

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas aeruginosa* E ASSOCIAÇÃO FRENTE AO *Alicyclobacillus* spp.

Nycollas Facina (PIBIC/FA/UEM), Pablo Ricardo Sanches de Oliveira (PPC-UEM), Jean Lopes da Silva (PPC/UEM), Francielle Pelegrin Garcia (Coorientadora), Benício Alves de Abreu Filho (Orientador). E-mail: ra124462@uem.br

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, Maringá, PR.

Ciências Biológicas, Microbiologia, Biologia/ Microbiologia de alimentos.

Palavras-chave: Bioprospecção; Biopreservação; *Alicyclobacillus* spp.

RESUMO

O gênero bacteriano *Alicyclobacillus* é conhecido por formar esporos termorresistentes, gram-positiva, considerada um agente deteriorante na indústria de alimentos, levando a danos econômicos, principalmente na de bebidas cítricas. *Bacillus thuringiensis* e *Pseudomonas aeruginosa* são microrganismos conhecidos por produzirem metabólitos secundários com propriedades antibacterianas. Este estudo teve como objetivo analisar a atividade antimicrobiana dos metabólitos secundários de *B. thuringiensis*, *P. aeruginosa* e associação contra espécies de *Alicyclobacillus* spp. Foram realizados ensaios para testar a sensibilidade dos metabólitos, além do teste de *Checkboard* para avaliar a interação entre eles, e foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) dos metabólitos isolados e combinados. Os resultados mostraram diferenças significativas na eficácia antimicrobiana entre os tratamentos, destacando o potencial do uso dos metabólitos produzidos de ambas as bactérias.

INTRODUÇÃO

Alicyclobacillus spp. é um gênero de bacilos Gram-positivos formadores de esporos, resistentes a processos térmicos devido à sua composição de ácidos graxos cíclicos na membrana celular. São termófilos (25 °C a 60 °C) e acidófilos (pH 2,5 a 6,0) e podem alterar o sabor e o odor de alimentos, como sucos cítricos e produtos derivados, ao produzir guaiacol, que causa odor e sabor desagradáveis (ANJOS *et al.*, 2016; DUTRA *et al.*, 2019).

A resistência do *Alicyclobacillus* aos processos térmicos aplicados na pasteurização dos sucos deve-se à sua capacidade de formar esporos, que são dificilmente inibidos por esses métodos. Assim, a bactéria consegue sobreviver, germinar e se proliferar, causando problemas significativos para a qualidade dos sucos de laranja.

Além disso, *Alicyclobacillus* está associado à deterioração de uma variedade de produtos, como sucos, misturas cítricas, concentrados, bebidas de frutas carbonatadas, extrato de tomate e chás (CAI et al., 2019).

A biopreservação usa conservantes naturais, como bactérias e plantas, para garantir a segurança alimentar, retardar a oxidação e prolongar o armazenamento dos alimentos. Esses conservantes são eficazes na inibição de microrganismos e na manutenção da qualidade dos alimentos (PISOSCHI et al., 2018).

Desse modo, o uso de frações de metabólitos secundários de *Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas aeruginosa* e associação apresenta uma aptidão a ser explorada frente ao *Alicyclobacillus* spp.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção das cepas: Todas as cepas utilizadas nesse estudo estão estocadas no Laboratório de Água, Ambiente e Alimentos da Universidade Estadual de Maringá – UEM em freezer a -20 °C.

Obtenção dos metabólitos: Para obter os metabólitos, cada microrganismo foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos após o período de incubação. O sobrenadante obtido foi filtrado em membranas de 0,22 µm e transferido para tubos de ensaio, que foram armazenados a 4 °C. Sendo eles: *Bacillus thuringiensis* berliner (BTB), *Bacillus thuringiensis* kurstaki (BTK) e *Pseudomonas aeruginosa* (P).

Teste de sensibilidade aos metabólitos: Para testar a sensibilidade aos metabólitos, utilizou-se a técnica de difusão em Ágar conforme CLSI (2016).

Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM): Para avaliar a eficácia dos metabólitos contra a bactéria alvo, foram realizados testes de CIM e CBM. A CIM foi medida por meio da técnica de microdiluição em microplaca de 96 poços, conforme a metodologia descrita no CLSI – M07 – A11 (2018).

Checkboard: foi realizado em placa de 96 poços usando os metabólitos secundários de *B. thuringiensis* e *P. aeruginosa* contra células vegetativas de *Alicyclobacillus* spp. As amostras que obtiveram os melhores resultados foram tratadas e submetidas ao MEV.

Análise estatística: Foram avaliadas por análise de variância e teste de Tukey ($P < 0,05$), para comparação de médias foi utilizado o software estatístico SASM - Agri ver.8.2.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No teste de disco-difusão a espécie o melhor resultado para *A. acidoterrestris* apresentou 11 mm para BTK, já BTB, P e o controle não apresentaram halos de inibição. A *A. hesperidum* teve resultados como 15 mm para BTK.

Os resultados da CIM e CBM (Tabela 1) foram resultados satisfatórios pois apresentaram valores de CIM e CBM que variaram de 3,125% a 50%.

O *Checkboard* interação indiferentes no uso da associação BTK + P com fractional inhibitory concentration index (FIC) = 1.

