



AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Salmonella Typhimurium* E *Escherichia coli* POR SOBRENADANTES DOS CULTIVOS DE *Saccharomyces boulardii* E *Pichia pastoris*

SEHN, Carla Pohl¹ ; MAGALHÃES, Luciane Nunes²; CONCEIÇÃO, Fabrício Rochedo³; MOURA, Tiane Martin⁴; PIRES, Cibele Ferreira⁵; MOREIRA, Ângela Nunes⁶

¹ Centro de Biotecnologia - UFPel. Email: carlasehn@yahoo.com.br

² Faculdade de Nutrição - UFPel. Email: luufpel@yahoo.com.br

³ Centro de Biotecnologia - UFPel. Email: frochedo@ufpel.edu.br

⁴ Faculdade de Nutrição - UFPel. : Email: tianedemoura@gmail.com

⁵ Faculdade de Nutrição - UFPel. Email: cibipires@gmail.com

⁶ Faculdade de Nutrição e Centro de Biotecnologia - UFPel - Caixa Postal 354, Cep 96.010-900, Pelotas, RS, Brasil. Email: angelanm@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

Probióticos, ou seja, microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro, devem apresentar diversas propriedades, sendo a capacidade de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos uma das mais desejáveis. Estudos têm demonstrado que esse efeito pode ocorrer devido à competição por nutrientes, competição pela aderência ao epitélio intestinal, por efeitos imunoestimulatórios sobre a mucosa intestinal, a atividade antissecreatória, à modulação da via de sinalização celular do hospedeiro na resposta pró-inflamatória durante infecções ou, ainda, devido à produção de uma variedade de substâncias com propriedades antimicrobianas, incluindo ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas, que podem afetar não somente a viabilidade celular, mas também o metabolismo bacteriano ou a produção de toxinas (Czerucka & Rampal, 2007; Czerucka & Rampal, 2002).

Estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que *Saccharomyces boulardii*, uma levedura termotolerante (cresce na temperatura de 37°C), resistente às barreiras do trato gastrointestinal e a agentes antibacterianos, e que vem sendo usada em alguns países como agente preventivo e terapêutico para diarreia e outras desordens gastrointestinais causadas pela administração de agentes antimicrobianos, pode ter um efeito protetor contra vários enteropatógenos (Czerucka & Rampal, 2002). Entretanto, os mecanismos através dos quais *Saccharomyces boulardii* exerce seus efeitos benéficos ainda não foram inteiramente elucidados.

Estudos iniciais visando avaliar a utilização de *Pichia pastoris*, uma levedura metilotrófica utilizada como sistema de expressão de proteínas heterólogas, como probiótico, estão em andamento no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas.

O objetivo desse estudo foi avaliar a capacidade de inibição *in vitro* do crescimento de *Salmonella* Typhimurium e *Escherichia coli* por substâncias presentes nos sobrenadantes dos cultivos de *Saccharomyces boulardii* e *Pichia pastoris*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Microrganismos e condições de cultivo

Saccharomyces boulardii e *Pichia pastoris* foram cultivadas em caldo YPD por 48 h à 28° C, 150 rpm. *Salmonella* Typhimurium e *Escherichia coli* foram cultivadas em caldo BHI a 37° C, 200 rpm por 24 h.

2.2 Preparo dos sobrenadantes dos cultivos de *Saccharomyces boulardii* e *Pichia pastoris*

O preparo dos sobrenadantes dos cultivos foi realizado utilizando-se metodologia descrita por Millette et al. (2007) com modificações. Cultivos de 48 h de *Saccharomyces boulardii* e *Pichia pastoris* foram centrifugados a 12000 g por 10' a 4°C, as células reservadas e os sobrenadantes, e uma amostra de caldo YPD não inoculado (controle), foram concentrados 10 vezes. Os pHs dos sobrenadantes foram medidos, uma alíquota de cada foi reservada e denominada sobrenadante ácido, uma segunda alíquota dos sobrenadantes teve seu pH ajustado a 7,2 com hidróxido de sódio 1M e foi denominada sobrenadante neutro. O mesmo procedimento foi realizado com o caldo YPD. O pellet contendo as células das leveduras foi suspenso em um volume de caldo YPD 10 vezes menor que o do cultivo inicial e as células foram sonicadas por 10' em ultra-som. Essa fração foi denominada sobrenadante de células sonicadas. Todos os sobrenadantes obtidos foram esterilizados por filtração utilizando-se filtro 0,22 µm.

2.3 Porcentagem de inibição do crescimento de *Salmonella* Typhimurium e *Escherichia coli* por sobrenadantes dos cultivos de *Saccharomyces boulardii* e *Pichia pastoris*

O cálculo da porcentagem de inibição do crescimento de *Salmonella* Typhimurium e *Escherichia coli* por sobrenadantes dos cultivos de *Saccharomyces boulardii* e *Pichia pastoris* foi realizado utilizando-se metodologia descrita por Millette et al. (2007) com modificações. Para isso, 100 µL de caldo BHI, 100 µL de cada sobrenadante e 50 µL de uma suspensão contendo 10⁶ UFC/mL de cada patógeno avaliado ou salina estéril (branco) foram adicionados às cavidades de uma placa de 96 cavidades estéril. A placa foi incubada a 28°C e o crescimento microbiano monitorado a 650 nm usando espectrofotômetro. A porcentagem de inibição do crescimento do patógeno pelo sobrenadante foi calculada após 12 h de incubação da placa. Os dados foram sujeitos a seguinte equação:

$$A_{\text{calculado}} = A_{\text{amostras}} - A_{\text{branco}}$$

Onde:

$A_{amostras}$ = absorvância da cavidade contendo 50 μ L do patógeno, 100 μ L de caldo BHI e 100 μ L de cada sobrenadante;

A_{branco} = absorvância da cavidade contendo o branco (50 μ L de salina), 100 μ L de caldo BHI e 100 μ L de cada sobrenadante;

$A_{calculado}$ = absorvância calculada de cada amostra.

