

Avaliação quantitativa e bioatividade de um biofilme perifítico oriundo de piscicultura

Quantitative assessment and bioactivity of a periphytic biofilm from fish farming

Jéssica Lucinda Saldanha da Silva*, Marina Teresa Torres Rodríguez, Fátima Cristiane Teles de Carvalho e Oscarina Viana de Sousa

Instituto de Ciências do Mar, Labomar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil. Autor para correspondência: jessicalucinda@hotmail.com

Submissão: 30/12/2020 | Aceite: 22/04/2021

RESUMO

Um biofilme perifítico formado em um cultivo de tilápias-do-nilo foi analisado para determinação quantitativa de bactérias e fungos, detecção de substâncias com ação antibacteriana e avaliação de perfis de resistência frente a antibióticos comerciais. Foi empregado o método de contagem padrão em placas por meio da técnica inoculação em profundidade para a quantificação das bactérias heterotróficas cultiváveis (BHC) e a técnica de espalhamento sobre meio de cultura para a de fungos. Investigou-se a produção de substâncias antibacterianas pela comunidade e a susceptibilidade a antibióticos de amplo espectro, ambos por meio da técnica de difusão em ágar. As concentrações de bactérias e fungos cultiváveis na comunidade de perifíton foram, respectivamente, $1,73 \times 10^6$ UFC/mL e $1,45 \times 10^2$ UFC/mL. O biofilme perifítico mostrou ação antibacteriana contra bactéria indicadora Gram positiva. Os antibióticos Cloranfenicol, Tetraciclina e Cefalotina foram eficientes contra os componentes do biofilme. Entretanto, a comunidade apresentou perfil de resistência ao Imipinem. As bactérias são os componentes dominantes no biofilme perifítico em comparação com os fungos contribuindo com a ciclagem de nutrientes e influenciando a qualidade da água de cultivo. O perifíton possui potencial biotecnológico de ação antimicrobiana.

PALAVRAS-CHAVE: agregados microbianos; bioatividade; aquicultura.

ABSTRACT

The objective of this work was to quantitatively analyze the cultivable microbiota in isolated periphyton of tilapia cultivation tanks with later prospecting for bioactive substances produced in the biofilm and resistance to the action of antibiotics. The standard plate counting method using the pour plate technique was used to quantify the cultivable heterotrophic bacteria (CHB) and the spread plate technique for fungi. The production of antimicrobial substances by the community and the susceptibility to broad-spectrum antibiotics were investigated, both through the agar diffusion technique. The periphyton sample showed 1.73×10^6 CFU/mL in relation to the count of total cultivable heterotrophic bacteria and 1.45×10^2 CFU/mL relative to the density of fungi. The periphytic biofilm showed antibacterial action against Gram-positive bacteria. The antibiotics chloramphenicol, tetracycline, and cephalothin were effective against the biofilm components. However, the community showed a profile of resistance to imipenem. Bacteria are the dominant components in periphytic biofilm compared to fungi, contributing to nutrient cycling and influencing the quality of cultivated water. Periphyton has biotechnological potential for antimicrobial action.

KEYWORDS: microbial aggregates; bioactivity; aquaculture.

Perifíton é uma comunidade formada por microrganismos autotróficos e heterotróficos, como bactérias, microalgas, fungos e outros, unidos numa matriz de polímeros extracelulares juntamente com matéria orgânica e inorgânica (VERT et al. 2012, MARTÍNEZ-CÓRDOVA et al. 2014). Os efeitos dessa bioestrutura sobre a qualidade da água e disponibilidade de nutrientes para os organismos aquáticos tem gerado resultados satisfatórios nos cultivos de peixes e camarões (ZHANG et al. 2016, YU et al. 2016). A indução da formação de biofilme perifítico em tanques de cultivo visando a melhoria da qualidade da água está de acordo com o conceito de aquicultura sustentável (MARTÍNEZ-CÓRDOVA et al. 2014, SILVA et al. 2016, ORTIZ-ESTRADA et al. 2020).

Na estrutura do biofilme, as bactérias merecem destaque por terem o papel de iniciadoras se aderindo e colonizando os substratos devido a presença de ultraestruturas ou substâncias que auxiliam sua adesão, como é o caso da produção de exopolissacarídeos (EPS) (polímeros de carboidratos); e a partir daí, a agregação dos demais constituintes nesse micro-habitat promove proteção contra pressão de fatores externos devido a matriz polimérica formada, como por exemplo a proteção contra dessecação, uma vez que essa substância forma uma película envolvendo todos os microrganismos, os quais ficam enclausurados e protegidos do ambiente a sua volta. Além disso, as bactérias são responsáveis pelos complexos de interações que ocorrem dentro do núcleo microbiano formado (MARTÍNEZ-CÓRDOVA et al. 2014, LARA et al. 2017). No ambiente aquícola, as estruturas submersas possibilitam maior área disponível para agregação (WU 2017) e adensamento da comunidade microbiana oferecendo um hábitat favorável.

