 Med, 312(6):343-350.
54

- 1 Nascimento, D.L.; Barros, C.N.; Silva, A.D.R.; Guimarães, J.M.; Pedrosa, V.F.; Mendes, E.S.
2 Bactérias potencialmente patogênicas isoladas de beijupirá (*Rachycentron canadum*)
3 cultivadas em sistema *offshore*, 8 (2):12-21, 2014.
4
- 5 Nitschke M. 2006. Biotensoativos como agentes inibidores da adesão de patógenos em
6 superfícies de materiais utilizados na indústria de alimentos. Projeto de Pesquisa, Embrapa
7 Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ. CTAA.
8
- 9 Ordóñez J.A. 2005. Características gerais do pescado, p.219-229. In: Ordóñez J.A. (Org.),
10 Tecnologia de alimentos de origem animal. Artmed, São Paulo.
11
- 12 Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura- FAO. 2014. Comércio
13 global de peixes atinge níveis recordes. Disponível em <<https://www.fao.org.br/cgpanr.asp>>
14 Acesso em 17 out. 2015.
15
- 16 Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura- FAO. 2015. Caminhar
17 para a igualdade de gênero na indústria pesqueira. Disponível em
18 <<https://www.fao.org.br/cpigip.asp>> Acesso em 17 out. 2015.
19
- 20 Reis E.G. 1999. Pesca artesanal na Lagoa dos Patos: História e administração pesqueira,
21 p.81-84. In: Alves F.N. (Org.), Por uma história multidisciplinar do Rio Grande. FURG, Rio
22 Grande.
23
- 24 Rosa J.V., Silva C.J., Barbosa F., Bairros J., Duval E.H., Helbig E. & Timm, C.D. 2016. *Vibrio*
25 *parahaemolyticus* and *Salmonella enterica* isolated from fishes captured from the Lagoa dos
26 Patos estuary. Semina: Ciências Agrárias. no prelo.
27
- 28 Sakazaki R., Iwanami S. & Fukumi H. 1963. Studies on the enteropathogenic, facultatively
29 halophilic bacteria, *Vibrio parahaemolyticus*. I. Morphological, cultural and biochemical
30 properties and its taxonomic position. Jpn J Med Sci Biol, 16:161-188.
31
- 32 Sambrook J. & Russel D.W. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3th ed. Cold
33 Spring Harbor Laboratory Press, Nova York. 999 p.
34
- 35 Silva S.R.C. 2003. Material didático--pedagógico sobre a tainha (*Mugil platanus*)-- pesca e
36 biologia. Monografia do Curso de Especialização em Ecologia Aquática Costeira, Fundação
37 Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS. 45p.
38
- 39 Stepanovic S., Vukovic D., Dakic I., Savic B. & Svabic-Vlahovic M. 2000. A modified
40 microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. J Microbiol
41 Methods, 40:175-179.
42
- 43 Su Y.C. & Liu C. 2007. *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety. Food
44 Microbiol, 24:549-558.
45
- 46 Sutherland I.W. 2001. The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial
47 environment. Trends Microbiol, 9(5):222-227.
48 Urnersbach S., Aho T., Alter T., Hassan S.S., Autio R. & Huehn S. 2015. Changes in global
49 gene expression of *Vibrio parahaemolyticus* induced by cold- and heat-stress. BMC
50 Microbiol, 15(1): 229-241.
51
- 52 Wong H.C., Peng P.Y., Han J.M., Chang, C.Y. & Lan S.L. 1998. Effect of mild acid
53 treatment on the survival, enteropathogenicity, and protein production in *Vibrio*
54 *parahaemolyticus*. Infect and Immun, 66(7):3066-3071.
55

- 1 Quadro 1: *Primers* utilizados na identificação de *V. parahaemolyticus* isolados de pescados (*M.*
2 *platanus*, *M. furnieri* e *P. orbignyana*) capturados no estuário da Lagoa dos Patos.
3
- 4 Quadro 2: Ocorrência de *V. parahaemolyticus* em pescados capturados no estuário da Lagoa
5 dos Patos e temperatura do ambiente, pH e salinidade da água.
6
- 7 Quadro 3: Classificação de *V. parahaemolyticus* isolados de pescados quanto à capacidade de
8 formar biofilme.
9
- 10 Figura 1: Alterações na capacidade de formação de biofilme por *V. parahaemolyticus* isolados
11 de pescados após as cepas serem submetidas a diferentes tipos de estresse subletal.

Quadro 1: *Primers* utilizados na identificação de *V. parahaemolyticus* isolados de pescados (*M. platanus*, *M. furnieri* e *P. orbignyana*) capturados no estuário da Lagoa dos Patos.

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

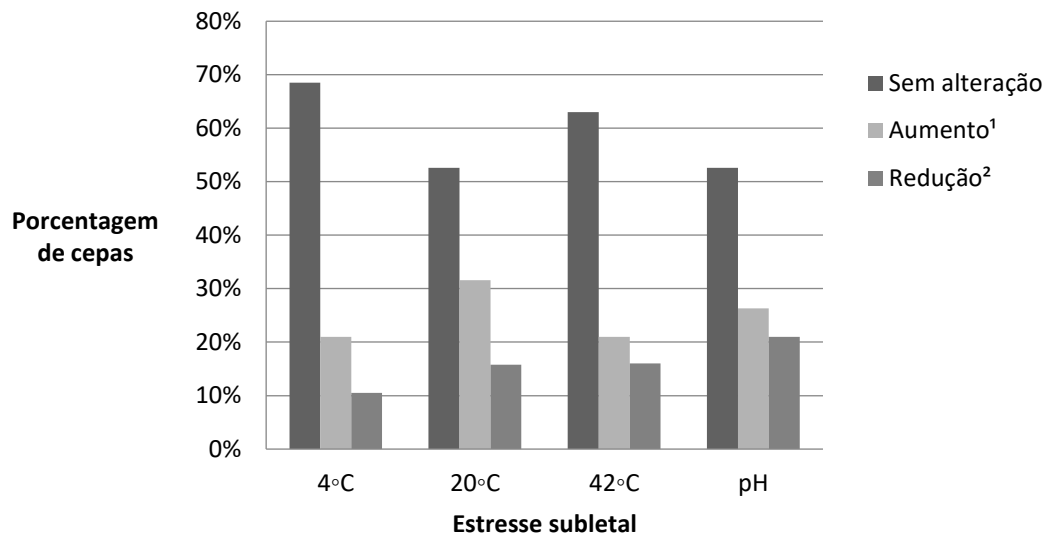
Quadro 2: Ocorrência de *V. parahaemolyticus* em pescados capturados no estuário da Lagoa dos Patos e temperatura do ambiente, pH e salinidade da água.

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.</i> <i>orbignyianus</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.</i> <i>orbignyianus</i>	0
					10	<i>M. platanus</i>	4
11	Agosto	2	18,1	7	10	<i>P.</i> <i>orbignyianus</i>	0
					10	<i>P.</i> <i>orbignyianus</i>	0
12	Setembro	5	16,5	7	10	<i>P.</i> <i>orbignyianus</i>	0

*Média mensal (Embrapa clima temperado, 2016)

Quadro 3: Classificação de *V. 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. orbignyana</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

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.

2.2 Artigo 2

Formação de biofilme após estresse subletal por *Vibrio parahaemolyticus* isolados de camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*)

Janaina Viana da Rosa, Natália Volpato da Conceição, Izadora A. Perez, Cláudio Dias Timm

Publicado na revista Ciência Animal Brasileira, v.18, 2017

FORMAÇÃO DE BIOFILME APÓS ESTRESSE SUBLETAL POR *Vibrio parahaemolyticus* ISOLADOS DE CAMARÃO ROSA (*Farfantepenaeus paulensis*)

RESUMO

O consumo de frutos do mar, como o camarão rosa, contaminados com *V. parahaemolyticus* pode causar gastroenterite aguda. O objetivo do trabalho foi verificar a capacidade de *V. parahaemolyticus* isolados de camarões provenientes do estuário da Lagoa dos Patos formarem biofilme após exposição a diferentes tipos de estresse subletal. Para obtenção das amostras, foram realizadas 12 coletas de *Farfantepenaeus paulensis*, durante o período de safra de 2016, as quais foram analisadas quanto à presença de *V. parahaemolyticus*. As cepas foram avaliadas quanto à capacidade de produção de biofilme em placas de microtitulação, tanto antes como após serem submetidas a diferentes tipos de estresse subletal. *V. parahaemolyticus* foi isolado de 16,66% (2/12) das amostras. Uma das duas cepas isoladas foi capaz de formar biofilme, sendo classificada como fraca formadora de biofilme, a outra foi classificada como não formadora de biofilme. Nenhuma das cepas alterou sua capacidade de formar biofilme quando submetida aos estresses de 4°C e 20°C, mas com relação aos estresses de 42°C e pH ácido, cada cepa respondeu de uma maneira diferente.

Palavras-chave: Camarão-rosa; Contaminação; Doenças transmitidas por alimentos.

FORMATION OF BIOFILM AFTER SUBLETAL STRESS BY *Vibrio parahaemolyticus* ISOLATES OF PINK SHRIMP (*Farfantepenaeus paulensis*)

ABSTRACT

Consumption of seafood, such as pink shrimp, contaminated with *V. parahaemolyticus* can cause acute gastroenteritis. The objective was to verify the ability of *V. parahaemolyticus* shrimp isolated from the Lagoa dos Patos estuary form biofilm after exposure to different types of sublethal stress. To obtain the samples, there were 12 collections *Farfantepenaeus paulensis* during the 2016 harvest period, which were analyzed for the presence of *V. parahaemolyticus*. The strains were evaluated for biofilm production capacity in microtiter plates, both before and after being submitted to different types of sublethal stress. *V. parahaemolyticus* was isolated from 16.66% (2/12) of the samples. One of the two isolated strains was able to form biofilm, being classified as weak biofilm forming, the other was classified as non-biofilm forming. None of the strains altered their ability to form biofilm when subjected to the stresses of 4°C and 20°C, but with regard to the stresses of 42°C and pH acid, each strain responded differently.

