AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE METABÓLITOS BACTERIANOS NA ESPORULAÇÃO EM DIFERENTES ESPÉCIES DE *Bacillus.*

Maria Regina Guedes (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Emilly Brito Ferreira (PPC/UEM), Pablo Ricardo Sanches de Oliveira (PPC/UEM), Fabrícia Gimenes (DBS/UEM), Jean Lopes da Silva (Co-orientador), Prof. Dr. Benício Alves de Abreu Filho (Orientador).
E-mail: ra137387@uem.br.
Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Maringá, PR.
Área e subárea do conhecimento: Ciências Agrárias, Ciência e Tecnologia de Alimentos / Microbiologia de Alimentos.

Palavras-chave: Esporos; Germinação; Actinomicetos.

RESUMO

A germinação de esporos de *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis* é um mecanismo relacionado à resistência desses microrganismos. Este trabalho teve como objetivo acompanhar a cinética de germinação dos esporos das duas espécies e avaliar o potencial dos metabólitos de *Microbacterium hydrothermale* e *Microbacterium paraoxydans*, actinomicetos, como moduladores desse processo. As cepas foram cultivadas em Caldo Nutriente e Ágar Nutriente a 35 °C por quatro dias (24, 48, 72 e 96 horas) e, após a esporulação, os esporos foram purificados por centrifugação e submetidos a choque térmico a 80 °C por 10 minutos. Os extratos foram obtidos a partir do cultivo dos microrganismos em meio TSB, a 28–30 °C por 5–7 dias, seguido de centrifugação e filtração do sobrenadante. Os ensaios foram realizados em microplacas, utilizando os tratamentos controle negativo, controle positivo, indução e inibição. A germinação foi monitorada em espectrofotômetro Multiskan FC a 620 nm, com leituras a cada 10 minutos até 100 minutos, pela redução da densidade óptica. Em *B. subtilis*, *M. hydrothermale* associado à L-alanina apresentou possível efeito sinérgico, atingindo 78,80% de DO, enquanto *M. paraoxydans* apresentou potencial indutor, com 53,47% de DO. Em *B. cereus*, *M. hydrothermale* associado à L-alanina apresentou possível efeito sinérgico, atingindo 80,71% de DO, enquanto *M. paraoxydans* apresentou efeito indutor discreto. Os resultados demonstram que os extratos avaliados apresentam um potencial para a modulação da germinação dos esporos, embora seja necessário estudos adicionais para confirmar a ação dos metabólitos secundários frente aos esporos de *Bacillus*.

INTRODUÇÃO

O gênero *Bacillus* pertence à família *Bacillaceae*, agrupa bactérias Gram-positivas com o formato de bastonetes, sendo bactérias conhecidas pela sua ampla distribuição, no solo, alimentos, água e nas plantas (Klosowski *et al*., 2021; Raman *et al*., 2025). Possuem a capacidade de formar endósporos resistentes às condições ambientais hostis, sendo resistentes ao calor, processos químicos e estresses metabólicos, como falta de nutrientes (Kennedy *et al*., 1994). Os esporos de *Bacillus*

