



INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO *in vitro* DE *Salmonella Typhimurium* POR *Pichia pastoris*

FRANÇA, Rodrigo Correa^{1,2}; CORRÊA, Morgana da Silva³; MENDONÇA, Marcelo^{1,2}; SILVA, Vanessa Silva da¹; CASTELLI, Regina Maria^{1,2}; HAUBERT, Louise²; CONCEIÇÃO, Fabrício Rochedo¹; MOREIRA, Ângela nunes^{1,3}; SILVA, Wladimir Padilha².

¹Centro de Biotecnologia – UFPel; ²Lab. Microbiologia de Alimentos, DCTA/FAEM – UFPel;

³Faculdade de Nutrição – UFPel Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900, rodrigodfranca@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

Probióticos podem ser definidos como microrganismos, bactérias ou leveduras, que ao serem ingeridos trazem benefícios à saúde do hospedeiro (Vandenplas *et al.* 2008). Existem alguns critérios a serem considerados para qualificarmos um microrganismo como probiótico. A tolerância ao baixo pH, enzimas digestivas e sais biliares são pré-requisitos fundamentais para a sobrevivência do microrganismo à passagem através do trato gastrointestinal (TGI). Além disso, a capacidade de se aderir à superfície da mucosa intestinal é uma característica recomendada para assegurar a permanência do probiótico por longos períodos no TGI (Ouwehand *et al.* 1999). Outro critério importante para que um microrganismo apresente potencial probiótico é o efeito protetor direto ou indireto contra enteropatógenos. Mecanismos de ação direta incluem a produção de substâncias antimicrobianas, que apresentam efeito inibitório ou letal para o patógeno (Vandenbergh, 1993); inibição da adesão dos patógenos à mucosa intestinal, seja devido à co-agregação entre probiótico e patógeno ou por competição pelos sítios de adesão (Czerucka & Rampal, 2002); competição por nutrientes e inibição da produção ou ação de toxinas microbianas (Brandão *et al.* 1998).

Bactérias do gênero *Salmonella* estão entre os principais agentes causadores de doenças de origem alimentar no mundo todo. Salmonelas são enterobactérias Gram-negativas, patogênicas para humanos e animais e amplamente distribuídas na natureza. Dentre os mais de 2500 sorovares identificados pertencentes a esse gênero, *Salmonella Typhimurium* é um dos mais envolvidos em casos de salmonelose humana (Vugia *et al.* 2004).

Pichia pastoris é uma levedura da família Saccharomycetaceae, gênero *Pichia*, utilizada como sistema de expressão de proteínas recombinantes em larga escala. É capaz de alcançar altos níveis celulares de expressão e de realizar modificações pós-traducionais (Cregg, 2008). Estudos iniciais visando avaliar a

utilização de *P. pastoris* como probiótico estão em andamento na Universidade Federal de Pelotas. Entretanto, a capacidade dessa levedura de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos, como por exemplo, a *Salmonella* em meio líquido, ainda não foi avaliada. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a capacidade da levedura *P. pastoris* de inibir o crescimento, *in vitro*, de *S. Typhimurium*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Microrganismos e condições de cultivo

Para utilização nos experimentos, colônias de *P. pastoris cepa X-33* isoladas em Ágar Yeast Peptone Dextrose (YPD) foram cultivadas em 3 mL de caldo Luria Bertani (LB) e incubadas overnight a 30°C em agitador orbital (150 rpm). Uma colônia isolada de *S. Typhimurium* foi cultivada em 3 mL de caldo LB, a 37°C, overnight, 200 rpm. Em seguida, 0,5 mL dos cultivos foram adicionados a tubos contendo 9,5 mL dos respectivos meios (YPD e LB). Os tubos contendo cultivos de *P. pastoris* e *S. Typhimurium* foram incubados sob agitação por 24 h a 30°C e a 37°C, respectivamente.