Key words: Pink shrimp; Contamination; Foodborne illness.

INTRODUÇÃO

No Brasil, o consumo de pescado tem aumentado, alcançando o patamar de 14,5kg/habitante/ano em 2013, sendo que o consumo mínimo recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) foi de 12kg/habitante/ano e o consumo mundial de 18,8Kg/habitante/ano, também no ano de 2013¹. Um dos fatores que contribui para esse aumento no consumo do pescado é a preocupação com a alimentação saudável e a qualidade de vida. As características nutricionais dos camarões fazem deles um alimento privilegiado, pois são fontes de proteínas e ainda contém cálcio, ferro, iodo, zinco e vitaminas B1, B2 e B12. Embora contenha altos níveis de colesterol, um consumo moderado não oferece riscos

para a saúde cardiovascular². *Farfantepenaeus paulensis* (camarão-rosa) é encontrado ao longo da região costeira brasileira, a partir de Ilhéus, Bahia, estendendo-se pelo Uruguai até o litoral nordeste da Argentina³.

A Lagoa dos Patos, no Rio Grande do Sul (RS), possui uma comunicação estuário-oceano que é influenciada por fatores meteorológicos, os quais interferem na entrada de água marinha⁴. Devido a este fator, o período de safra do camarão no estuário ocorre durante o verão e início de outono. Para garantir a qualidade desses alimentos, é necessário o correto manuseio durante a sua captura, processamento, armazenamento, transporte e comercialização. Segundo Baldisserotto⁵, faltam estudos sobre a qualidade do pescado continental vendido ao consumidor no Rio Grande do Sul e sobre a ocorrência de agentes etiológicos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) 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.

Vibrio spp. são bactérias Gram negativas, que possuem formato de bastonete e são móveis, contendo geralmente um único flagelo polar. São encontrados naturalmente em ambientes marinhos ou estuarinos, podendo estar livres ou ligados a sedimentos⁶. *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* são as espécies melhor documentadas como patógenos humanos⁷. *V. parahaemolyticus* é mais facilmente encontrado em locais com temperatura da água superior a 15°C⁸. Essa espécie de micro-organismo é halofílica, podendo ser encontrada em ambientes com salinidade entre 3% e 8%. 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. Em casos raros, a infecção por *V. parahaemolyticus* pode ser fatal⁷. O gene *ToxR* está presente em todas as cepas de *V. parahaemolyticus*^{9,10,11}, podendo ser encontrado em isolados patogênicos ou não patogênicos¹², este gene possui um fragmento de 368 pares de base (pdb) específico para *Vibrio parahaemolyticus* que é encontrado em todos os isolados¹³. O uso deste gene para identificação de *V. parahaemolyticus* através da reação em cadeia da polimerase (PCR) é específico, sensível e rápido^{9,13,14}, pois *V. parahaemolyticus* além de ser detectado em todas as amostras analisadas, não ocorrem resultados falsos positivos^{10,15}.

Biofilme bacteriano é uma comunidade de micro-organismos sésseis que são capazes de se agregar e aderir em uma superfície, embebidos em uma matriz extracelular formada por exopolissacarídeos¹⁶. Algumas células de *Vibrio* podem se tornar resistentes a fatores

ecológicos, tais como altas ou baixas temperaturas ou pH baixo. Tanto essa resistência pode levar ao aumento da capacidade de formar biofilme, como também a alta capacidade de formar biofilme pode levar à resistência a diferentes tipos de estresse, dificultando a eliminação da bactéria durante a preparação dos pescados para o consumo¹⁷.

O objetivo do trabalho foi verificar a capacidade de *V. parahaemolyticus* isolados de camarões provenientes do estuário da Lagoa dos Patos formarem biofilme após exposição a diferentes tipos de estresse subletal.

METODOLOGIA

Para obtenção das amostras, foram realizadas 12 coletas de *F. paulensis* no mercado público da cidade de Pelotas, RS, durante o período de safra, nos meses de fevereiro a abril de 2016. Todos os camarões eram provenientes do estuário da Lagoa dos Patos. As amostras foram colocadas em saco estéril e imediatamente encaminhadas em caixas isotérmicas com gelo ao laboratório para análise.

A pesquisa de *Vibrio* spp. foi feita conforme recomendado por U. S. Food and Drug Administration– FDA⁷, com modificações. Foram colocados 25g de *F. paulensis* em sacos plásticos estéreis contendo 225 mL de Água Peptonada Alcalina (Himedia, Mumbai, Índia), pH 8,5, com 3% de NaCl (APA-3% NaCl), homogeneizados por 5 minutos e incubados a 37°C por 24 horas para enriquecimento. A partir do material da superfície dessas culturas foram feitas sementeiras por esgotamento em ágar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose (TCBS, Himedia) e incubação a 37°C por 24 horas para obtenção de colônias isoladas. Até três colônias típicas de cada placa foram sementeiras em APA-3% NaCl e, após incubação a 37°C por 24 horas, a cultura foi misturada 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, a cada três meses para manutenção do estoque ou quando necessário.

Os isolados foram recuperados e seus DNAs extraídos conforme Sambrook e Russel¹⁸. Resumidamente, o *pellet* obtido por centrifugação de 1 mL de cultura previamente recuperada por 24 horas a 37 °C em APA-3% NaCl, foi ressuspensionado em 100 µL de tampão STES [Tris-HCl 0,2 M, SDS 0,1% (m/v), EDTA 0,01 M, pH 7,6], e 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 (100 µL) foi coletado e precipitado em 200 µL de etanol absoluto e 10 µL de NaCl 5 M a -70°C por 30 min. Uma

nova centrifugação foi realizada a 13.000 g por 20 min, o sobrenadante descartado e o *pellet* lavado com etanol a 70%. Após eluição em 40 µL de tampão de eluição (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM, pH 7,4), foi adicionado 1 µL de RNase (10 µg/µL). O DNA extraído foi estocado a -70°C.

Os isolados de *Vibrio* foram analisados pela PCR para pesquisa dos genes *toxR* (Tabela 1), para identificação de *V. parahaemolyticus* conforme Bilung et al.¹⁹, com modificações. Cada reação teve um volume final de 20 µL. Foram utilizados 10 µL de Master Mix (Promega, Madison, EUA), 1 µL (10 pmol) de cada *primer* (Sigma- Aldrich, São Paulo, Brasil) , 1,2 µL de DNA e 6,8 µL de água (Promega) para completar o volume da reação. A amplificação foi realizada em termociclador TC-3000 (Techne, Stone, Reino Unido) 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.

Tabela 1. *Primers* utilizados na identificação de *V. parahaemolyticus*.

<i>Primer</i>	Sequência (5' a 3')	Tamanho da amplificação (pb)	Referência
<i>ToxR-a</i>	GTCTTCTGACGCAATCGTTG	368	KIM et al. ⁹
<i>ToxR-b</i>	ATACGAGTGGTTGCTGTCATG		

As cepas foram avaliadas quanto à capacidade de produção de biofilme em placas de microtitulação de 96 poços (Nunclon, Nune, Roskilde, Denmark), seguindo a técnica descrita por Janssens et al.²⁰, 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 padronizada em espectrofotômetro a 600 nm para valor 0,5 de densidade ótica (DO), o que corresponde a aproximadamente 5,5.10⁶ UFC/mL. 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 48 horas a 37°C sem agitação. As tampas das placas possuem protuberâncias em forma de cone, cada uma delas entrando em contato unicamente com um poço. Como as protuberâncias estão em contato com o líquido contido em cada poço,

as bactérias irão se aderir e os biofilmes serão formados sobre elas. O biofilme avaliado foi apenas o formado nas protuberâncias da tampa. Após, 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 (200 µL) e a tampa foi seca em temperatura ambiente por 30 min. O biofilme com corante foi extraído com ácido acético glacial 30% (200 µL) utilizando outra placa de 96 poços. Para quantificação da formação de biofilmes, a DO₅₇₀ de cada poço contendo o biofilme com corante e já extraído foi medida utilizando leitor de placas de microtitulação. Foram realizadas três repetições de cada teste. A análise da variância foi realizada com o programa STATISTIX[®] (2003), considerando valor do nível de significância de P<0,05. Cada cepa foi classificada como não formadora de biofilme, fraca formadora, moderada formadora ou forte formadora, de acordo com os procedimentos sugeridos por Stepanovic et al.²¹. O ponto de corte (DOc) foi definido como três desvios padrões acima da média das DOs dos controles. A classificação foi determinada conforme segue.

$DO \leq DOc$ = 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

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.²². Para exposição ao choque de frio, culturas *overnight* em APA-3% NaCl foram mantidas a 20°C durante 4 horas, de acordo com Lin et al.²³. As células também foram estressadas a 4°C durante 4 horas. Os procedimentos descritos por Wong et al.²⁴ 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 12N e foram incubadas a 37°C durante 30 min.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

V. parahaemolyticus foi isolado de 16,66% (2/12) das amostras. Este é o segundo registro da ocorrência de *V. parahaemolyticus* em *F. paulensis* oriundo do estuário da Lagoa dos Patos. Milan et al.²⁵ encontraram o micro-organismo em 46,15% (6/13) das amostras que analisaram. Mesmo o pequeno número de amostras utilizados nesses dois estudos já foi

suficiente para demonstrar que *V. parahaemolyticus* está presente nos camarões capturados no estuário da Lagoa dos Patos, salientando a possibilidade do micro-organismo chegar à mesa do consumidor, devido ao alto consumo na região deste tipo de crustáceo durante o período de safra.