Os grupos bacterianos autóctones encontrados nesses sistemas microbianos podem produzir compostos metabólicos secundários com diferentes ações (YU et al. 2016, LI et al. 2017), que podem agir sinergicamente ou antagonicamente com outros integrantes (THOMPSON et al. 2002), tais como alguns mecanismos antagônicos de bactérias capazes de inibir uma ampla gama de microrganismos potencialmente patogênicos para organismos cultivados, como bactérias do gênero *Vibrio* e *Aeromonas*, dinoflagelados e microalgas produtoras de toxinas (MATA et al. 2017). Produção de substâncias com ação antimicrobiana pode reduzir a presença de patógenos, mantendo o equilíbrio do sistema e evitando o surgimento de doenças. Assim, a manipulação dessa comunidade expande possibilidades interessantes para a produção de organismos aquáticos com redução do uso de químicos e melhoria do desempenho zootécnico. Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo a análise do perifíton formado em tanques de cultivo de tilápias com avaliação quantitativa da microbiota cultivável, detecção de atividades antagônicas (antimicrobiana) e padrões de resistência à ação de antibióticos comerciais.

O estudo foi desenvolvido em dois laboratórios da Universidade Federal do Ceará (UFC): o experimento in vivo foi realizado em uma instalação de cultivo de organismos aquáticos pertencentes ao Departamento de Engenharia de Pesca (UFC), enquanto as análises microbiológicas foram processadas no Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado (LAMAP) do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR).

Um total de 60 juvenis de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), com peso médio inicial de 1,5 g, foram divididos em 10 unidades experimentais, seis animais cada, com uma densidade de 24 peixes/m³ (ou 6 peixes/tanque) em caixas de polietileno de 250 L de volume útil. Dois grupos experimentais foram testados durante a pesquisa: tilápia cultivada na presença (BP-biofilme perifítico) e na ausência (SBP-sem biofilme perifítico) de substrato artificial para crescimento de biofilme perifítico, com aplicação de um delineamento inteiramente casualizado, com dois tratamentos e cinco repetições. As estruturas submersas utilizadas como base para a colonização do perifíton eram constituídas de duas placas de cloreto de polivinila (PVC) (altura 0,40 x largura 0,65 m), com uma área útil de 0,90 m², dispostas verticalmente na coluna d'água, correspondendo a 135% da área total das águas superficiais. Os peixes foram alimentados com ração comercial (Guabi Nutrição e Saúde Animal, Sales Oliveira, São Paulo, Brasil) contendo teor de 32,37% de proteína.

Uma área de 10 x 10 cm² foi raspada da placa de PVC e o material colocado em frasco previamente esterilizado, sendo imediatamente acondicionado em caixa isotérmica e transportado até o Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado (LAMAP), do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR), pertencente à Universidade Federal do Ceará (UFC), para a realização da análise microbiológica.

Em laboratório, adicionou-se 1 mL do perifíton homogeneizado em 9 mL de solução salina a 0,85% de NaCl, formando a primeira diluição (10⁻¹), a partir dessa foram feitas as demais diluições decimais até 10⁻⁵.

A quantificação das BHC foi feita por meio do método de contagem padrão de placas utilizando a técnica de inoculação em profundidade e o meio de cultura ágar triptona de soja (TSA), de acordo com APHA (1998). Para isso, alíquotas de 1 mL de cada diluição foram adicionadas em placas de Petri, em duplicada, contendo o meio de cultura, incubadas em estufa bacteriológica por 48 h. Posteriormente, foi realizada a contagem das colônias crescidas, por meio do método de contagem padrão de placas, expressando os resultados em Unidades Formadoras de Colônias por mL (UFC/mL) (DOWNES & ITO 2001), considerando valores de contagens entre 25 e 250 colônias.

A quantificação dos fungos presentes no biofilme foi realizada utilizando a mesma metodologia para BHC, usando o meio seletivo ágar dextrose batata (HIMEDIA) acrescido de 10 µL/mL de Ampicilina e solução de 1,8% de ácido tartárico. O período de incubação em estufa bacteriológica foi de até cinco dias a 28 °C.