2.2 Teste inibitório em caldo

A interferência da levedura *P. pastoris* no crescimento de *S. Typhimurium* foi avaliada utilizando-se metodologia descrita por Drago *et al.* (1997), com modificações, através da co-incubação de 10⁶ UFC de cada microrganismo em tubos contendo 9 ml de caldo LB. Cultivos puros de cada microrganismo foram utilizados como controles. Os tubos foram cultivados a temperatura de 37°C sob agitação de 150 rpm e, após 24 horas, alíquotas foram coletadas, diluídas em série decimal e plaqueadas em duplicatas para determinação do número de células viáveis de cada microrganismo. Para a contagem da levedura foi utilizado Ágar Batata Dextrose (BDA) pH 5,2 e para contagem de *S. Typhimurium*, Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A capacidade da levedura *P. pastoris* inibir o crescimento *in vitro* de *S. Typhimurium* foi avaliada através do teste de inibição em caldo. *P. pastoris* inibiu o crescimento de *S. Typhimurium* após 24 h de incubação. Ocorreu uma redução de aproximadamente 57% da população bacteriana quando a bactéria alvo foi co-cultivada com *P. pastoris*, ou seja, a contagem de *S. Typhimurium* na presença de *P. pastoris* foi aproximadamente 2 vezes menor do que a obtida na ausência da levedura. O crescimento de *Salmonella* em caldos também foi reduzido após co-cultivo desta com *Lactobacillus* (Drago *et al* 1997).

Em outro estudo, Millette *et al.* (2007) demonstrou que bactérias probióticas inibiram o crescimento de bactérias patogênicas em meios de cultura, e a maior inibição ocorreu sobre as bactérias Gram-positivas. Esse resultado pode justificar a leve inibição do crescimento de *S. Typhimurium* ocorrida no presente estudo.

Entretanto, embora a temperatura de crescimento ideal de *P. pastoris* seja 30° C, esta foi capaz de inibir o crescimento de *S. Typhimurium* a 37° C, a temperatura corporal e ideal para o crescimento de enterobactérias.

4.CONCLUSÃO

A levedura *P. pastoris* inibiu o crescimento *in vitro* da bactéria patogênica *S. Typhimurium* quando cultivada à temperatura corporal. Testes de inibição do crescimento de outras bactérias patogênicas de importância em alimentos por *P. pastoris* serão realizados para avaliar o potencial antimicrobiano dessa levedura contra outros patógenos. Além disso, seu potencial antimicrobiano será avaliado em experimentos *in vivo*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRANDÃO R., I.M. CASTRO, E.A. BAMBIRRA, S.C. AMARAL, L.G. FIETTO, M.J.M. TROPIA, M.J, NEVES, R.G. DOS. SANTOS, N.C.M. GOMES, J. NICOLI, Intracellular signal triggered by cholera toxin in *Saccharomyces boulardii* and *Saccharomyces cerevisiae*, **Appl. Environ. Microbiol.** n 64 (1998) 564-568.

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

DRAGO L., Inhibition of in vitro growth of enteropathogens by new *Lactobacillus* isolates of human intestinal origin, **FEMS Microbiology Letters**, n 153, p.455-463, 1997.

CREGG J. The *Pichia* System, **Keck Graduate Institute**, Claremont, California. Disponível em http://rctech.com/pichia/pichia_system.pdf Capturado em 09/06/2008.

MILETTE M., In vitro growth control of selected pathogens by *Lactobacillus acidophilus* casein-fermented milk, **Letters in Applied Microbiology** n 44, p.314-319, 2007.

OUWEHAND, A.C., KIRJAVAINEN, P.V., SHORTT, C., SALMINEN, S., Probiotics: mechanisms and established effects. **International Dairy Journal** n 9, p. 43–52, 1999.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; AURA, A.M.; OKSMANCALDENTY, K.M.; MYLLÄRINEN, P.; SAARELA, M.; MATTILA-SANHOLM, T.; POUTANEN, K. Development of functional ingredients for gut health. **Trends Food Sci. Technol., Amsterdam**, v.13, p.3-11, 2002.

VUGIA, D.J., SAMUEL, M., FARLEY, M.M., MARCUS, R., SHIFERAW, B., SHALLOW, S., SMITH, K., ANGULO, F.J. **The Emerging Infections Program** (2004).

VANDENBERH, P.A. (1993) Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. **FEMS Microbiol Rev** 12. p.221–238.

VANDENPLAS, YVAN & OSCAR BRUNSER & HANIA SZAJEWSKA, *Saccharomyces boulardii* in childhood, **Published online**: 19 December 2008.