Uma das duas cepas isoladas foi capaz de formar biofilme, sendo classificada como fraca formadora de biofilme. A análise de variância demonstrou não haver efeito estatístico das repetições sobre os valores de DO. De acordo com Donlan e Costerton¹⁶, *V. parahaemolyticus* é capaz de produzir diferentes tipos de fatores de adesão, como pili e flagelo, que permitem às bactérias se aderirem à superfície e iniciar a formação de biofilme. A formação de biofilme por cepa de *V. parahaemolyticus* isolada de *F. paulensis* ressalta os cuidados que devem ser adotados na indústria de pescados com relação à sanitização e higienização dos materiais e equipamentos utilizados na manipulação do alimento, já que após a formação do biofilme sua eliminação é dificultada pois as bactérias passam a apresentar reduzidas taxas metabólicas e de crescimento, além disso a matriz de polímeros extracelulares passa a agir como um adsorvente e ainda essa mesma matriz pode reduzir a penetração de sanitizantes²⁶.

Após as cepas serem submetidas aos diferentes tipos de estresse subletais, não houve mudança na categoria da cepa, segundo Stepanovic et al.²¹, na formação de biofilmes quando as células foram estressadas a 4°C e 20°C. Já a 42°C e pH ácido, cada cepa respondeu de uma maneira diferente. A cepa que era inicialmente não formadora de biofilme passou a ser fraca formadora em ambos os casos e a cepa que era fraca formadora, perdeu a capacidade de formar biofilme após esses dois tipos de estresse. Mizan et al.²⁷ relataram que *V. parahaemolyticus* pode formar biofilme em placas de microtitulação devido a diferentes condições de estresse, como a temperatura, que pode influenciar a produção de polímeros extracelulares, os quais podem aumentar a formação biofilme. Desvios de pH para valores inferiores ou superiores a 7 irão influenciar o desenvolvimento e atividade da comunidade microbiana, pois o pH tem um efeito preponderante no metabolismo dos micro-organismos²⁸, influenciando a ação dos desinfetantes ou mesmo podendo causar o aumento dos biofilmes²⁹. Em trabalho realizado por Lin et al.³⁰, células de *V. parahaemolyticus* foram expostas a tensões subletais como calor a 42°C e pH ácido para depois analisar sua resistência a sanitizantes e verificaram que esses fatores estressantes aumentaram a resistência de *V. parahaemolyticus* aos produtos utilizados.

Dentro da indústria de alimentos podem ser utilizados diferentes métodos de limpeza, como também diferentes desinfetantes e a eficácia dos desinfetantes depende essencialmente de fatores como temperatura e pH. De uma forma geral os desinfetantes atuam melhor a temperaturas acima da temperatura ambiente e cada desinfetante tem uma gama de valores de pH onde é mais eficaz³¹. No nosso estudo, foi possível observar que alguns tipos de estresse influenciam a formação de biofilme, seja favorecendo ou inibindo a sua formação, o que depende da cepa e do tipo de estresse pelo qual passou. Sendo assim, dentro da indústria alimentícia, a exposição a estresses subletais pode afetar a formação de biofilme e ocasionar dificuldades na remoção dos micro-organismos, os quais passam a ser uma potencial fonte de contaminação para os alimentos produzidos.

CONCLUSÃO

Camarões da espécie *F. paulensis* são hospedeiros de *V. parahaemolyticus* e estes podem ser formadores de biofilme, o que poderia dificultar a eliminação desses micro-organismos quando presentes em uma indústria de alimentos. Os dois isolados apresentaram comportamento distinto quando expostos a estresses subletais (calor a 42°C, frio a 4°C e a 20°C e pH ácido). Esses resultados demonstram que algumas condições às quais o alimento é submetido podem induzir ao aumento da capacidade de formar biofilme, que é porém, cepa dependente.

REFERÊNCIAS

1. Ministério da Pesca e Aquicultura- MPA. Potencial brasileiro [periódico na Internet]. 2014. [citado 2016 Out 21]. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/aquicultura/potencial-brasileiro>>.
2. Huss HH, Reilly A, Embrakeb PKB. Prevention and control of hazard in seafood. Food Control. 2000; 11:149-156.
3. Krummenauer D, Júnior W, Cavalli R, Peixoto S, Zogbi P. Viabilidade do cultivo do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* (Crustácea, Decapoda) em gaiolas sob diferentes densidades durante o outono no sul do Brasil. Ciência Rural. 2006; 36(1):252-257.
4. Möller O, Fernandes E. Hidrologia e hidrodinâmica. In: Seeliger U, Odebrecht C, editores. O estuário da Lagoa dos Patos: um século de transformações. Rio Grande: FURG; 2010. p. 17-27. Português.

5. Baldisserotto B. Piscicultura continental no Rio Grande do Sul: situação atual, problemas e perspectivas para o futuro. *Ciência Rural*.2009; 39(1):291-299.
6. Baumann P, Schubert RHW. Family II: Vibrionaceae. In: Krieg NR, Holt JG, editores. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore LON: Williams & Wilkins Co.; 1984. p. 516-550. Inglês.
7. Kaysner CA, Depaola Jr. *Vibrio*. U.S. Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual- BAM [periódico na Internet]. 2004 [acessado 2016 Out 19]. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm070830.htm>>.
8. Su YC, Liu C. *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety. *Food Microbiology*.2007; 24:549-58.
9. Kim YB, Okuda J, Matsumoto C, Takahashi N, Hashimoto S, Nishibuchi M. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene. *Journal of Clinical Microbiology*.1999; 37(4):1173-1177.
10. Dileep V, Kumar HS, Kumar Y, Nishibuchi M, Karunasagar I, Karunasagar I. Application of polymerase chain reaction for detection of *Vibrio parahaemolyticus* associated with tropical seafoods and coastal environment. *Letters in Applied Microbiology*. 2003; 36: 423-427.
11. Sujeewa AKW, Norrakiah AS, Laina M. Prevalence of toxic genes of *Vibrio parahaemolyticus* in shrimps (*Penaeus monodon*) and culture environment. *International Food Research Journal*. 2009; 16:89-95.
12. Sechi LA, Dupre I, Deriu A, Fadda G, Zanetti S.. Distribution of *Vibrio cholerae* virulence genes among different *Vibrio* species isolated in Sardinia, Italy. *Journal of Applied Microbiology*. 2000; 88: 475-481.
13. Zulkifli Y, Alitheen NB, Son R, Yeap SK, Lesley MB, Raha AR. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* isolates by PCR targeted to the *toxR* gene and detection of virulence genes. *International Food Research Journal*. 2009; 16: 289-296.
14. Sheng X, Ting YP, Pehkonen SO. Force measurements of bacterial adhesion on metals using a cell probe atomic force microscope. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2007; 310:661-669.
15. Croci L, Suffredin E, Cozz L, Tot L, Ottavian D, Pruzz C, Serrator P, Fischett R, Goffred E, Loffred G, Mioni R. Comparison of different biochemical and molecular methods for the identification of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal Applied Microbiology*. 2007; 102:229-237.
16. Donlan RM, Costerton JM. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002; 15:167-193.

17. Castro-Rosas J, Escartín EF. Adhesion and colonization of *V. cholerae* O1 on shrimp and crab carapace. *Journal of Food Protection*.2002; 65:492-498.
18. Sambrook J, Russel DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3.ed. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001. 999p. Inglês.
19. Bilung ML, Radu S, Bahaman AR, Rahim RA, Napis S. Random amplified polymorphic DNA-PCR typing of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from local cockles (*Anadara granosa*). *American Journal of Immunology*.2005; 1:31-36.
20. Janssens JCA, Steenackers H, Robijns S, Gellens E, Levin J, Zhao H, Hermans K, Coster D, Verhoeven TL, Marchal K, Vanderleyden J, DeVos DE, DeKeersmaecker SCJ. Brominated furanones inhibit biofilm formation by *Salmonella enterica* SerovarTyphimurium. *Applied Environmental Microbiology*.2008; 74(21):6639–6648.
21. 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*.2000; 40:175-179.
22. Chang CM, Chiang ML, Chou CC. Responses of heat-shocked *Vibrio parahaemolyticus* to subsequent physical and chemical stresses. *Journal of Food Protection*.2004; 67:2183-2188.
23. Lin C, Yu RC, Chou CC. Susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* to various environmental stresses after cold shock treatment. *International Journal of Food Microbiology*. 2004; 92:207-215.
24. Wong HC, Peng PY, Han JM, Chang CY, Lan SL. Effect of mild acid treatment on the survival, enteropathogenicity, and protein production in *Vibrio parahaemolyticus*. *Infection and Immunity*.1998; 66(7):3066-3071.
25. Milan C,Silveira DR, Rosa JV, Timm CD. *Vibrio parahaemolyticus* isolados de pescados do estuário da Lagoa dos Patos. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*. 2015; 74(2):149-153.
26. Gilbert P, Allison DG, Mcbain AJ. Biofilms in vitro and in vivo: do singular mechanisms imply cross-resistance? *Journal of Applied Microbiology*. 2002; 92:98-110.
27. Mizan MFR, Jahid IK, Kim MH, Lee KH, Kim TJ, Ha SD. Variability of biofilm formation correlates with hydrophobicity and quorum sensing among *Vibrio parahaemolyticus* isolates from food contact surfaces and distribution of genes involved in biofilm formation. *Biofouling*. 2016; 32(4):497-509.
28. Bott, TR. 1995. *Fouling of heat exchangers*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier science B. V. 546p.

29. Environmental Protection Agency, EPA. Health risks from microbial growth and biofilms in drinking water distribution systems environmental protection agency. Pennsylvania, 2002.
30. Lin, MH, Tsai TY, Hsieh SC, Yu RC, Chou CC. Susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* to disinfectants after prior exposure to sublethal stress. *FoodMicrobiology*.2013; 34:202-206.
31. Wirtanen G. Biofilm formation and its elimination from food processing equipament. VTT publications 251; 1995.