Para a detecção de atividade antimicrobiana pelo biofilme foram utilizadas as cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *S. aureus* (ATCC 25923) como indicadoras, por meio do método de difusão em ágar (técnica de poços perfurados). Resumidamente, um tapete bacteriano de cada cepa indicadora foi espalhado sobre a superfície do meio ágar Mueller-Hinton. Foram perfurados 4 poços no Ágar e adicionado inóculo do biofilme sem diluição, e das diluições 10^{-1} e 10^{-2} . A água destilada foi usada como controle negativo. O teste foi realizado em duplicata e as placas foram incubadas por 48 h a 28 °C. Após esse período, verificou-se a formação ou não de halos ao redor dos poços na superfície do meio.

A ação de antibióticos de amplo espectro sobre os componentes do biofilme foi testada por meio da técnica de difusão em discos descrita por CLSI (2010). Foram usadas as substâncias comerciais: Cloranfenicol, 30 µg (CLO), Tetraciclina 30 µg (TET), Impinim 10 µg (IMP) e Cefalotina 30 µg (CFL). Esfregaços da amostra de biofilme foram feitos sobre a superfície do meio ágar Mueller-Hinton e depositados discos dos antibióticos comerciais. A leitura foi feita após incubação a 28 °C por 48 h. A leitura das placas e interpretação dos resultados seguiu padrões estabelecidos pelo CLSI (2010).

A contagem média de bactérias heterotróficas cultiváveis totais presentes no biofilme perifítico foi de $1,73 \times 10^6$ UFC/mL. ASADUZZAMAN et al. (2009) observaram durante o cultivo de tilápia-do-nylo em sistema com perifíton, valores de BHC igual a $3,06 \times 10^7$ UFC/g. De acordo com os mesmos autores, a carga elevada de BHC levou ao aumento da decomposição de matéria orgânica, a qual contribui para a liberação de nutrientes inorgânicos que estimularam o desenvolvimento bacteriano. Com isso, pode-se observar um efeito positivo na qualidade de água do cultivo, além de fonte extra de alimento proteico para os peixes.

Uma quantificação de $1,45 \times 10^2$ UFC/mL de fungos foi encontrado no biofilme perifítico formado durante o cultivo de tilápia no tratamento BP. Os fungos aquáticos são importantes no processamento da matéria orgânica, influenciando na via de transformação e conversão de frações da matéria orgânica particulada em dissolvida (TANT et al. 2015). Dessa forma, a presença desses microrganismos no biofilme contribui para a ciclagem dos nutrientes nos sistemas de cultivo, podendo ocasionar o aumento da produtividade primária.

Foram obtidos uma quantificação maior que 99% de bactérias em relação a fungos no biofilme desenvolvido durante o cultivo de tilápia, sendo evidenciado essa diferença nos resultados encontrados na presente pesquisa. Essa dominância quantitativa dos componentes bacterianos já foi vista em outras pesquisas (SILVA et al. 2016, GUTTMAN 2019)

Os biofilmes são descritos tipicamente como consórcio de microrganismos fixos em superfícies, mas eles também podem formar agregados suspensos, tapetes microbianos, e flocos, onde todos os arranjos utilizam alguma mistura das substâncias poliméricas extracelulares para agregação, estrutura, e manutenção do estilo de vida da comunidade (FLEMMING & WINGENDER 2010, BILLINGS et al. 2015). Comunidades microbianas frequentemente tem uma capacidade maior de executar determinada atividade que os indivíduos que vivem de forma livre (JAMES et al. 1995). A capacidade protetiva do biofilme é distribuída amplamente entre os microrganismos, é recalcitrante a ambientes extremos e agem como um “manto de proteção” contra efeitos da radiação ultravioleta, alterações de fatores ambientais (temperatura, pH, salinidade, pressão alterados), falta de nutrientes, ação de antibióticos, etc. (YIN et al. 2019). Também existe o efeito antagônico do biofilme contra microrganismos externos a comunidade com a produção de substâncias bioativas (WESSELING et al. 2015, SILVA et al. 2016).

