

## INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO *in vitro* DE *Listeria monocytogenes* POR *Pichia pastoris*

FRANÇA, Rodrigo Correa <sup>1</sup>; HAUBERT, Louise <sup>1, 2</sup>; SILVA, Wladimir Padilha da <sup>2</sup>; CONCEIÇÃO, Fabricio Rochedo <sup>1</sup>; MOREIRA, Ângela Nunes <sup>1, 3</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Imunologia Aplicada, CDTEC – UFPel; <sup>2</sup>Laboratório de Microbiologia de Alimentos, DCTA/FAEM – UFPel; <sup>3</sup>Faculdade de Nutrição – UFPel.  
Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900  
louisehaubert@hotmail.com

### 1 INTRODUÇÃO

O patógeno alimentar *Listeria monocytogenes* é um micro-organismo ubíquo, intracelular facultativo e o agente causador da listeriose, uma doença severa que cursa com baixas taxas de morbidade, mas com altas taxas de mortalidade (WHO/FAO, 2004). Esta bactéria se caracteriza por ser patogênica principalmente para indivíduos de grupos de risco, como imunocomprometidos, idosos, neonatos e pacientes com HIV. A proliferação deste patógeno pode ocasionar bacteremia, meningites e endocardite. No caso de mulheres grávidas pode também causar aborto, parto prematuro e septicemia neonatal (COSSART, 2007).

Probióticos podem ser definidos como sendo micro-organismos vivos que ao serem administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro (SCHREZENMEIR & DE VRESE, 2001). Dentre estes benefícios podemos destacar os de ação direta, como a regulação da microbiota saprófita e a ação antimicrobiana contra patógenos alimentares. Dentre os mecanismos de ação indireta podemos destacar a modulação da microbiota intestinal ou do sistema imune do hospedeiro (KAILA *et al.*, 1992).

*Pichia pastoris* é uma levedura da família *Saccharomycetaceae*, gênero *Pichia*, que é amplamente utilizada na produção de proteínas recombinantes. A levedura produz grande quantidade de células por litro, e é capaz de utilizar fontes de carbono alternativas, tal como o metanol e o glicerol resultante da fabricação de biodiesel, devido à presença dos genes Álcool Oxidase I e II (AOX1 e AOX2) (STORCH, 2008; FONSECA, 2006).

No estudo de Storch *et al.* (2008), *P. pastoris* caracterizou melhora nos índices de eficiência alimentar e imunomodulação, gerando maior ganho de peso e soroconversão nos animais suplementados. Dentro deste contexto sua utilização como probiótico está sendo estudada no Núcleo de Desenvolvimento Tecnológico da UFPel (CDTEC/UFPel). Estudos iniciais demonstraram que *P. pastoris* é inócua e capaz de resistir a passagem através do trato gastrointestinal de mamíferos e de inibir o crescimento de *S. Typhimurium* e *E. coli in vitro*. Por esses motivos, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a capacidade da levedura *P. pastoris* inibir o crescimento *in vitro* de *L. monocytogenes*.

### 2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

#### 2.1 Micro-organismos 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

incubadas overnight a 30°C em agitador orbital (150 rpm). Colônias isoladas de *L. monocytogenes* cepa Scott A foram cultivadas em 3 mL de caldo Triptone Soya Broth suplementado com 0,6% de Yeast Extract (TSBYE), a 37°C, *overnight* a 150 rpm. Em seguida, 0,5 mL de ambos cultivos foram adicionados a tubos contendo 9,5 mL dos respectivos meios (YPD e TSBYE). Os tubos contendo cultivos de *P. pastoris* e *L. monocytogenes* 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 *P. pastoris* no crescimento de *L. monocytogenes* foi avaliada utilizando-se metodologia descrita por Drago *et al.* (1997), com modificações, através da co-incubação de cada micro-organismo em tubos contendo 9 mL de caldo YPD ou de caldo TSBYE. Cultivos puros de cada micro-organismo foram utilizados como controles. Os tubos foram cultivados a temperatura de 37°C sob agitação de 150 rpm e, após 8 e 24 horas, alíquotas foram coletadas, diluídas em série decimal e plaqueadas em triplicatas para determinação do número de células viáveis dos micro-organismos. Para a contagem da levedura foi utilizado Ágar Yeast Peptone Dextrose (YPD) e para contagem de *L. monocytogenes* Ágar Oxford modificado.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A capacidade da levedura *P. pastoris* inibir o crescimento *in vitro* de *L. monocytogenes* foi avaliada através do teste de inibição em dois diferentes caldos. O inóculo inicial de *P. pastoris* foi de  $8 \times 10^5$  UFC/mL e de *L. monocytogenes*  $3 \times 10^7$  UFC/mL. Após incubação por 8 e 24 h em caldo YPD a 37°C, foi observado que, quando os micro-organismos foram co-cultivados, ocorreu redução de 61 e 90% do crescimento de *L. monocytogenes*, respectivamente. No entanto, quando os micro-organismos foram co-cultivados em caldo TSBYE, não ocorreu inibição do crescimento.