2.3 Artigo 3

Formação de biofilme por *Vibrio parahaemolyticus* em diferentes superfícies e resistência ao hipoclorito de sódio

Janaina Viana da Rosa, Natália Volpato da Conceição, Rita de Cássia dos Santos da Conceição, Cláudio Dias Timm

Será submetido à revista Ciência Rural

1 **Formação de biofilme por *Vibrio parahaemolyticus* em diferentes superfícies e resistência**
2 **ao hipoclorito de sódio**

3 **Formation of biofilme by *Vibrio parahaemolyticus* in different surfaces and resistance to**
4 **sodium hypochlorite**

5
6 **Janaina Viana da Rosa^{1*}; Natália Volpato da Conceição¹; Rita de Cássia dos Santos da**
7 **Conceição¹; Cláudio Dias Timm¹**

8
9 **RESUMO**

10 *Vibrio parahaemolyticus* é uma bactéria patogênica importante tanto para a indústria
11 como para os consumidores de pescados, uma vez que pode formar biofilme, dificultando a
12 sua eliminação por sanitizantes. Este estudo teve como objetivo verificar a formação de
13 biofilme em diferentes superfícies e o efeito do biofilme sobre a resistência a sanitizante. Oito
14 isolados de *V. parahaemolyticus* formadores de biofilme foram testados quanto à capacidade
15 de formar biofilme em superfícies de polietileno de alta densidade, aço inoxidável, vidro,
16 exoesqueleto de *Farfantepenaeus paulensis* (Camarão-rosa) e opérculo de *Micropogonias*
17 *furnieri* (Corvina). A eficiência do sanitizante hipoclorito de sódio foi avaliada frente às
18 bactérias nos biofilmes formados sobre a superfície dos materiais utilizados. Das oito cepas
19 analisadas, cinco foram consideradas formadoras de biofilme em diferentes superfícies. Os
20 resultados mostraram variação entre as superfícies, sendo que mais de uma cepa formou
21 biofilme na superfície do opérculo de *M. furnieri* e do polietileno de alta densidade. Um

¹Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, Brasil.

^{1*}Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), 96010-900, Campus Capão do Leão, prédio 34, Pelotas, RS, Brasil. E-mail: janavrosa@yahoo.com.br. Autor para correspondência.

1 isolado formou biofilme em vidro e um em aço inoxidável. Nenhum isolado formou biofilme
2 na carapaça de camarão. O sanitizante reduziu a formação do biofilme em todas as
3 superfícies. Conclui-se que os isolados de *V. parahaemolyticus* apresentam distinta
4 capacidade de formar biofilme em diferentes superfícies e que o hipoclorito de sódio na
5 concentração de 20 partes por milhão (20 ppm) de Cl₂, embora não elimine as bactérias que se
6 encontram em biofilme, reduz a sua população.

7 **Palavras-chave:** Vidro; Opérculo; Polietileno de alta densidade; Aço inoxidável; Sanitizante.

8 **ABSTRACT**

9 *Vibrio parahaemolyticus* is an important pathogenic bacterium for both industry and
10 fish consumers, since it can form biofilm, preventing its elimination by sanitizers. This study
11 aimed to verify the formation of biofilm on different surfaces and the effect of biofilm on
12 resistance to sanitizing. Eight isolates of *V. parahaemolyticus* able to form biofilm were
13 tested for the capacity of forming biofilm on high density polyethylene, stainless steel, glass,
14 exoskeleton of *Farfantepenaeus paulensis* (Pink shrimp) and operculum of *Micropogonias*
15 *furnieri* (Corvina). The sanitizer sodium hypochlorite efficiency was evaluated against the
16 bacteria in the biofilms formed on the surface of the materials used. Among the eight isolates
17 analyzed, five were considered to form biofilm on different surfaces. The results showed
18 variation between the surfaces, with more than one isolate forming a biofilm on the surface of
19 the *M. furnieri* operculum and high density polyethylene. One strain formed biofilm in glass
20 and one in stainless steel. None isolate formed biofilm in the shrimp shells. The sanitizer
21 reduced biofilm formation on all surfaces. It is concluded that the *V. parahaemolyticus*
22 strains have different capacity to form biofilm on different surfaces and that sodium
23 hypochlorite at a concentration of 20 parts per million (20 ppm) of Cl₂, although it does not
24 eliminate the bacteria found in biofilm, reduces its population.

25 **Key words:** Glass; Operculum; High density polyethylene; Stainless steel; Sanitizer.

1 INTRODUÇÃO

2 Os pescados são alimentos com alto valor nutritivo, compostos por proteínas, lipídios
3 insaturados, vitaminas e minerais (KIRSCHNIK, 2007). Entretanto, a sua microbiota está
4 intimamente ligada à microbiota da água onde vivem, tornando o pescado suscetível à
5 contaminação por diversos micro-organismos (JAY, 2005), dentre os quais algumas espécies
6 do gênero *Vibrio*.

7 As bactérias do gênero *Vibrio* spp. representam uma proporção significativa de
8 infecções humanas causadas pelo consumo de crustáceos crus ou mal cozidos (THOMPSON,
9 2004). Existem três espécies que são patógenos humanos, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* e
10 *V. vulnificus*. *V. parahaemolyticus* é uma bactéria halofílica, encontrada principalmente
11 durante o verão em águas costeiras e estuarinas (HEITMANN et al., 2005; OLIVER &
12 KAPER, 2001).

13 *V. parahaemolyticus* pode ser encontrado em estado planctônico ou sésil, ou seja,
14 dentro de uma comunidade microbiana, formando biofilme (MCCARTER, 1999). Biofilme
15 microbiano trata-se de uma associação de células bacterianas que se fixam em superfícies
16 bióticas ou abióticas e estas células estão envoltas por uma complexa matriz extracelular
17 (LUCCHESI, 2006).

18 Em diversos trabalhos são citadas a capacidade de formação de biofilme por várias
19 bactérias em diferentes superfícies, como no trabalho de RIVAS et al. (2007) que avaliaram a
20 capacidade de formação de biofilme de dez diferentes isolados de *E. coli*, em superfícies de
21 aço inoxidável e poliestireno e demonstraram que todos os isolados possuíam a capacidade de
22 se aderir em superfície de aço inoxidável, mas não em poliestireno. Em outro trabalho,
23 realizado por QUATRIN et al. (2015) foi avaliada a formação de biofilme em metal, aço
24 inoxidável, acrílico, vidro, PET, PEAD e teflon por *Pseudomonas aeruginosa* e em todas
25 superfícies houve formação de biofilme pela bactéria, mas em diferentes densidades. Estes

1 trabalhos mostraram que cada isolado de cada espécie bacteriana possui habilidade diferente
2 de formação de biofilme nas diferentes superfícies.

3 Até o presente momento não existem estudos sobre a formação de biofilme por *V.*
4 *parahaemolyticus* em diferentes superfícies e este conhecimento é fundamental, tanto para a
5 indústria como para os consumidores de pescados, já que, segundo FLACH et al. (2015),
6 a organização dos micro-organismos em biofilmes pode fornecer proteção contra desidratação
7 e resistência a sanitizantes. Esta maior resistência se dá pela formação de uma barreira
8 constituída pela matriz de exopolissacarídeos, que previne ou diminui o contato com os
9 agentes antimicrobianos (SREY et al., 2013).

10 A resistência pode ser originada pelo uso de diferentes sanitizantes com semelhantes
11 mecanismos de ação que são muitas vezes aplicados, o que aumenta o risco de resistência,
12 particularmente em biofilmes (BRAOUDAKI & HILTON, 2004) ou até mesmo pode haver
13 transmissão de resistência entre os indivíduos em biofilme (BORGES et al., 2013). Devido a
14 estes fatores, a resistência a sanitizantes por *V. parahaemolyticus* em biofilme deve ser
15 conhecida, já que as superfícies na indústria são passíveis de adesão bacteriana e potenciais
16 fontes de contaminação, caso sobre elas haja formação de biofilmes (ROSSONI &
17 GAYLARDE, 2000). Se os isolados nos biofilmes se tornarem mais resistentes, a
18 concentração de produto ou tempo de contato utilizados durante procedimentos de
19 higienização podem ser insuficientes para eliminar os micro-organismos (ANTONIOU &
20 FRANK, 2005). Assim, este estudo teve como objetivo verificar a formação de biofilme por
21 *V. parahaemolyticus* em diferentes superfícies e o efeito do biofilme sobre a resistência ao
22 hipoclorito de sódio.

23 MATERIAL E MÉTODOS

24 Oito isolados previamente obtidos, um de *Micropogonias furnieri* (Corvina), quatro de
25 *Mugil platanus* (Tainha) e três de *Farfantepenaeus paulensis* (Camarão-rosa), considerados

1 formadores de biofilme por ROSA et al. (2017), foram testados quanto à capacidade de
2 formar biofilme em diferentes superfícies, conforme técnica utilizada por MILAN et al.
3 (2015), com pequenas modificações, de forma a adaptar o método para *V. parahaemolyticus*.
4 Foram utilizados cupons de plástico (polietileno de alta densidade), aço inoxidável e vidro
5 estéreis com superfícies planas de 4 cm². Também foram utilizados cupons de 1 cm² de
6 exoesqueletos de *F. paulensis* e de opérculos de *M. furnieri*, preparados segundo CASTRO-
7 ROSAS & ESCARTÍN (2002). Os exoesqueletos e os opérculos foram removidos
8 manualmente dos pescados, cortados no tamanho adequado, lavados durante 30 segundos,
9 agitados para remover qualquer líquido remanescente e tecidos moles, e armazenados a -20°C
10 até a sua utilização. Os cupons foram colocados dentro de placas de Petri, contendo 100 mL
11 de Água Peptonada Alcalina com 1% de NaCl (APA - 1% NaCl, Himedia, Mumbai, Índia) e
12 2 mL de cultura de cada isolado recuperado *overnight* em APA- 1% NaCl, as placas foram
13 incubadas a 37°C. A cada 48 horas de incubação, as placas foram lavadas suavemente duas
14 vezes com APA - 1% NaCl para remoção de células não aderidas e novamente inseridas em
15 placas de Petri com 100 mL de APA - 1% NaCl, porém sem o inóculo e incubadas a 37°C.
16 Após cinco repetições do procedimento, foram passadas zaragatoas estéreis sobre toda a
17 superfície de cada cupom e transferidas para tubos de ensaio contendo 10 mL de APA - 1%
18 NaCl. A partir desta, foram feitas diluições seriadas para contagem dos micro-organismos em
19 Ágar Padrão para Contagem (PCA - 2% NaCl, Acumedia, Lansing, Michigan, USA). Um
20 isolado considerado não formador de biofilme por ROSA et al. (2017) foi utilizado como
21 controle negativo. Os isolados que apresentaram contagens estatisticamente diferentes das
22 contagens do isolado controle foram considerados formadores de biofilme.