No teste de atividade antimicrobiana, observou-se a formação do halo de inibição ao redor do poço com a diluição 10^{-2} frente à cepa padrão de *S. aureus*. Esperava-se encontrar atividade nas amostras mais concentradas o que não ocorreu, devido a maior agregação das bactérias na estrutura do biofilme. Com o aumento da diluição, provavelmente, essa amostra pode ser fragmentada, levando a uma maior exposição dos microrganismos, os quais puderam exercer a atividade antimicrobiana em relação a *S. aureus*. O cultivo de organismos aquáticos na presença de biofilmes, possibilita a redução da ocorrência de patógenos (THOMPSON et al. 2002), por conta da produção de substâncias antimicrobianas pela microbiota presente no perifíton, ou então esse biofilme pode ter efeito antagônico por competição ou exclusão de microrganismos indesejáveis. LI et al. (2017) identificaram no biofilme perifítico presente em tanques de cultivo, diversas grupos de bactérias produtoras de compostos bioativos, como metabólitos secundários e antibióticos.

Portanto, o cultivo de peixes na presença de perifíton pode auxiliar na diminuição ou até mesmo eliminação de patógenos potenciais veiculados a alimentos, contribuindo, assim, para obtenção de um alimento seguro e de qualidade, uma vez que produtos pesqueiros podem ser veículos de patógenos aos consumidores (RIBEIRO et al. 2009, DANTAS et al. 2012).

Tratamentos antimicrobianos convencionais, geralmente, não conseguem eliminar os biofilmes

(DAVIES 2003), por conta da sua complexidade estrutural e funcional (COSTERTON et al. 1994, CULLER 2010). As bactérias inseridas no biofilme podem ser até 1000 vezes mais resistentes aos antibióticos e podem persistir após o tratamento (ADNAN et al. 2018). Um dos maiores componentes estruturais do biofilme, conhecido como substância polimérica extracelular (exopolissacarídeo-EPS), possui vários papéis, um deles é a ação protetiva contra a penetração de diversas substâncias, como antibióticos, para o interior do biofilme, fazendo com que tratamentos convencionais não sejam eficientes para sua eliminação (STEWART 2002, XUE et al. 2012).

No presente estudo, pode-se observar a sensibilidade do biofilme perifítico em relação a três dos quatro antibióticos de amplo espectro testados, apresentando resistência apenas ao imipinem (Tabela 1).

Tabela 1. Perfil de susceptibilidade a diferentes antimicrobianos do biofilme perifítico isolado do cultivo de tilápia-do-nilo.

Table 1. Susceptibility profile to different antimicrobials from the periphytic biofilm isolated from the cultivation of Nile tilapia.

Antibiótico	Diâmetro do halo (mm)	S	I	R	Resultado
Cloranfenicol	41,63	≥18	13-17	≤12	S
Tetraciclina	27,03	≥15	12-14	≤ 11	S
Imipinem	16,57	≥23	20-22	≤19	R
Cefalotina	31,56	≥18	15-17	≤14	S

S = sensível, I = intermediário, R = resistente.

De acordo com XUE et al. (2012) uma das hipóteses para o aumento da resistência aos antimicrobianos é dada por conta dos diversos microrganismos constituintes do biofilme agirem sinergicamente em prol da sobrevivência da comunidade, superando situações adversas e, provavelmente, produzindo substâncias de tolerância e resistência. Além disso, a estrutura do biofilme, a qual é constituída por uma matriz de exopolissacarídeos, previne o acesso do antibiótico às células microbianas presentes na comunidade.

A formação de biofilme tem ação protetiva aos microrganismos nele inseridos, o que foi constatado no presente estudo, onde se observou a resistência ao antimicrobiano imipinem, o qual é classificado como sendo de amplo espectro, capaz de agir em bactérias Gram positivas e Gram negativas.

O uso de perifíton no cultivo de organismos aquáticos é uma realidade, já que constitui uma alternativa para o desenvolvimento da aquicultura ambientalmente “amigável”, entretanto pouco ainda se sabe sobre a composição e inter-relações estabelecidas nessa comunidade microbiana. Nesse estudo foi possível determinar a dominância quantitativa de bactérias em comparação aos fungos. Também foi observada a ação protetiva do biofilme em dois testes distintos, no primeiro foi possível detectar a atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, e no segundo o biofilme foi resistente ao antibiótico imipinem.