cereus e *Bacillus subtilis* apresentam estruturas especializadas que conferem essa resistência a condições extremas, estando relacionadas ao ácido dipicolínico de cálcio, ao córtex de peptideoglicano e as camadas proteicas (Mckenney *et al.,* 2013). Com a germinação nos alimentos, esses microrganismos podem produzir toxinas capazes de causar problemas de saúde, como síndromes eméticas e diarreicas, principalmente em alimentos ricos em amido, como o arroz (Bottone *et al.,* 2010). Com isso, os Actinomicetos que são conhecidos pela produção de metabólitos secundários com inúmeras atividades biológicas, podem possuir atividade na modulação da germinação dos esporos de *Bacillus* (Selim *et al.,* 2021). O trabalho teve o intuito de investigar a germinação dos *B. cereus* e *B. subtilis* e avaliar o possível potencial dos metabólitos extraídos dos actinomicetos como possíveis indutores ou inibidores desse processo, visando contribuir para aplicações em biotecnologia, segurança alimentar e na saúde.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas as cepas de *Bacillus cereus* ATCC 14579 e *Bacillus subtilis* ATCC 6633, do Laboratório de Microbiologia de Água, Ambiente e Alimentos, UEM. As cepas foram cultivadas em Caldo Ágar Nutriente (NA) com incubação em estufa a 35 °C por quatro dias (24, 48, 72 e 96 horas), monitorando a esporulação por microscopia óptica e determinando o melhor tempo de crescimento. Após a esporulação, os esporos foram suspensos em salina 0,85%, purificados por três ciclos de centrifugação a 10.000 rpm por 3 minutos, seguidos por um choque térmico a 80 °C por 10 minutos para eliminar as células vegetativas remanescentes. No ensaio da germinação, foi utilizado o tampão PBS 1X, o indutor L-alanina e os extratos dos metabólicos escolhidos de *Microbacterium hydrothermale* e *Microbacterium paraoxydans*, que foram preparados a partir do cultivo isolado em meio Tryptic Soy Broth (TSB), a 28-30 °C por 5 dias. Após o cultivo, o sobrenadante livre de células foi obtido através da centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos e submetido a filtração esterilizante em membrana de 0,22 µm. Os ensaios foram realizados em microplacas com volume final de 200 µL, contendo 100 µL de suspensão de esporos. O controle negativo recebeu 100 µL de PBS, enquanto o controle positivo recebeu 80 µL de PBS e 20 µL de L-alanina. No tratamento de indução, foram utilizados 100 µL de extrato, e no tratamento de inibição, 50 µL de extrato, 30 µL de PBS e 20 µL de L-alanina, e foi medido com o espectrofotômetro Multiskan FC a 620nm. As leituras foram realizadas a cada 10 minutos, até o tempo 100, onde a germinação foi acompanhada monitorando a redução da Densidade Óptica (DO) ao longo do tempo, sendo os valores convertidos em porcentagem. As variáveis avaliadas foram o controle negativo, o controle positivo, a indução e a inibição.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta as curvas cinéticas de germinação dos esporos de *B. subtilis* e *B. cereus* submetidos aos extratos metabólicos de *M. hydrothermale* e *M.*

paraoxydans ao longo de 100 minutos. Nos ensaios com *B. subtilis* frente ao extrato de *M. hydrothermale* (Figuras 1A e 1B), foram observados perfis reprodutíveis de estímulo quando associado ao indutor padrão. Na Figura 1A, o extrato isolado manteve a DO estável (~102%), indicando ausência de indução direta. Contudo, quando associado à L-alanina, promoveu uma redução da DO final para 78,80%, superando o controle positivo (83,11%) e caracterizando um efeito sinérgico. Esse comportamento foi ainda mais expressivo no ensaio 1B, onde o extrato isolado funcionou como indutor direto, reduzindo a DO para 53,47% (frente a 65,42% do controle positivo), enquanto a associação com L-alanina culminou na maior germinação observada (47,48% de DO remanescente).

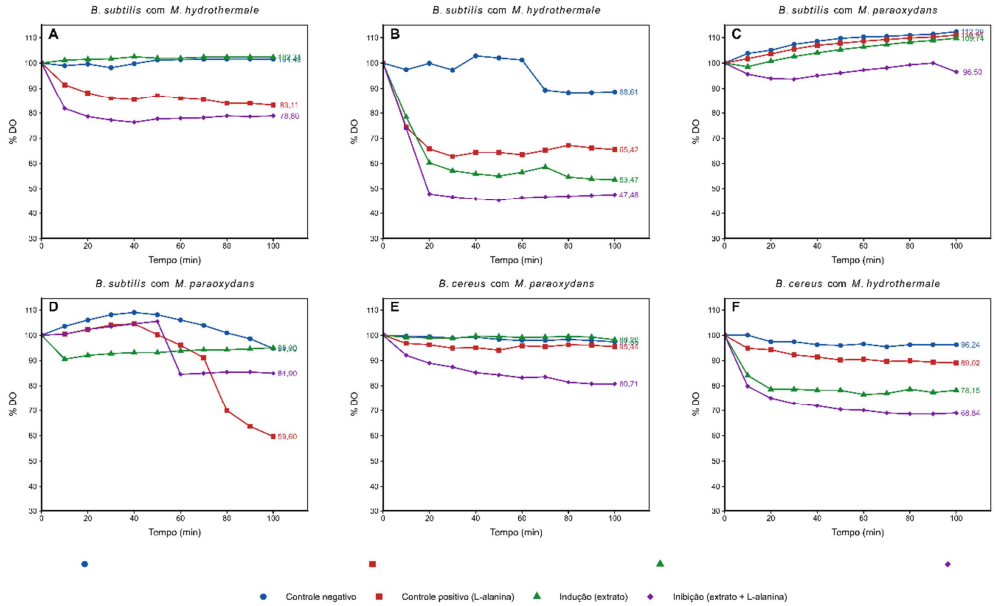


Figura 1. Densidade Óptica (DO) da germinação de esporos de *B. subtilis* e *B. cereus* em relação ao Tempo (min) na presença dos extratos de *M. hydrothermale* e *M. paraoxydans.* Os tratamentos correspondem ao controle negativo e positivo (L-alanina), indução (extrato) e inibição (extrato + L-alanina).