23 A eficiência do sanitizante hipoclorito de sódio (solução contendo 20 ppm de Cl₂) foi
24 avaliada frente às bactérias nos biofilmes formados sobre a superfície dos diferentes materiais
25 utilizados segundo técnica descrita por MILAN et al. (2015), com modificações. O mesmo

1 processo descrito anteriormente foi repetido com os isolados que formaram biofilme e os
2 materiais em que houve formação de biofilme. Após a última lavagem, os cupons com
3 biofilme foram imersos em frascos contendo o sanitizante, onde permaneceram durante 10
4 minutos. Alcançado o tempo de contato estabelecido, os cupons foram imersos em solução
5 neutralizante (0,1 M Na₂S₂O₃) por 30 segundos. Após lavagem com APA, foi passada uma
6 zaragatoa estéril na superfície de cada cupom e realizada contagem em PCA - 2% NaCl.
7 Como controles, biofilmes formados pelos mesmos isolados, antes de entrar em contato com
8 o sanitizante, foram objeto de contagens em PCA - 2% NaCl.

9 Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Para verificar a formação de
10 biofilme em diferentes superfícies e a resistência a sanitizantes, a análise de variância das
11 contagens de *V. parahaemolyticus* foi realizada e os resultados foram avaliados pelo teste de
12 Tukey (P<0,05), usando o Statistix® (2003).

13 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

14 Dos oito isolados analisados, cinco foram considerados formadores de biofilme em
15 diferentes superfícies (Tabela 1).

16 Os resultados mostraram variação entre as superfícies, sendo que mais de um isolado
17 formou biofilme na superfície do opérculo de *M. furnieri* e do polietileno de alta densidade.
18 As superfícies plásticas, com o tempo, podem tornar-se ásperas e ainda com o uso pode haver
19 formação de fendas que por sua vez abrigam resíduos que podem proteger as bactérias e
20 favorecer a formação de biofilmes (SHI & ZHU, 2009), o que ressalta a importância dos
21 nossos resultados encontrados com esse material. HAN et al. (2016), testaram a capacidade de
22 diferentes isolados de *V. parahaemolyticus* formarem biofilme em carapaças de camarão e
23 caranguejo e observaram que os isolados foram capazes de formar biofilme nestas superfícies,
24 o que difere dos resultados obtidos no nosso trabalho, pois nenhum dos isolados testados
25 formou biofilme nas carapaças de camarão. Entretanto, observamos que *V. parahaemolyticus*

1 é capaz de formar biofilme em opérculos, o que pode dificultar a eliminação do micro-
2 organismo da superfície do peixe, tornando-o potencial fonte de contaminação para outros
3 pescados, utensílios e equipamentos, tanto na embarcação quanto na indústria. ABDALLAH
4 et al. (2009) e HAN et al. (2016) observaram que isolados de *V. parahaemolyticus* podem
5 formar biofilme em vidro e aço inoxidável, respectivamente, o que também foi demonstrado
6 nos nossos resultados com alguns isolados nas duas superfícies. Tanto analisando os
7 resultados do nosso estudo, como comparando-os com os resultados obtidos nos trabalhos
8 citados, nota-se que há grande variação entre os isolados quanto à capacidade de formar
9 biofilme em diferentes superfícies. Esta variação pode se dar devido a matriz extracelular, que
10 pode variar até mesmo dentro da mesma espécie bacteriana e como já foi citado
11 anteriormente, é esta matriz que forma os biofilmes, cujos componentes são as próprias
12 células bacterianas, exopolissacarídeos, proteínas, ácidos nucléicos, glicoproteínas,
13 fosfolipídios, detritos e matéria inorgânica (SUTHERLAND, 2001). Os resultados mostraram
14 que não se deve generalizar gênero e espécie desta bactéria, pois a diferença ocorrida entre os
15 isolados de *V. parahaemolyticus* frente a cada superfície demonstra que eles podem
16 apresentar características distintas quanto à capacidade de formar biofilme.

17 Para avaliar a eficiência do sanitizante, as superfícies nas quais os isolados formaram
18 biofilme foram imersas em frascos contendo hipoclorito de sódio. A análise de variância
19 mostrou efeito apenas para o uso do sanitizante, o qual reduziu a população bacteriana no
20 biofilme em todas as superfícies (Figura 1), porém não foi capaz de eliminar o micro-
21 organismo. Este resultado é preocupante, pois a concentração de 20 ppm por 10 minutos de
22 hipoclorito de sódio, utilizada no nosso estudo, é comumente usada nas indústrias de pescado.
23 Para obter a efetiva eliminação de *V. parahaemolyticus* em biofilme seria necessário
24 aumentar o tempo de exposição ou a concentração do sanitizante na solução.

1 BELTRAME (2014) testou a eficiência do hipoclorito de sódio frente a biofilmes
2 bacterianos de *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* formados em cupons de plástico e
3 observou que a concentração de 10 ppm por 10 minutos removeu totalmente as células de *E.*
4 *coli*, mas para *L. monocytogenes* isso somente ocorreu na concentração de 40 ppm. De
5 acordo com os resultados, é possível observar que cada bactéria em biofilme reage de maneira
6 diferente frente aos sanitizantes.

7 CONCLUSÃO

8 *V. parahaemolyticus* é capaz de formar biofilme em superfícies de vidro, polietileno
9 de alta densidade, aço inoxidável e opérculo de *M. furnieri*, sendo que os isolados de *V.*
10 *parahaemolyticus* apresentam distinta capacidade de formar biofilme em diferentes
11 superfícies.

12 O hipoclorito de sódio, na concentração de 20 ppm de Cl₂, reduz a população
13 bacteriana de *V. parahaemolyticus* em biofilme, mas não elimina a bactéria, o que serve de
14 alerta para as indústrias de pescado, as quais devem levar em consideração a possibilidade do
15 micro-organismo formar biofilme, que pode implicar em revisões nos métodos de sanitização.

16 REFERÊNCIAS

17 ABDALLAH, F.B. et al. Adherence assays and slime production of *Vibrio alginolyticus* and
18 *Vibrio parahaemolyticus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, p.394-398, 2009.
19 Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822009000200033)
20 [83822009000200033](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822009000200033)>. Acesso em: 11 dez. 2017. doi: 10.1590/S1517-83822009000200033.
21 ANTONIOU, K.; FRANK, J.F. Removal of *Pseudomonas* putida biofilm and associated
22 extracellular polymeric substances from stainless steel by alkali cleaning. **Journal of Food**
23 **Protection**, v.68, n.2, p. 277-281, 2005. Disponível em:
24 <<http://jfoodprotection.org/doi/pdf/10.4315/0362-028X-68.2.277>>. Acesso em: 11 dez. 2017.
25 doi: 10.4315/0362-028X-68.2.277.

- 1 BELTRAME, C.A. Adesão de *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* em placas de
2 polietileno novas e usadas e remoção com diferentes sanitizantes. 2014. 99f. Tese (Doutorado
3 em Engenharia de Alimentos) - Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Regional
4 Integrada do Alto Uruguai e das Missões.
- 5 BORGES, A. et al. Antibacterial Activity and Mode of Action of Ferulic and Gallic Acids
6 Against Pathogenic Bacteria. **Microbial Drug Resistance**, v.19, n.4, p.256-65, 2013. doi:
7 10.1089/mdr.2012.0244.
- 8 BRAOUDAKI, M.; HILTON, A.C. Adaptive resistance to biocides in *Salmonella enterica*
9 and *Escherichia coli* O157 and cross-resistance to antimicrobial agents. **Journal of Clinical**
10 **Microbiology**, v.42, p.73–78, 2004. Disponível em:
11 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC321691/pdf/0976.pdf>>. Acesso em: 11 dez.
12 2017. doi: 10.1128/JCM.42.1.73-78.2004.
- 13 CASTRO-ROSAS, J.; ESCARTÍN, E.F. Adhesion and Colonization of *Vibrio cholera* O1 on
14 Shrimp and Crab Carapaces. **Journal of Food Protection**, v.65, n.3, p.492–498, 2002.
15 Disponível em: <<http://jfoodprotection.org/doi/pdf/10.4315/0362-028X-65.3.492>>. Acesso
16 em: 11 dez. 2017.
- 17 FLACH, J. et al. Biofilmes formados em matéria-prima em contato com leite: fatores de
18 virulência envolvidos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, n.3, p.291-296, 2005. Disponível
19 em: <<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/20189/000531682.pdf?sequence=1>>.
20 Acesso em: 11 dez. 2017.
- 21 HAN, N. et al. Biofilm formation by *Vibrio parahaemolyticus* on food and food contact
22 surfaces increases with rise in temperature. **Food Control**, v.70, p.161-166, 2016. Disponível
23 em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713516302997>>. Acesso em: 11
24 dez. 2017. doi: 10.1016/j.foodcont.2016.05.054.

