

AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DE METABÓLITOS MICROBIANOS FRENTE A *Alicyclobacillus acidoterrestris*

Isabelly Tiemi Nagaoka Godoy (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Jéssica Lima de Menezes, Caroline Wolf Trentini Schipfer, Benício Alves de Abreu Filho (Orientador). E-mail: baafilho@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

Ciência de Alimentos/ Ciência e Tecnologia de Alimentos

Palavras-chave: Concentração Inibitória Mínima (CIM), Metabólitos Secundários, Microbiologia de Alimentos.

Resumo:

O trabalho teve como objetivo avaliar a ação de metabólitos obtidos de diversos micro-organismos no combate à *Alicyclobacillus acidoterrestris* 0244^T, bactéria não patogênica deteriorante de sucos de frutas e outros produtos derivados de citros. Para cultivar os microrganismos, foi utilizado meio BAT (*Bacillus acidoterrestris*) para *Alicyclobacillus* spp. e Mueller-Hinton para as demais cepas. Foram obtidos metabólitos de 12 micro-organismos diferentes, sendo eles 11 bactérias e uma levedura. A fim de determinar o potencial e a concentração mínima necessária para que cada substância inibisse o crescimento da bactéria de interesse, foram realizados ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) em microplacas de 96 poços. 9 dos 12 metabólitos apresentaram alguma eficácia no combate a *A. acidoterrestris* 0244^T, sendo o mais potente deles o obtido de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442. As amostras foram submetidas a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e os resultados analisados pelo teste estatístico de variância (ANOVA), que concluiu uma diferença potencial não considerável entre os tratamentos eficazes.

Introdução

Alicyclobacillus spp. são bacilos Gram-positivos, termófilos (crescem em temperaturas entre 25 e 60 °C), acidófilos (se desenvolvem em pH entre 2,4 e 6,0), não patogênicos e formadores de esporos. Esses micro-organismos estão frequentemente associados a deterioração de sucos de frutas, chás, isotônicos e outros produtos derivados de citros, dando a eles um odor e sabor descrito como “semelhante a desinfetante”, podendo, portanto, causar prejuízos ao setor industrial. Dentre as espécies desse gênero, *A. acidoterrestris* é a espécie mais relevante devido a sua capacidade de produzir os compostos responsáveis pela deterioração dos produtos, como o guaiacol (2-metoxifenol) e o 2,6-dibromofenol (ANJOS et al., 2016).

Métodos de pasteurização convencionais não são eficazes contra esporos de *Alicyclobacillus* spp. devido a sua resistência a altas temperaturas, o que justifica a pesquisa de métodos alternativos de controle dessa bactéria (STEYN et al., 2010). Os metabólitos secundários de micro-organismos se fazem uma alternativa promissora, uma vez que já são utilizados em diversas áreas como a medicina, a biotecnologia e a agricultura (SAVI et al., 2019).

O objetivo dessa pesquisa foi avaliar o potencial de metabólitos secundários microbianos contra a bactéria de interesse agro econômico *A. acidoterrestris* 0244^T.

Materiais e métodos

Obtenção dos metabólitos

Foram ativados em caldo com meio de cultura e incubados por 24 horas, 12 micro-organismos (que estavam estocados no Laboratório de Microbiologia de Água, Ambiente e Alimentos na Universidade Estadual de Maringá). Para o cultivo das cepas de *Alicyclobacillus acidoterrestris* CBMAI 0244^r e *A. sendaiensis* KCTC 3843, foi utilizado meio de cultura BAT (*Bacillus acidoterrestris*) com pH ajustado para 4,0 e incubadas durante 24 horas a 45 °C. Para *Saccharomyces cerevisiae* foi utilizado o meio de cultura Sabouraud Dextrose e incubado a 28 °C por 24 horas. As demais cepas (*Bacillus cereus* INCQS 0003, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Staphylococcus aureus* ATCC25923 e *Xanthomonas* sp.) foram cultivadas em meio Mueller-Hinton, sem especificação de pH, a 35 °C por 24 horas. Após esse período foram inoculados em meio de cultura sólido e colocados na estufa, para que depois de outras 24 horas fossem retiradas de 3 a 5 colônias de cada placa e incubadas em caldo novamente na estufa de temperatura adequada para cada cepa. Ao fim desse processo, os cultivos foram transferidos para Eppendorfs e centrifugados por 10 minutos a 10.000 RPM. O sobrenadante foi retirado e filtrado através de membranas estéreis de 0,45 µm e armazenado em geladeira a 4 °C, até a sua utilização.