Esse perfil confirma o potencial de metabólitos de *M. hydrothermale* em acelerar a perda de refratilidade dos esporos de *B. subtilis*. Nos ensaios com *M. paraoxydans* (Figuras 1C e 1D) houve variação experimental. A Figura 1C apresentou elevação da DO (>100%) por artefatos operacionais. Já a Figura 1D mostrou efeito inibitório parcial do extrato sobre a germinação mediada por L-alanina (84,90% de DO no grupo inibição vs. 59,60% no controle positivo. Para *B. cereus*, os perfis revelaram respostas espécie-específicas. Em 1 E (*M. paraoxydans*), tanto o extrato isolado quanto o controle mantiveram-se em níveis elevados de DO (>85–98%), indicando dormência preservada e retenção da germinação (DO final de 80,71% no grupo inibição. Já frente ao extrato de *M. hydrothermale* (Figura 1F), a resposta foi marcada enquanto o controle positivo reduziu a DO para 89,02%, o grupo indução atingiu 78,15% e a associação extrato + L-alanina atingiu 68,84%, evidenciando que os metabólitos de *M. hydrothermale* também são capazes de sensibilizar os esporos do patógeno *B. cereus*. Essas respostas diferenciais reforçam que a ação dos metabólitos secundários de actinomicetos depende da interação específica entre as

moléculas bioativas presentes no sobrenadante e os receptores de membrana dos esporos de cada espécie (Selim et al., 2021). O isolado *M. hydrothermale* destacou-se por sua ação estimuladora/sinérgica, enquanto *M. paraoxydans* apresentou maior tendência à estabilização da dormência.

CONCLUSÕES

Os extratos de *M. hydrothermale* e *M. paraoxydans* demonstraram capacidade de modular a germinação de esporos de *B. cereus* e *B. subtilis* de forma espécie-específica. *M. hydrothermale* destacou-se pelo efeito sinérgico com L-alanina, enquanto *M. paraoxydans* demonstrou potencial inibitório. Tais resultados confirmam o potencial biotecnológico dos metabólitos de actinomicetos na modulação da germinação, embora estudos adicionais sejam necessários para elucidar seus mecanismos de ação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Estadual de Maringá, Fundação Araucária (FA) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida e aos meus orientadores pelos ensinamentos.

REFERÊNCIAS

BOTTONE, Edward J. ***Bacillus cereus*, a volatile human pathogen**. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 23, n. 2, p. 382–398, 2010. DOI: 10.1128/CMR.00073-09.

KŁOSOWSKI, Grzegorz; MIKULSKI, Dawid; PIELECH-PRZYBYLSKA, Katarzyna. **Pyrazines biosynthesis by *Bacillus* strains isolated from natto fermented soybean**. *Biomolecules*, v. 11, n. 11, p. 1736, 2021. DOI: https://doi.org/10.3390/biom11111736.

KENNEDY, Max J.; READER, Sarah L.; SWIERCZYNSKI, Lisa M. **Preservation records of micro-organisms: evidence of the tenacity of life**. *Microbiology*, v. 140, n. 10, p. 2513–2529, 1994. DOI: 10.1099/00221287-140-10-2513.

MCKENNEY, Peter T.; DRIKS, Adam; EICHENBERGER, Patrick. **The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat.** *Nature Reviews Microbiology*, v. 11, n. 1, p. 33–44, 2013. DOI: 10.1038/nrmicro2921.

RAMAN, Jegadeesh; NOH, Jun Su; KIM, Jeong-Seon; CHO, Gyeongjun; KIM, Do-Hyun; SONG, Jaekyung; KIM, Soo-Jin. **Role of *Bacillus* species in food industry: advantages and limitations**. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 35, e2507043, 2025. DOI: 10.4014/jmb.2507.07043.

SELIM, Manal Selim Mohamed; ABDELHAMID, Sayeda Abdelrazek; MOHAMED, Sahar Saleh**. Secondary metabolites and biodiversity of actinomycetes**. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, v. 19, n. 1, p. 72, 2021. DOI: 10.1186/s43141-021-00156-9.