- 1 HEITMANN, I.G. et al. Revisión y recomendaciones para el manejo de diarrea por *Vibrio*
2 *parahaemolyticus*. **Revista Chilena de Infectologia**, v.22, n.2, p.131-140, 2005. Disponível
3 em: <[http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182005000200003&lng=en&nrm=iso&tlng=en)
4 [10182005000200003&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182005000200003&lng=en&nrm=iso&tlng=en)>. Acesso em: 9 dez. 2017. doi:
5 10.4067/S0716-10182005000200003.
- 6 JAY, J.M. **Microbiologia de Alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.
- 7 KIRSCHNIK, P.G. **Avaliação da estabilidade de produtos obtidos de carne**
8 **mecanicamente separada de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*)**. 2007. 102f. Tese
9 (Doutorado em Aquicultura) - Centro de Aqüicultura da UNESP, Universidade Estadual
10 Paulista, Campus Jaboticabal.
- 11 LUCCHESI, E.G. **Desenvolvimento de sistema de obtenção de biofilmes in vitro e**
12 **avaliação de sua susceptibilidade a biocidas**. 2006. 77f. Dissertação (Mestrado em
13 Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de
14 Campinas, Campinas.
- 15 MCCARTER, L. The Multiple Identities of *Vibrio parahaemolyticus*. **Journal of Molecular**
16 **Microbiology and Biotechnology**, v.1, n.1, p.51-57, 1999. Disponível em:
17 <<https://www.caister.com/jmmb/v/v1/v1n1/08.pdf>>. Acesso em: 12 dez. 2017.
- 18 MILAN, C. et al. Sanitizer resistance of biofilm-forming *Salmonella* isolated from meat
19 products. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.67, n.2, p. 642-646,
20 2015. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352015000200642)
21 [09352015000200642](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352015000200642)>. Acesso em: 12 dez. 2017. doi: 10.1590/1678-7298.
- 22 OLIVER, J.D.; KAPER, J.B. *Vibrio* species. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.;
23 MONTVILLE, T.J.(Eds). **Food microbiology: Fundamentals and frontiers**. Washington:
24 ASM Press, 2001. p.263-300.

- 1 QUATRIN, P.M. et al. Avaliação de diferentes substratos para a formação de biofilmes *in*
2 *vitro* de *Pseudomonas aeruginosa*. **Disciplinarum Scientia**. Série: Ciências da Saúde, v.16,
3 n.2, p.191-203, 2015. Disponível em:
4 <<https://www.periodicos.unifra.br/index.php/disciplinarumS/article/view/1003/947>>. Acesso
5 em: 13 dez. 2017.
- 6 RIVAS, L. et al. A comparative study of biofilm formation by Shiga toxigenic *Escherichia*
7 *coli* using epifluorescence microscopy on stainless steel and microtitre plate method. **Journal**
8 **of Microbiological Methods**, v.69, p.44-51, 2007. Disponível em:
9 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701206003447>>. Acesso em 12 dez.
10 2017. doi: 10.1016/j.mimet.2006.11.014.
- 11 ROSA, J.V. et al. Formação de biofilme por *Vibrio parahaemolyticus* isolados de pescados.
12 **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.37, n.4, p.339-345, 2017. Disponível em:
13 <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-736X2017000400339&script=sci_abstract&tlng=pt)
14 [736X2017000400339&script=sci_abstract&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-736X2017000400339&script=sci_abstract&tlng=pt)>. Acesso em: 13 dez. 2017. doi: 10
15 1590/s0100-736x2017000400007.
- 16 ROSSONI, E.M.M.; GAYLARDE, C.C. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic
17 acid as sanitising agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence
18 microscopy. **International Journal of Food Microbiology**, v.61, n.1, p.81-85, 2000. doi:
19 10.1016/S0168-1605(00)00369-X
- 20 SHI, X.; ZHU, X. Biofilm formation and food safety in food industries. **Trends in Food**
21 **Science & Technology**, v.20, n.9, p.407-413, 2009. doi: 10.1016/j.tifs.2009.01.054.
- 22 SREY, S. et al. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. **Food Control**,
23 v.31, p. 572-585, 2013. doi: 10.1016/j.foodcont.2012.12.001.

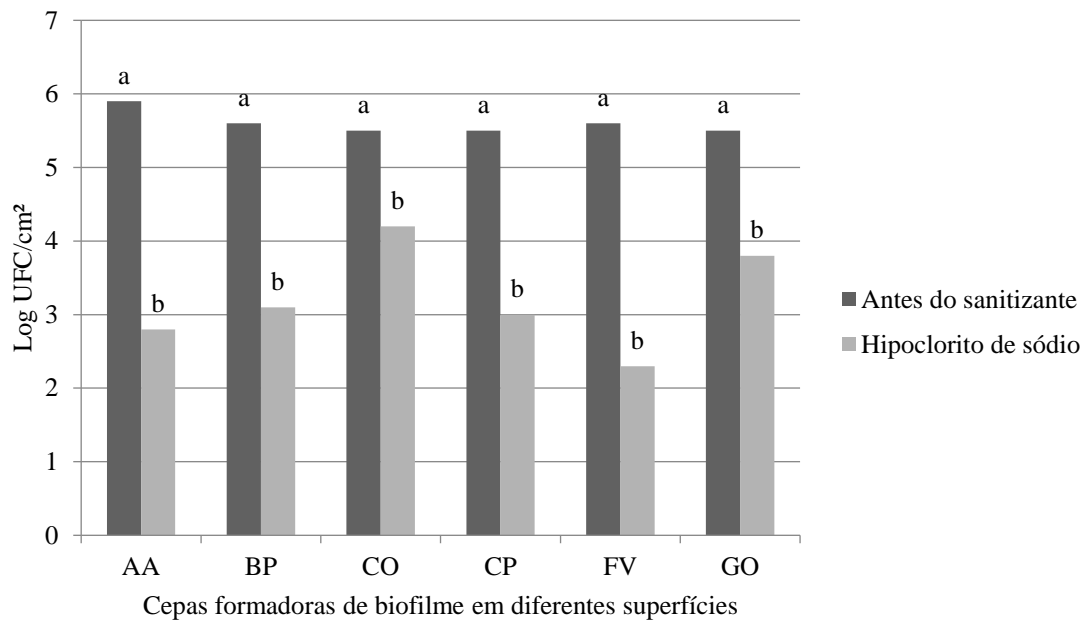
- 1 SUTHERLAND, I.W. The biofilm matrix: an immobilized but dynamic microbial
- 2 environment. **Trends Microbiology**, v.9, n.5, p.222-227, 2001. doi: 10.1016/S0966-
- 3 842X(01)02012-1.
- 4 THOMPSON, F.L. et al. Biodiversity of *Vibrios*. **Microbiology and Molecular Biology**
- 5 **Reviews**, v.68, n.3.; p.403-431, 2004. doi: 10.1128/MMBR.68.3.403-431.2004.

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

Isolado	Vidro	Polietileno de alta densidade	Aço inoxidável	Opérculo	Carapaça
A	-	-	+	-	-
B	-	+	-	-	-
C	-	+	-	+	-
D	-	-	-	-	-
E	-	-	-	-	-
F	+	-	-	-	-
G	-	-	-	+	-
H	-	-	-	-	-

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

- 1 Figura 1. Efeito do hipoclorito de sódio sobre isolados de *V. parahaemolyticus* (A, B, C, F e
 2 G) formadores de biofilme em superfícies de polietileno de alta densidade, vidro, aço
 3 inoxidável e opérculo de *M. furnieri*:



- 4
 5 a, b: letras distintas diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). AA: isolado A em superfície de
 6 aço inoxidável; BP: isolado B em superfície de polietileno de alta densidade; CO: isolado C
 7 em superfície de opérculo; CP: isolado C em superfície de polietileno de alta densidade; FV:
 8 isolado F em superfície de vidro; GO: isolado G em superfície de opérculo.

3 Considerações Finais

Peixes da espécie *M. platanus* e camarões da espécie *F. paulensis* são hospedeiros de *V. parahaemolyticus*. Um total de 85,7% dos isolados de *V. parahaemolyticus* de pescados capturados no estuário da Lagoa dos Patos são formadores de biofilme e apresentam comportamento distinto sob condições de estresse.

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 pescados.

V. parahaemolyticus é capaz de formar biofilme em superfícies de vidro, polietileno de alta densidade, aço inoxidável e opérculo de *M. furnieri*.

O sanitizante hipoclorito de sódio é capaz de reduzir a população de *V. parahaemolyticus* mesmo estando em biofilme.

O isolamento de *V. parahaemolyticus* de pescados capturados no estuário da Lagoa dos Patos, em latitude e temperaturas consideradas pouco apropriadas para a ocorrência desse micro-organismo, é motivo de atenção para outras regiões em que *V. parahaemolyticus* tem sido pouco estudado. Também é um alerta para as indústrias de pescado, as quais devem levar em consideração a possibilidade do micro-organismo formar biofilme, o que pode implicar em revisões nos métodos de sanitização.

Referências

AASE, B.; SUNDHEIM, G.; LANGSRUD, S.; RORVIK, L. M. Occurrence of and a possible mechanism for resistance to a quaternary ammonium compound in *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, p. 57-63, 2000.

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, p. 394-398, 2009.

American Public Health Association- APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21th. Washington: APHA/ AWWA/ WEF, 2005. 1268p.

ANDRADE, N. J.; MACEDO, J. A. **Higienização na indústria de alimentos**. São Paulo: Varela, 1996. 182p.

ANDRADE, N. J. **Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo: Varela, 2008. 412p.

ANDRADE, N. J.; PINTO, C. L. O.; ROSADO, M. S. Controle da Higienização na Indústria de Alimentos. In: ANDRADE, N. J. **Higiene na Indústria de Alimentos**. São Paulo: Varela, 2008. p.182-183.

ANTONIOU, K.; FRANK, J. F. Removal of *Pseudomonas* putida biofilm and associated extracellular polymeric substances from stainless steel by alkali cleaning. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 2, p. 277-281, 2005.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA- ANVISA. Resolução da diretoria colegiada. RDC nº 109, de 6 de setembro de 2016. Dispõe sobre o regulamento técnico para produtos saneantes categorizados como alvejantes à base de hipoclorito de sódio ou hipoclorito de cálcio e dá outras providências. Brasília, 2016.

AQUINO, S.; GERMANO, M. I. S.; GERMANO, P. M. L. Princípios gerais de higienização. In: GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e Vigilância sanitária de Alimentos**. São Paulo: Varela, 2003. p.423-444.

ARCHER, R. M. B.; MORETTO, E. Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* em Mexilhões (*Perna perna*, Linnaeus, 1758) de Banco Natural do Litoral do Município de Palhoça, Santa Catarina, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 10, n. 3, p. 379-386, 1994.