Preparação do inóculo microbiano

Para padronização do inóculo de *A. acidoterrestris* 0244^T utilizado nas análises, os microrganismos foram ativados em caldo BAT e incubados por 24 horas a 45 °C e então colocados em solução salina a 0,85% para ajustar a turbidez de acordo com o padrão 0,5 da escala McFarland, que apresenta aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. A seguir foi realizada uma diluição 1:10 em caldo BAT, resultando em uma concentração bacteriana de aproximadamente 10^7 UFC/mL, para que, ao ser adicionada ao poço da microplaca já contendo caldo BAT, a concentração final aproximada fosse de 10^4 UFC/mL.

Obtenção da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Para determinar o potencial ativo dos metabólitos, foram utilizados os ensaios de CIM e CBM. A CIM é determinada através de diluições em microplacas

de 96 poços (TPP®). O volume final de cada poço é de 100 µL (caldo BAT mais metabólito), além de 5 µL do inóculo microbiano contendo as células vegetativas de *A. acidoterrestris* 0244^T. O controle negativo continha apenas o meio de cultura e o positivo, o meio e o inóculo. As placas foram incubadas a 45 °C por 24 horas. Em seguida foram submetidos aos ensaios de CBM, em que são colocadas 20 µL de cada poço da placa de CIM em uma placa de Petri com meio solidificado para verificar se há crescimento bacteriano após incubação a 45 °C por 24 horas. Os resultados da CIM são aferidos visualmente, analisando os poços em que o meio passou de translúcido para turvo, indicando crescimento de micro-organismos. O primeiro poço apresenta uma razão de 50% de meio e 50% de metabólito, portanto se há inibição do crescimento da bactéria, conclui-se que é necessária uma concentração de 50% da substância testada; o segundo poço apresenta 25% de metabólito, e assim por diante. Para CBM, os resultados também são determinados visualmente, observando as concentrações já estabelecidas pelo CIM em que não houve crescimento bacteriano no meio ágar.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e análise de variância (ANOVA)

Para o metabólito de *P. aeruginosa* (agente antimicrobiano que apresentou melhor resultado) foi realizado novamente a análise da CIM, para que as células de *A. acidoterrestris* 0244^T tratadas com a substância fossem submetidas a análise em MEV, bem como o controle positivo (células de *A. acidoterrestris* sem tratamento com o metabólito). Após a incubação das amostras a 45 °C/24 h, foi realizada a fixação com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1 M e a adesão em lamínulas pré-tratadas com poli-1-lisina, seguida de desidratação com solução etanólica, posterior ponto crítico em CO₂, folheamento a ouro e análise em microscópio eletrônico de varredura Quanta-250 (Endo, Cortez, Ueda-nakamura, Nakamura, & Dias filho, 2010). A análise estatística foi realizada análise de variância (ANOVA) com diferença significativa determinada por teste de Tukey com $\alpha = 0,05$.