Em outro estudo de nosso grupo de pesquisa, *P. pastoris* inibiu o crescimento de *S. Typhimurium* e *E. coli* nos meios de cultivo não seletivos YPD e Luria-Bertani (LB) após 24 h de incubação a 37°C. Ocorreu redução de aproximadamente 86 e 67% da população de *E. coli* quando co-cultivada com *P. pastoris* nos caldos LB e YPD, respectivamente, e de 50% da população de *S. Typhimurium* quando o enteropatógeno foi co-cultivado com *P. pastoris* em ambos os caldos (FRANÇA *et al.*, 2009). Esse efeito antimicrobiano é relevante, pois devido às restrições impostas pelos mercados consumidores ao uso de antibióticos e outros quimioterápicos, tanto para uso terapêutico como para a prevenção de doenças, o desenvolvimento de probióticos se torna uma área bastante promissora (ERICKSON & HUBBARD, 2000). E embora a temperatura de crescimento ideal de *P. pastoris* seja 30°C, esta foi capaz de inibir o crescimento de *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* e *E. coli* a 37°C, a temperatura corporal e ideal para o desenvolvimento e proliferação de enterobactérias.

## 4 CONCLUSÃO

A levedura *P. pastoris* inibiu o crescimento *in vitro* da bactéria patogênica *L. monocytogenes* quando cultivada à temperatura corporal em caldo YPD. Outros

experimentos visando avaliar potenciais efeitos probióticos de *P. pastoris*, como o desafio *in vivo* frente à enteropatógenos, bem como experimentos de imunomodulação, estão sendo realizados por nosso grupo de pesquisa.

## 5 REFERÊNCIAS

COSSART, P. Listeriology (1926-2007): the rise of a model pathogen. **Microbes and Infection**, v. 9, p. 1143-1146, 2007.

DRAGO L., Inhibition of *in vitro* growth of enteropathogens by new *Lactobacillus* isolates of human intestinal origin, **FEMS Microbiology Letters** v.153, n. 2, p.455-463, 1997.

ERICKSON, L. K.; HUBBARD, E. N. Probiotic immunomodulation in health and disease. **Journal of Nutrition**, v. 130, n. 2S Suppl, p.403-109, 2000.

FONSECA, M.C.; **Produção de estreptavidina recombinante pela levedura *Pichia pastoris***. 2006. Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa.

FRANÇA *et al.* Avaliação IN VITRO do potencial probiótico antimicrobiano *Pichia pastoris*. In: 25º. **CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA**, Porto de Galinhas, 12/11/09. 25º. Congresso Brasileiro de Microbiologia.

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, n. 2, p.141-144, 1992.

SCHREZENMEIR, J.; DE VRESE, M. Probiotics, prebiotics and symbiotics: approaching a definition. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 2, p. 361S-364, 2001.

STORCH, Otávio Brod. **Avaliação de *Pichia pastoris* e *Pichia pastoris* recombinante contendo o gene da fosfolipase C de *Clostridium perfringens* como probióticos para frangos de corte**. 2008. Dissertação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 17/11/08.

WHO/FAO. Food and Agriculture Organization/World Health Organization. **Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods**. technical report. Disponível em: <<http://www.who.int/foodsafety>, 2004> Acesso em: 15 ago 2011.