AUSTIN, B. *Vibrios* as causal agents of zoonoses. **Veterinary Microbiology**, v. 140, p. 310-317, 2009.

BALDISSEROTTO, B. Piscicultura continental no Rio Grande do Sul: situação atual, problemas e perspectivas para o futuro. **Ciência Rural**. v. 39, n.1, p. 291-299, 2009.

BAUMANN, P.; SCHUBERT, R.H.W. Family II: Vibrionaceae. In: KRIEG, N. R., HOLT, J. G. editores. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore LON: Williams & Wilkins Co., 1984. p. 516-550.

BELTRAME, C. A. **Adesão de *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* em placas de polietileno novas e usadas e remoção com diferentes sanitizantes**. 2014. 99f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2014.

BILUNG, M. L.; RADU, S.; BAHAMAN, A. R.; RAHIM, R. A.; NAPIS, S. Random amplified polymorphic DNA-PCR typing of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from local cockles (*Anadara granosa*). **American Journal of Immunology**, v. 1, p. 31-36, 2005.

BORGES, A.; FERREIRA, C.; SAAVEDRA, M. J.; SIMÕES, M. Antibacterial Activity and Mode of Action of Ferulic and Gallic Acids Against Pathogenic Bacteria. **Microbial Drug Resistance**, v. 19, n. 4, p. 256-65, 2013.

BOTT, T. R. **Fouling of heath exchangers**. Amsterdam: Elsevier science B. V., 1995. 546p.

BRAOUDAKI, M.; HILTON, A. C. Adaptive resistance to biocides in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157 and cross-resistance to antimicrobial agents. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 73–78, 2004.

BRASIL. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis. Unidade de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. 2017. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/maio/29/Apresentacao-Surtos-DTA-2017.pdf>>. Acesso em: 28 nov. 2017.

BROWN, M. R.; BARKER, J. Unexplored reservoirs of pathogenic bacteria: protozoa and biofilms. **Trends in Microbiology**, v. 7, p. 46–50, 1999.

BUTT, A. A.; ALDRIDGE, K. E.; SANDRES, C. V. Infections related to the ingestion of seafood Part I: viral and bacterial infections. *The Lancet Infectious Disease*, v. 4, n. 4, p. 201-212, 2004.

CAIXETA, D. S. **Sanificantes químicos no controle de biofilmes formados por duas espécies de *Pseudomonas* em superfície de aço inoxidável**. 2008. 75f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

CALLIARI, L. J. O ambiente e a biota do Estuário da Lagoa dos Patos. In: SEELIGER, U.; ODEBRECHT, C.; CASTELLO, J. P. editores. **Os Ecossistemas Costeiro e Marinho do Extremo Sul do Brasil**. Rio Grande: Ecocientia, 1998. p.13-18.

CASTRO-ROSAS, J.; ESCARTÍN E. F. Adhesion and colonization of *V. cholerae* O1 on shrimp and crab carapace. **Journal of Food Protection**, 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**, v. 67, p. 2183-2188, 2004.

CROCI, L.; SUFFREDIN, E.; COZZ, L.; TOT, L.; OTTAVIAN, D.; PRUZZ, C.; SERRATOR, P.; FISCHETT, R.; GOFFRED, E.; LOFFRED, G.; MIONI, R. Comparison of different biochemical and molecular methods for the identification of *Vibrio parahaemolyticus*. **Journal Applied Microbiology**, v. 102, p. 229-237, 2007.

DILEEP, V.; KUMAR, H. S.; KUMAR, Y.; NISHIBUCHI, M.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. Application of polymerase chain reaction for detection of *Vibrio parahaemolyticus* associated with tropical seafoods and coastal environment. **Letters in Applied Microbiology**, v. 36, p. 423-427, 2003.

DIRITA, V. J. Co-ordinate expression of virulence genes by *ToxR* in *Vibrio cholerae*. **Molecular Microbiology**, v. 6, p. 451–458, 1992.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. M. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, p. 167-193, 2002.

DUNNE JÚNIOR, W. M. Bacterial adhesion: Seen any good biofilms lately? **Clinical Microbiology**, v. 15, n. 2, p. 155-166, 2002.

ELEXSON, N.; YAYA, R.; NOR, A. M.; KANTILAL, H. K.; UBONG, A.; YOSHITSUGU, N.; NISHIBUCHI, M.; SON, R. Biofilm assessment of *Vibrio parahaemolyticus* from seafood using Random Amplified Polymorphism DNA-PCR. **International Food Research Journal**, v. 21, n. 1, p. 59-65, 2014.

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.

EMMANUEL, E.; KECK, G.; BLANCHARD, J.; VERMANDE, P.; PERRODIN, Y. Toxicological effects of disinfections using sodium hypochlorite on aquatic organisms and its contribution to AOX formation in hospital wastewater. **Environment International**, v. 30, p. 891-900, 2004.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, EPA. Health risks from microbial growth and biofilms in drinking water distribution systems environmental protection agency. Pennsylvania, 2002.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2000. 652p.

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.

FUJIHARA, R. M.; SYLVIO, S. B. Limpeza e desinfecção de plantas de processamento. In: CONTRERAS, C. J.; BROMBERG, R.; MIYAGUSKU, L. **Higiene e sanitização na indústria de carnes e derivados**. São Paulo: Varela, 2003. p.7-16.

GARCÍA, M. T.; CAMPOS, E.; SANCHEZ-LEAL, J.; RIBOSA, I. Effect of the alkyl chain length on the anaerobic biodegradability and toxicity of quaternary ammonium based surfactants. **Chemosphere**, v. 38, n. 15, p. 3473-3483, 1999.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. São Paulo: Varela, 2001. 629p.

GASPAR, J.; VIEIRA, R.; TAPIA, M. Aspectos sanitários do pescado de origem de água doce e marinha, comercializado na feira de Gentilândia, Fortaleza, Ceará. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 11, p. 20-28, 1997.

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. O3:K6 Serotype of *Vibrio parahaemolyticus* identical to the global pandemic clone associated with diarrhea in Peru. **International Society for Infectious Diseases**, v. 11, p. 324-328, 2007.

GILBERT, P.; ALLISON, D. G.; MCBAIN, A. J. Biofilms in vitro and in vivo: do singular mechanisms imply cross-resistance? **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 98-110, 2002.

GUTIÉRREZ, D.; DELGADO, S.; VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D.; MARTÍNEZ, B.; CABO, M. L.; RODRÍGUEZ, A.; HERRERA, J. J.; GARCÍA, P. Incidence of *Staphylococcus aureus* and analysis of associated bacterial communities on food industry surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 24, p. 8547-8554, 2012.

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.

HEIR, E.; SUNDHEIM, G.; HOLCK, A. L. Resistance to quaternary ammonium compounds in *Staphylococcus* spp. isolated from the food industry and nucleotide sequence of the resistance plasmid pST827, **Journal of Applied Bacteriology**, v. 79, p. 149-156, 1995.

HEITMANN, I. G.; JOFRE, L. M.; HORMAZABAL, O. J. C.; OLEA, A.; VALLEBUONA, C.; VALDES, C. Revisión y recomendaciones para el manejo de diarrea por *Vibrio parahaemolyticus*. **Revista Chilena de Infectología**, v. 22, n. 2, p. 131-140, 2005.

HUSS, H. H.; REILLY, A.; EMBRAKEB, P. K. B. Prevention and control of hazard in seafood. **Food Control**, v. 11, p. 149-156, 2000.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS-ICMSF. *Vibrio parahaemolyticus*. In: ICMSF. **Micro-organisms in food 1:**

Their significance and methods of enumerations. Toronto: University of Toronto Press, 1978. p. 201-207, 287-350.

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.; DEVOS, D. E.; DEKEERSMAECKER, S. C. J. Brominated furanones inhibit biofilm formation by *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. **Applied Environmental Microbiology**, v. 74, n. 21, p. 6639–6648, 2008.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.

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. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm070830.htm>>. Acesso em: 19 out. 2016.

KIM, Y. B.; OKUDA, J.; MATSUMOTO, C.; TAKAHASHI, N.; HASHIMOTO, S.; NISHIBUCHI, M. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 1173-1177, 1999.

KIRSCHNIK, P. G. **Avaliação da estabilidade de produtos obtidos de carne mecanicamente separada de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*)**. 2007. 102f. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Centro de Aquicultura da UNESP, Universidade Estadual Paulista, Campus Jaboticabal, 2007.

KITIS, M. Desinfection of wastewaters with peracetic acid: a review. **Environment International**, v. 30, n. 1, p. 47-55, 2004.

KRUMMENAUER, D.; JÚNIOR, W.; CAVALLI, R.; PEIXOTO, S.; ZOGBI, P. Viabilidade do cultivo do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* (Crustácea, Decapoda) em gaiolas sob diferentes densidades durante o outono no sul do Brasil. **Ciência Rural**, v. 36, n. 1, p. 252-257, 2006.

KUDO, Y. H.; KUMAGAI, S.; KONUMA, H.; MIWA, N.; MASUDA, T.; OZAWA, K.; NISHINA, T. Decontamination of *Vibrio parahaemolyticus* in Fish by Washing with Hygienic Seawater and Impacts of the High Level Contamination in the Gills and Viscera. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.75, n. 5, p. 589-596, 2013.

LEE, S. H.; HAVA, D. L.; WALDOR, M. K.; CAMILLI, A. Regulation and temporal expression patterns of *Vibrio cholerae* virulence genes during infection. **Cell press**, v. 99, n. 6, p. 625-634, 1999.

LEITÃO, M. F. Limpeza e sanificação na indústria de alimentos. In: MANUAL DE APOIO (Curso de Aprimoramento), 2001, Fortaleza. **Série Qualidade e Segurança Alimentar**, Projeto APPCC, CNI/SENAI/SEBRAE, 2001.

LIMA, C. P. de. 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. 52p. 2014.

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, 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**, v. 34, p. 202-206, 2013.