Resultados e Discussão

Foram obtidos e testados metabólitos de 12 microrganismos diferentes (sendo 11 de bactérias e uma levedura), contra as células vegetativas de *A. acidoterrestris* 0244^T. Os ensaios de CIM e CBM foram realizados em triplicata para cada metabólito. Os metabólitos obtidos de *P. aeruginosa* foram os que apresentaram maior eficácia na inibição do crescimento de *A. acidoterrestris* 0244^T, numa concentração de 6,25% de agente antimicrobiano no meio de cultura. As cepas cujos metabólitos obtiveram os menores potenciais inibitórios foram: *A. acidoterrestris* 0244^T, *A. sendaienses* e a levedura *S.cerevisiae*, que não inibiram o crescimento da bactéria de interesse em nenhuma concentração. As células vegetativas de *A. acidoterrestris* 0244^T tratadas com metabólitos de *P. aeruginosa* foram analisadas em MEV (Figura 1A) e comparadas com o controle (Figura 1B). É possível observar que o tratamento com metabólitos proporcionou uma diminuição significativa na quantidade e tamanho das células da bactéria de interesse, além da observação de deformação da célula demonstrando a eficácia do tratamento em inibir o desenvolvimento de *A. acidoterrestris* 0244^T.

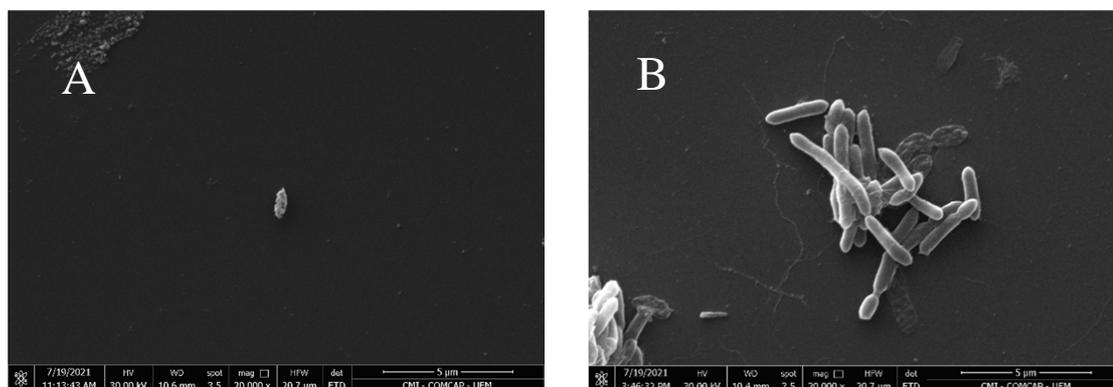


Figura 1 – Células vegetativas de *Alicyclobacillus acidoterrestris* 0244. A: tratadas com metabólitos de *Pseudomonas aeruginosa*. B: controle, sem nenhum tratamento

Conclusões

Foi possível concluir que, a maioria dos metabólitos testados apresentaram inibição contra *A. acidoterrestris*, sendo que o metabólito de *P. aeruginosa* apresentou o melhor resultado de CIM e CBM, em que pode ser visualizado através da microscopia eletrônica de varredura, mostrando assim, uma alternativa e um possível potencial de inibição contra *A. acidoterrestris*.

Agradecimentos

Agradeço à Universidade Estadual de Maringá, ao CNPq e à Fundação Araucária pelo financiamento, ao meu orientador, professor Dr. Benício Alves de Abreu Filho e a toda a equipe do Laboratório de Microbiologia de Água, Ambiente e Alimentos sem as quais esse trabalho não seria possível.

Referências

- ANJOS, M. M. *et al.* Antibacterial activity of papain and bromelain on *Alicyclobacillus* spp., **International Journal of Food Microbiology**, v. 216, p. 121-126, 2016.
- ENDO, H. E. *et al.* Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 7, p. 534–540, 2010.
- SAVI, D.C.; ALUIZIO, R.; GLIENKE, C. Brazilian Plants: An Unexplored Source of Endophytes as Producers of Active Metabolites. **Planta Medica.**, v. 85, n. 8, p. 619-636, 2019.
- STEYN, C.; CAMERON, M.; WITTHUHN, C. Occurrence of *Alicyclobacillus* in the fruit processing environment - A review. **International journal of food microbiology**. v. 147, n. 1, p. 1-11, 2011.