A MEV mostrou os danos causados às células nos diferentes tratamentos.

O tratamento estatístico de ANOVA, que mostrou diferença significativa entre os tratamentos confirmada pelo teste de Tukey.

Tabela 1 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) de metabólitos secundários de *Bacillus thuringiensis* (BTB e BTK), *Pseudomonas aeruginosa* (P) e combinação (P+BTB e P+BTK) frente a *Alicyclobacillus* spp.

Tratamento	Teste (%)	<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	<i>Alicyclobacillus herbarius</i>	<i>Alicyclobacillus acidiphilus</i>	<i>Alicyclobacillus hesperidum</i>	<i>Alicyclobacillus sendaiensis</i>
BTB	CIM	12,5 ^a	25 ^a	6,25 ^b	50 ^a	25 ^a ±
BTB	CBM	>50 ^A	>50 ^A	>50 ^A	>50 ^A	>50 ^A
BTK	CIM	6,25 ^b	12,5 ^b	12,5 ^a	25 ^b	12,5 ^b ±
BTK	CBM	50 ^A	>50 ^A	>50 ^A	50 ^A	>50 ^A
P	CIM	12,5 ^a	12,5 ^b	12,5 ^a	50 ^a	12,5 ^b
P	CBM	>50 ^A	>50 ^A	>50 ^A	>50 ^A	>50 ^A
P+BTB	CIM	12,5 ^a	12,5 ^b	12,5 ^a	12,5 ^c	12,5 ^b ±
P+BTB	CBM	50 ^A	>50 ^A	>50 ^A	25 ^B	25 ^B
P+BTK	CIM	12,5 ^a	12,5 ^b	12,5 ^a	12,5 ^c	12,5 ^b ±
P+BTK	CBM	25 ^B	50 ^A	50 ^A ±	12,5 ^C	50 ^A

a, b, c, diferentes letras na mesma coluna indicam diferença significativa para CIM e A, B, C diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa para CBM nos tratamentos para espécies de *Alicyclobacillus* pelo teste de Tukey (P < 0,05).

CONCLUSÕES

Este estudo permitiu avaliar a atividade antimicrobiana dos metabólitos secundários extraídos de *B. thuringiensis*, *P. aeruginosa* e suas combinações contra

Alicyclobacillus spp.. Para tanto, foram realizadas combinações desses metabólitos contra diferentes espécies, como *A. acidoterrestris*, *A. herbarius*, *A. hesperidum*, *A. sendaiensis* e *A. acidiphilus*. Os resultados obtidos com a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) evidenciaram diferenças visíveis entre o controle e os tratamentos. Os dados demonstraram que os metabólitos secundários de *B. thuringiensis* e *P. aeruginosa* apresentam potencial antibacteriano variável contra as espécies de *Alicyclobacillus*, dependendo do tipo de metabólito e das combinações utilizadas. A variação na eficácia observada indica a necessidade de explorar diferentes combinações e concentrações para otimizar o uso desses metabólitos como agentes antimicrobianos na indústria de alimentos.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha gratidão a Deus por estar me direcionando neste caminho. Agradeço aos meus pais por todo o apoio, ao Prof. Dr. Benício Alves de Abreu Filho pelo aprendizado que eu obtive, ao Pablo por transmitir seus conhecimentos e ajudar durante a pesquisa e aos meus colegas de laboratório. Também agradeço ao CNPq e à Fundação Araucária pelo apoio financeiro e ao COMCAP pela disponibilização dos equipamentos para a pesquisa.

REFERÊNCIAS

ANJOS, M. M.; ENDO, E. H.; LEIMANN, F. V.; GONÇALVES, O. H.; BENEDITO, D. F. P.; ABREU-FILHO, B. A. Preservation of the antibacterial activity of enzymes against *Alicyclobacillus* spp. through microencapsulation. *LWT - Food Science and Technology*, v. 88, p. 18-25, 2018. BIRMAN, J. **Cartografias do avesso**: escrita, ficção e estéticas de subjetivação. Rio de Janeiro: Civilização Brasileira, 2019.

CAI, R.; ZHANG, M.; CUI, L.; YUAN, Y.; YANG, Y.; WANG, Y.; YUE, T. Antibacterial Activity and mechanism of thymol against *Alicyclobacillus acidoterrestris* vegetative cells and spores. *LWT - Food Science and Technology*, v. 105, p. 377-384, 2019.

DUTRA, T. V.; CASTRO, J. C.; MENEZES, J. L. RAMOS, T. R.; PRADO, I. N.; MACHINSKI-JUNIOR, M.; MIKCHA, J. M. G.; ABREU-FILHO, B. A. Bioactivity of oregano (*Origanum vulgare*) essential oil Against *Alicyclobacillus* spp.. **Industrial Crops & Products**, v. 129, p. 145-149, 2019.

PISOSCHI, A. M.; POP, A.; GEORGESCU, C.; TURCUȘ, V.; OLAH, N. K.; MATHE, E. An overview of natural antimicrobials role in food. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 143, p. 922-935, 201

SCHELZ, Z., MOLNAR, J., HOHMANN, J. Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. **Fitoterapia**, 77, 279–285, 2006.