LUCCHESI, E. G. **Desenvolvimento de sistema de obtenção de biofilmes in vitro e avaliação de sua susceptibilidade a biocidas**. 2006. 77f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

MACEDO, J. A. B. de. O processo de desinfecção pelo uso de derivados clorados em função do pH e a portaria 518/2004 do ministério da saúde. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 2004, Fortaleza. **Anais do XLIV Congresso Brasileiro de Química**, 2004.

MANCILLA, E. P. Intoxicación por *Vibrio parahaemolyticus*. **Cuadernos médico sociales**, v. 45, p. 43-47, 2005.

MARRIOTT, N. G.; GRAVANI, R. B. Sanitizers. In: MARRIOTT, N. G.; GRAVANI, R. B. **Principles of food sanitation**. New York: Springer, 2006. p.165-189.

MCCARTER, L. The Multiple Identities of *Vibrio parahaemolyticus*. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 51-57, 1999.

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**, v. 74, n. 2, p. 149-153, 2015.

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.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA- MPA. **Potencial brasileiro**. 2014. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/aquicultura/potencial-brasileiro>>. Acesso em: 21 out. 2016.

MIZAN, M. F. R.; JAHID, I. K.; KIM, M. H.; LEE, K. H.; KIM, T. J.; HA, S. D. Variability of biofilm formation correlates with hydrophobicity and quorum sensing among *Vibrio parahaemolyticus* isolates from food contact surfaces and distribution of genes involved in biofilm formation. **Biofouling**, v. 32, n. 4, p. 497-509, 2016.

MÖLLER, O.; FERNANDES, E. Hidrologia e hidrodinâmica. In: SEELIGER, U.; ODEBRECHT, C., editores. **O estuário da Lagoa dos Patos: um século de transformações**. Rio Grande: FURG, 2010. p. 17-27.

MORRIS, J. G. JR.; BLACK, R. E. Cholera and other vibrioses in the United States. **The New England Journal of Medicine**, v. 312, n. 6, p. 343-350, 1985.

NASCIMENTO, D. L.; BARROS, C. N.; SILVA, A. D. R.; GUIMARÃES, J. M.; PEDROSA, V. F.; MENDES, E. S. Bactérias potencialmente patogênicas isoladas de beijupirá (*Rachycentron canadum*) cultivadas em sistema *offshore*. **Medicina Veterinária (UFRPE)**, v. 8, n. 2, p. 12-21, 2014.

NASCIMENTO, H. M.; DELGADO, D. A.; BARBARIC, I. F. Avaliação da aplicação de agentes sanitizantes como controladores do crescimento microbiano na indústria alimentícia. **Revista Ceciliana**, p. 11-13, 2010.

NITSCHKE, M. Biotensoativos como agentes inibidores da adesão de patógenos em superfícies de materiais utilizados na indústria de alimentos. Projeto de Pesquisa, Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ. CTAA, 2006.

OETTERER, M. **Industrialização do pescado cultivado**. Guaíba: Agropecuária, 2002. 200p.

OLIVER, J. D.; KAPER, J. B. *Vibrio* species. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J., editores. **Food microbiology: Fundamentals and frontiers**. Washington: ASM Press, 2001. p. 263-300.

ORDÓÑEZ, J. A. Características gerais do pescado. In: ORDÓÑEZ, J. A. organizadores. **Tecnologia de alimentos de origem animal**. São Paulo: Artmed, 2005. p. 219-229.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A ALIMENTAÇÃO E AGRICULTURA- FAO. **Comércio global de peixes atinge níveis recordes**. 2014. Disponível em <<https://www.fao.org.br/cgpanr.asp>> Acesso em: 17 out. 2015.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A ALIMENTAÇÃO E AGRICULTURA- FAO. **Caminhar para a igualdade de gênero na indústria pesqueira**. 2015. Disponível em <<https://www.fao.org.br/cpigip.asp>> Acesso em: 17 out. 2015.

PARKAR, S. G.; FKLINT, S. H.; BROOKS, J. D. Evolution of the effect of cleaning regimes on biofilms of thermophilic bacilli on stainless steel. **Journal Applied Microbiology**, v. 96, p. 110-116, 2004.

QUATRIN, P. M.; COMIM, V. M.; LOPES, L. Q. S.; GÜNDEL, A.; VAUCHER, R. A.; SANTOS, R. C. V. Avaliação de diferentes substratos para a formação de biofilmes *in vitro* de *Pseudomonas aeruginosa*. **Disciplinarum Scientia**. Série: Ciências da Saúde, v. 16, n. 2, p. 191-203, 2015.

REIS, E. G. Pesca artesanal na Lagoa dos Patos: História e administração pesqueira. In: ALVES, F. N. organizadores. Por uma história multidisciplinar do Rio Grande. Rio Grande: FURG. 1999. p.81-84.

RIISPOA. Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Brasília, 2017.

RIVAS, L.; DYKES, G. A.; FEGAN, N. A comparative study of biofilm formation by Shiga toxicogenic *Escherichia coli* using epifluorescence microscopy on stainless steel and microtitre plate method. **Journal of Microbiological Methods**, v. 69, p. 44-51, 2007.

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 captured from the Lagoa dos Patos estuary. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 3, p. 1345- 1354, 2016.

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.

ROSSONI, E. M. M.; GAYLARDE, C. C. Comparison of sodium hypochlorite and peracet acid as sanitizing agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 61, n. 1, p. 81-85, 2000.

SAKAZAKI, R.; IWANAMI, S.; FUKUMI, H. Studies on the enteropathogenic, facultatively halophilic bacteria, *Vibrio parahaemolyticus*. I. Morphological, cultural and biochemical properties and its taxonomic position. **Japanese Journal of Medical Science & Biology**, v. 16, p. 161-188, 1963.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3.ed. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001. 999p.

SANTANA, A. Sanitização e Desinfecção: Diferenças, benefícios, cuidados e os principais químicos. **Food Safety Brazil: Segurança de Alimentos**. 2016. Disponível em: <<http://foodsafetybrazil.org/sanitizacao-e-desinfeccao-diferencas-beneficios-cuidados-e-os-principais-quimicos/#ixzz501IGLnLf>>. Acesso em: 01 dez. 2017.

SECA, C. A. T. **Capacidade de formação de biofilme em superfície de aço inoxidável de cepas de *Escherichia coli* isoladas de pescado utilizados na culinária japonesa**. 2015. 44f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Nutrição) - Faculdade de Nutrição Emília de Jesus Ferreiro, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2015.

SECHI, L. A.; DUPRE, I.; DERIU, A.; FADDA, G.; ZANETTI, S. Distribution of *Vibrio cholerae* virulence genes among different *Vibrio* species isolated in Sardinia, Italy. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 475-481, 2000.

SHENG, X.; TING, Y. P.; PEHKONEN, S. O. Force measurements of bacterial adhesion on metals using a cell probe atomic force microscope. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 310, p. 661-669, 2007.

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.

SILVA, S. R. C. Material didático--pedagógico sobre a tainha (*Mugil platanus*)– pesca e biologia. Monografia (Curso de Especialização em Ecologia Aquática Costeira)- Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande. 45p. 2003.

SIQUEIRA, J. R.; DA SILVA, C. H.; CERQUEIRA, M. DAS D.; LOPES, H. P.; DE UZEDA, M. Effectiveness of four chemical solution in eliminating *Bacillus subtilis* spores on guttapercha cones. **Endodontics & Dental Traumatology**, v. 14, n. 3, p. 124-126, 1998.

SOUZA, J. B.; DANIEL, L. A. Comparação entre hipoclorito de sódio e ácido peracético na inativação de *E. coli*, colifagos e *C. perfringens* em água com elevada concentração de matéria orgânica. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 10, n. 2, p. 111-117, 2005.

SREY, S.; JAHID, I. K.; HA, S. D. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. **Food Control**, v. 31, p. 572-585, 2013.

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**, v. 40, p. 175-179, 2000.

SU, Y. C.; LIU, C. *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety. **Food Microbiology**, v. 24, p. 549-558, 2007.

SUJEEWA, A. K. W.; NORRAKIAH, A. S.; LAINA, M. Prevalence of toxic genes of *Vibrio parahaemolyticus* in shrimps (*Penaeus monodon*) and culture environment. **International Food Research Journal**, v. 16, p. 89-95, 2009.

SUNDHEIN, G.; LANGSRUD, S.; HEIR, E.; HOLCK, A. L. Bacterial resistance to disinfectants containing quaternary ammonium compounds. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 41, p. 235-239, 1998.

SUTHERLAND, I. W. The biofilm matrix: an immobilized but dynamic microbial environment. **Trends Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 222-227, 2001.

THOMPSON, F. L.; IIDA, T.; SWINGS, J. Biodiversity of *Vibrios*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, n. 3.; p. 403-431, 2004.

TRABULSI, L. R. Mecanismo de ação dos antibacterianos. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMBERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 2000. p. 93-98.

URMERSBACH, S.; AHO, T.; ALTER, T.; HASSAN, S. S.; AUTIO, R.; HUEHN, S. Changes in global gene expression of *Vibrio parahaemolyticus* induced by cold- and heat-stress. **BMC Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 229-241, 2015.

VAN HOUDT, R.; MICHIELS, C. W. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, p. 1117-1131, 2010.

VANETTI, M. C. D. Aspectos microbiológicos de produtos minimamente processados. Departamento de Microbiologia. Universidade Federal de Viçosa, 2005. Disponível em:
<https://www.researchgate.net/publication/240627080_Aspectos_microbiologicos_de_produtos_minimamente_processados>. Acesso em: 26 de fev. de 2018.

WIRTANEN, G. Biofilm formation and its elimination from food processing equipment. VTT publications. 251, 1995.

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.

ZULKIFLI, Y.; ALITHEEN, N. B.; SON, R.; YEAP, S. K.; LESLEY, M. B.; RAHA, A. R. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* isolates by PCR targeted to the *toxR* gene and detection of virulence genes. **International Food Research Journal**. v. 16, p. 289-296, 2009.