REFERÊNCIAS

- ADNAN M et al. 2018. Significance and potential of marine microbial natural bioactive compounds against biofilms/biofouling: necessity for green chemistry. *Peerj* 6: 1-18.
- APHA. 1998. American Public Health Association. Microbiological examination of water. In: EATON AD et al. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20.ed. Washington: APHA.
- ASADUZZAMAN M et al. 2009. Effects of addition of tilapia *Oreochromis niloticus* and substrates for periphyton developments on pond ecology and production in C/N-controlled freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* farming systems. *Aquaculture* 287: 371-380.
- BILLINGS N et al. 2015. Material properties of biofilms - a review of methods for understanding permeability and mechanics. *Reports on Progress in Physics* 78: 036601.
- CLSI. 2010. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twentieth Informational Supplement: Supplement M100-S20. Wayne: CLSI.
- COSTERTON JW et al. 1994. Biofilms, the customized microniche. *Journal of Bacteriology* 176: 2137-2142.
- CULLER HF. 2010. Formação de biofilmes por *Escherichia coli* enteropatogênica atípica. Dissertação. (Mestrado em Biotecnologia). São Paulo: USP. 113p.
- DANTAS LIS et al. 2012. Presença e isolamento de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella sp.* provenientes de filés de tilápia (*Oreochromis niloticus*) comercializados no mercado modelo Nerival Araújo, Currais Novos/RN. In: VII congresso Norte Nordeste de pesquisa e inovação. Resumos... Palmas: CONNEPI. 8p.
- DAVIES D. 2003. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature Reviews Drug Discovery* 2: 114-122.
- DOWNES MP & ITO K. 2001. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. APHA. 4.ed.

- Washington: American Public Health Association.
- FLEMMING HC & WINGENDER J. 2010. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* 8: 623-633.
- GUTTMAN L. 2019. Periphyton For Biofiltration And Fish Feeding in An Integrated Multi-Trophic Aquaculture System: A Case Study in The Gulf of Aqaba. *Open Access Journal Of Environmental & Soil Science* 3: 413-418.
- JAMES GA et al. 1995. Interspecies bacterial interactions in biofilms. *Journal of Industrial Microbiology* 15: 257-262.
- LI Z et al. 2017. Microbial succession in biofilms growing on artificial substratum in subtropical freshwater aquaculture ponds. *FEMS Microbiology Letters* 364: 1-7.
- YU E et al. 2016. Surface-attached and suspended bacterial community structure as affected by C/N ratios: relationship between bacteria and fish production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 32: 1-9.
- LARA G et al. 2017. The use of different aerators on *Litopenaeus vannamei* biofloc culture system: effects on water quality, shrimp growth and biofloc composition. *Aquaculture International* 25: 147-162.
- MARTÍNEZ-CÓRDOVA LR et al. 2014. Microbial-based systems for aquaculture of fish and shrimp: an updated review. *Reviews in Aquaculture* 6: 1-18.
- MATA MT et al. 2017. Production of diatom-bacteria biofilm isolated from *Seriola lalandi* cultures for aquaculture application. *Aquaculture Research* 48: 4308-4320.
- ORTIZ-ESTRADA AM et al. 2020. Bacterial communities and predicted nitrogen metabolism of heterotrophic- and probiotic-based biofilms used for superintensive indoor shrimp culture. *Aquaculture Research* 52: 334-344.
- RIBEIRO ALMS et al. 2009. Avaliação microbiológica da qualidade do pescado processado importado no estado do Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Ciências Veterinárias* 16: 109-112.
- SILVA JLS et al. 2016. Aquatic microbiota diversity in the culture of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using bioflocs or periphyton: virulence factors and biofilm formation. *Acta Scientiarum. Animal Sciences* 38: 233-241.
- STEWART PS 2002. Mechanism of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *International Journal of Medical Microbiology* 292: 107-113.
- TANT CJ et al. 2015. The role of aquatic fungi in transformations of organic matter mediated by nutrientes. *Freshwater Biology* 60: 1354-1363.
- THOMPSON FL et al. 2002. Importance of biofilm for water quality and nourishment in intensive shrimp culture. *Aquaculture* 203: 263-278.
- VERT M et al. 2012. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). *Journal of Pure and Applied Chemistry* 84: 377-410.
- WESSELING W et al. 2015. Functionalised ceramic spawning tiles with probiotic *Pseudoalteromonas* biofilms designed for clownfish aquaculture. *Aquaculture* 446: 57-66.
- WU Y. 2017. Periphyton: functions and application in environmental remediation. China: Elsevier.
- XUE Z et al. 2012. Multiple Roles of Extracellular Polymeric Substances on Resistance of Biofilm and Detached Clusters. *Environmental Science & Technology* 46: 13212-13219.
- YIN W et al. 2019. Biofilms: The Microbial "Protective Clothing" in Extreme Environments. *International Journal of Molecular Sciences* 20: 3423.
- ZHANG J et al. 2016. Artificial substrates in zero-water-exchange culture system regulate the rearing performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) under the winter indoor condition. *Aquaculture Research* 47: 91-100.