A porcentagem de inibição do patógeno foi calculada utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de inibição} = 1,00 - \frac{A_{tratamento}}{A_{BHI}} \times 100$$

Onde:

$A_{tratamento}$ = valor de $A_{calculado}$ na presença do patógeno em BHI + sobrenadante;

A_{BHI} = valor de $A_{calculado}$ na presença do patógeno em BHI;

% de inibição = % de inibição do crescimento do patógeno pela presença do sobrenadante.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As Tabelas 1 e 2 apresentam as porcentagens de inibição do crescimento de *Salmonella* Typhimurium e *Escherichia coli* quando cultivadas na presença de sobrenadantes dos cultivos de *Saccharomyces boulardii* e *Pichia pastoris* e, de caldo YPD concentrado e caldo YPD concentrado ácido, respectivamente.

Tabela 1. Porcentagens de inibição do crescimento de *Salmonella* Typhimurium e *Escherichia coli* quando cultivadas na presença de sobrenadantes dos cultivos de *Saccharomyces boulardii* e *Pichia pastoris*.

Sobrenadantes avaliados	Porcentagem de inibição dos patógenos na presença de diferentes sobrenadantes			
	<i>Saccharomyces boulardii</i>		<i>Pichia pastoris</i>	
	<i>Salmonella</i> Typhimurium	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella</i> Typhimurium	<i>Escherichia coli</i>
Sobrenadante ácido	99	98,5	30,1	0
Sobrenadante neutro	54,4	30,4	0	0
Sobrenadante de células sonicadas	79,8	76,9	0	0

Tabela 2. Porcentagens de inibição do crescimento de *Salmonella* Typhimurium e *Escherichia coli* quando cultivadas em caldo YPD concentrado e em caldo YPD concentrado ácido.

Caldos avaliados	Porcentagem de inibição dos patógenos cultivados em caldo YPD concentrado e ácido	
	<i>Salmonella</i> Typhimurium	<i>Escherichia coli</i>
YPD concentrado	60,2	40,0
YPD concentrado ácido	76,2	40,9

Observou-se que os sobrenadantes de *Saccharomyces boulardii* apresentaram um maior efeito inibitório sobre o crescimento dos patógenos avaliados e que, entre estes, a *Salmonella* foi o mais sensível. Com relação à *Pichia pastoris*, somente o sobrenadante ácido de seu cultivo apresentou efeito inibitório sobre *Salmonella Typhimurium*.

Pôde-se observar, também, o efeito do pH ácido sobre o crescimento, visto que as inibições foram maiores quando o pH dos sobrenadantes eram ácidos. Entretanto, o sobrenadante neutro de *Saccharomyces boulardii* ainda apresentou uma atividade antimicrobiana relativamente elevada. Millete et al. (2007) também observaram uma redução significativa da atividade antimicrobiana após neutralização do sobrenadante dos *Lactobacillus* avaliados a pH 6,5 contra todos os patógenos avaliados e a ocorrência de atividade antimicrobiana residual da fração neutralizada. Além disso, foi verificado que a sonicação das células de *Saccharomyces boulardii* provavelmente liberou substâncias capazes de inibir o crescimento dos patógenos avaliados, visto que ocorreu uma elevada porcentagem de inibição do crescimento dessas bactérias quando cultivadas na presença desse sobrenadante.

A elevada porcentagem de inibição do crescimento dos patógenos quando cultivados com o caldo YPD concentrado (Tabela 2) indica a presença de substâncias inibidoras neste caldo. Dessa forma, parte da inibição observada após a incubação com os sobrenadantes avaliados se deve a essas substâncias. Entretanto, o sobrenadante de células sonicadas de *Saccharomyces boulardii* ainda apresentou uma atividade antimicrobiana residual. De acordo com Turcotte et al. (2004), testes de inibição do crescimento de patógenos em microplacas são mais sensíveis que testes de difusão em ágar, resultado esse confirmado no presente trabalho em comparação com outro estudo realizado em nosso laboratório utilizando o teste de difusão em ágar e no estudo de Millette et al. (2007).

4. CONCLUSÃO

A atividade antimicrobiana observada no presente estudo parece ter ocorrido devido à presença de ácidos orgânicos liberados pelo metabolismo das leveduras e à presença de substâncias inibitórias no caldo concentrado. Os resultados sugerem também que *Saccharomyces boulardii* e *Pichia pastoris* não liberam, durante seu crescimento, outras substâncias antimicrobianas capazes de inibirem o crescimento de *Salmonella Typhimurium* e *Escherichia coli*. Entretanto, a lise das células de *Saccharomyces boulardii* parece ter liberado substâncias capazes de inibir o crescimento dos patógenos avaliados, visto que essa fração apresentou uma atividade antimicrobiana residual.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CZERUCKA, D.; PICHE, T.; RAMPAL, P. Review article: yeast as probiotics - *Saccharomyces boulardii*. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 26, p. 767-773, 2007.

CZERUCKA, D.; RAMPAL, P. Experimental effects of *Saccharomyces boulardii* on diarrheal pathogens. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 733-739, 2002.

MILETTE, M.; LUQUET, F.M.; LACROIX, M. *In vitro* growth control of selected pathogens by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*-fermented milk, **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, p.314-319, 2007.

TURCOTTE,C.;LACROIX,C.;KHEADR,E.;GRIGNON.,L; FLISS,I.. A rapid microplate bioassay for accurate quantification of latic acid bacteria bacteriocins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 90, p.283-293, 2004.