



INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO *in vitro* DE *Escherichia coli* 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, Fabricio 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 vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (Zárate & Nader-Macias, 2006). Um critério importante para que um microrganismo apresente potencial probiótico é a capacidade de proteger o trato gastrointestinal do hospedeiro da ação de enteropatógenos. Mecanismos de ação 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 (Bernet *et al.* 1994); inibição da produção ou ação de toxinas microbianas (Czerucka *et al.* 1994; Brandão *et al.* 1998) e modulação da microbiota intestinal ou do sistema imune do hospedeiro (Kaila *et al.* 1992).

Probióticos que apresentam efeito protetor contra enteropatógenos podem ser utilizados na prevenção ou como uma alternativa a antibióticos no tratamento de doenças de origem alimentar (Drago *et al.* 1997), tais como a causada por *Escherichia coli.*, bactéria que faz parte da microbiota intestinal normal. Entretanto, algumas cepas são patogênicas e podem causar danos ao organismo (Franco *et al.* 1996).

Pichia pastoris é uma levedura metilotrófica utilizada como sistema de expressão para diversos tipos de proteínas. É capaz de realizar modificações pós-traducionais e de alcançar altos níveis celulares de expressão, o que permite que grandes quantidades de proteínas sejam produzidas (Cereghino & Cregg, 2000). Como probióticos recombinantes, além de apresentarem os efeitos benéficos conhecidos podem apresentar outras propriedades desejáveis. A utilização da levedura *P. pastoris* como probiótico capaz de expressar proteínas terapêuticas ou imunogênicas de interesse torna-se atrativa. 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 *Escherichia coli* em meio líquido ainda não foi avaliada.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a capacidade da levedura *P. pastoris* de inibir o crescimento *in vitro* de *Escherichia coli*.

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 YPD e caldo Luria Bertani (LB) e incubadas overnight a 30°C em agitador orbital (150 rpm). Uma colônia isolada de *Escherichia coli* 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 *E. coli* foram incubados sob agitação por 24 h a 30°C e a 37°C, respectivamente.

2.2 Teste de inibição em caldo

A interferência da levedura *Pichia pastoris* no crescimento de *Escherichia coli* 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 YPD ou 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 *E. coli*, Ágar EMB - Levine.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudos iniciais visando avaliar a utilização de *P. pastoris* como probiótico estão sendo realizados na Universidade Federal de Pelotas. Em um estudo, foi avaliada a influência de *P. pastoris* e sua variante recombinante contendo o gene da fosfolipase C de *Clostridium perfringens* sobre a eficiência alimentar e a estimulação do sistema imune de frangos de corte contra a toxina α de *C. perfringens*. Animais alimentados com *P. pastoris* selvagem e recombinante apresentaram melhora nos índices de eficiência alimentar (conversão alimentar e ganho de peso), na soroconversão e não apresentaram alterações histopatológicas significativas (Storch *et al.* 2008). Entretanto, o potencial antimicrobiano de *P. pastoris* ainda não tinha sido avaliado.

A capacidade da levedura *P. pastoris* inibir o crescimento *in vitro* de *Escherichia coli* foi avaliada através do teste de inibição em caldo. *Pichia pastoris*

inibiu o crescimento de *Escherichia coli* após 24 h de incubação (Tabela 1) em ambos os caldos avaliados. Ocorreu uma redução de aproximadamente 86% da população bacteriana quando o co-cultivo ocorreu em caldo LB e de 67% quando ocorreu em caldo YPD, ou seja, contagens de *E. coli* na presença de *P. pastoris* foram 7 e 3 vezes menores do que as obtidas na ausência da levedura em caldo LB e YPD, respectivamente.

Tabela 1. Concentração (UFC.ml⁻¹) de *Escherichia coli* após 24 h de incubação em caldo LB e YPD na ausência (monocultura) e presença de *P. pastoris* (co-cultura) e porcentagens de inibição do crescimento.

Caldo de enriquecimento	Concentração (UFC.ml ⁻¹) de <i>Escherichia coli</i> após 24 h de incubação		Porcentagem de inibição (%)
	Monocultura	Co-cultura	
Caldo LB	7 x 10 ⁷	1 x 10 ⁷	86
Caldo YPD	1,5 x 10 ⁷	5 x 10 ⁶	67

Para evitar o favorecimento do crescimento de um ou outro microrganismo em função do meio utilizado, foram avaliados 2 caldos: o LB e o YPD, que são comumente utilizados para o crescimento de bactérias e leveduras, respectivamente. *P. pastoris* foi capaz de inibir o crescimento de *E. coli* quando co-cultivada em ambos os caldos avaliados, e a porcentagem de inibição foi maior quando utilizado o caldo LB. Esse resultado sugere que a inibição do crescimento de *E. coli* por *P. pastoris* não sofreu interferência do meio utilizado.

Além disso, o experimento foi realizado a 37° C. Embora a temperatura de crescimento ideal de *P. pastoris* seja 30° C, esta foi capaz de inibir significativamente o crescimento de *E. coli* a 37° C, a temperatura corporal e ideal para o crescimento de enterobactérias.

4. CONCLUSÃO

A levedura *Pichia pastoris* inibiu significativamente o crescimento *in vitro* da bactéria patogênica *Escherichia coli* 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

BERNET, MF.; BRASSART, D.; NEESER, JR.; SERVIN, AL., *Lactobacillus acidophilus* LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. **Gut**. 1994 April; v. 35(4): 483–489.

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.

CEREGHINO, JL; CREGG, JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiol Rev.** 2000 Jan; 24(1):45-66.

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

CZERUCKA, D; ROUX, I; RAMPAL, P. *Saccharomyces boulardii* inhibits secretagogue-mediated adenosine 3'5'-cyclic monophosphate induction in intestinal cells. **Gastroenterol**, n 106. p.65-72, 1994.

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.

FRANCO, B.D.G.M, LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1996.

KAILA M; ISOLAURI E; SOPPI E; VIRTANEN E; LAINE S; ARVILOMMI H. Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human *Lactobacillus* strain. **Pediatr Res.** Aug; n 32(2) p.141-144, 1992.

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.

STORCH, O.B.; GIL DE LOS SANTOS, J.R ,**Avaliação de *Pichia pastoris* e *Pichia pastoris* recombinante contendo o gene da fosfolipase C de *Clostridium perfringens* como probióticos para frangos de corte**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, p. 52, 2008.

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

ZÁRATE, G.; NADER-MACIAS, M.E. Influence of probiotic vaginal lactobacilli on in vitro adhesion of urogenital pathogens to vaginal epithelial cells. **Letters in Applied Microbiology**, v.43, n.2, p.174-180, 2006.