



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76
Recredenciamento pelo Decreto nº 17.228 de 25/11/2016



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENAÇÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

XXIII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS SEMANA NACIONAL DE CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA - 2019

IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS ISOLADAS DA REGIÃO DO SEMIÁRIDO BAIANO ATRAVÉS DA TAXONOMIA POLIFÁSICA

Amanda Pereira Texeira¹; Elinalva Maciel Paulo²; Eddy José Francisco de Oliveira³

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduanda em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail:

amandatexeira28@hotmail.com

2. Orientadora, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-

mail: elinalvamaciell@yahoo.com.br

3. Participante, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: eddyfo@uefs.br

PALAVRAS-CHAVE: Taxonomia polifásica; bactérias láticas; semiárido baiano.

INTRODUÇÃO

Culturas *starters* são preparações com microrganismos vivos ou em estado latente utilizadas para iniciar uma fermentação. As bactérias láticas (BAL) de origem importada são bastante empregadas para este fim na elaboração de vários produtos, no entanto, Paulo (2010) obteve isolados de BAL de substratos provenientes do semiárido baiano, demonstrando que estas possuem um crescimento rápido e eficiente na produção de metabólitos secundários de interesse industrial, e que podem ser utilizadas como culturas *starters*.

A identificação a nível de espécie é necessária para qualquer microrganismo incorporado na cultura *starter*. Para isso, atualmente se utiliza a taxonomia polifásica que consiste no uso de diferentes métodos de identificação, visando integrar diversas informações dos microrganismos, sendo capaz de distinguir espécies fenotipicamente similares, mas genotipicamente diferentes (DONATO, 2007). Desta forma, devido à importância biotecnológica das bactérias láticas, este trabalho objetivou comparar os resultados de identificação de isolados deste grupo de bactérias obtidos da região do semiárido baiano, através do método proteômico, genotípico e fenotípico.

METODOLOGIA

Foram utilizados 16 isolados de BAL selvagens pertencentes ao Laboratório de Microbiologia Aplicada e Saúde Pública (LAMASP/UEFS), conservados à uma temperatura de -18°C no meio leite extrato de levedura. Estes foram inoculados em caldo MRS, incubados à 35°C/48h e repicados no mínimo três vezes consecutivas para a sua ativação metabólica. Para a checagem de purificação das culturas, os isolados foram submetidos ao teste de catalase e coloração de Gram para confirmação da não produção de catalase e da morfologia coco/bacilo Gram-positiva.

Inicialmente, os isolados foram identificados no Instituto de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais pelo método proteômico, através do sistema Maldi-Tof (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight*), sendo depois realizada a identificação fenotípica utilizando os Kits API 50CH (Bio-Mérieux®) API 20 Strep (Bio-Mérieux®) seguindo o protocolo descrito no manual destes kits. A leitura do teste de fermentação foi realizada com o auxílio do *software* ABIS *online*.

A identificação genotípica foi realizada no Laboratório de Entomologia (LENTMOL/UEFS), onde as amostras foram submetidas ao processo da extração do DNA

segundo Faria et al. (2011) adaptado. A qualidade das amostras extraídas foi observada pela eletroforese em gel de agarose 1%, a concentração (Concentração = leitura da A_{260} x 50 x fator de diluição) determinada por espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm (A_{260}) e a pureza através da razão dos valores da absorbância em 260 nm e 280 nm (A_{260}/A_{280}).

Em seguida, foi realizada a amplificação do DNA por PCR sequenciando o gene 16S rRNA por meio dos pares iniciadores 27F e 1492R (MOREIRA et al., 2005). As etapas utilizadas na PCR consistiram de 1 ciclo de 95°C por 10 minutos, 35 ciclos de 95°C por 40 segundos, 55°C por 40 segundos e 72°C por 1 minuto, e um último ciclo de 72°C por 10 minutos. Após a PCR, foi verificada a amplificação dos produtos através da eletroforese em gel de agarose, sendo visualizados com auxílio de luz ultravioleta e documentados por intermédio de fotografias, para observação das regiões amplificadas (SOUZA et al, 2018).

RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO

O uso de Kits para identificação taxonômica de BAL com base em características fenotípicas - como o API 50 CH e API 20 STREP - ainda continua sendo utilizado em vários laboratórios de microbiologia por sua facilidade no uso e pela falta de equipamentos que possibilitem a realização de métodos mais sofisticados (BROLAZO et al., 2011). No entanto, nos últimos anos é frequente a substituição desse método por técnicas conceituadas para a identificação de grande variedade de espécies bacterianas como o Maldi-Tof (BIER et al., 2017). Seu princípio de funcionamento analisa as amostras por padrões de proteínas detectadas nos microrganismos através da espectrometria de massa e compara com os espectros referenciais de cepas conhecidas, possibilitando a classificação e identificação com mais rapidez e confiabilidade do que os métodos convencionais (ANGELETTI, 2016).

A leitura dos testes API 50 CH e API 20 STREP se encontra no Quadro 1 e 2, respectivamente, em conjunto com o resultado obtido pelo método proteômico.

Quadro 1. Identificação de BAL isoladas de diferentes substratos pelo sistema API 50 CH (ABIS *online*) e Maldi-Tof.

Bactérias	Substrato de Isolamento	Api 50 CH (%ID)	Maldi-Tof (Escore)
3 – PUB16	Mandioca – Feira livre*	<i>Lactobacillus plantarum</i> (95,4)	<i>Lactobacillus plantarum</i> (2,221)
4 – CC09	Caldo de cana*	<i>Lactobacillus plantarum</i> (95,4)	<i>Lactobacillus plantarum</i> (2,316)
15–LCMH1	Leite de Cabra*	<i>Lactobacillus plantarum</i> (95,5)	<i>Pediococcus acidilactici</i> (2,022)
24 – H38	Fezes de bebê de 3 dias*	<i>Lactobacillus plantarum</i> (95,3)	<i>Lactobacillus plantarum</i> (2,138)
30 – B4.23	Fezes de bezerro**	<i>Lactobacillus plantarum</i> (95,4)	<i>Lactobacillus plantarum</i> (2,276)
31 – E13	Fezes de potro***	<i>Lactobacillus plantarum</i> (93,6)	<i>Pediococcus acidilactici</i> (2,014)
40 – B3.17	Fezes de bezerro**	<i>Lactobacillus plantarum</i> (95,4)	<i>Lactobacillus paracasei</i> (2,069)

*Feira de Santana/BA; ** Ruy Barbosa/BA; ***Camaçari/BA

Quadro 2. Identificação de BAL isoladas de diferentes substratos pelo sistema API 20 STREP (ABIS *online*) e Maldi-Tof.

Bactérias	Substrato de Isolamento	Api 20 Strep (%ID)	Maldi-Tof (Escore)
7-PUB5	Mandioca – Feira livre*	<i>Enterococcus asini</i> (83,9)	<i>Enterococcus durans</i> (2,081)
11-TOM9	Tomate – Feira livre*	<i>Streptococcus loxodontisalivarius</i> (90,8)	<i>Enterococcus faecium</i> (2,174)
12-R2	Repolho – Feira livre*	<i>Streptococcus loxodontisalivarius</i> (90,8)	<i>Enterococcus faecalis</i> (2,409)
21-F11	Fezes de frango**	<i>Streptococcus loxodontisalivarius</i> (90,8)	<i>Enterococcus faecium</i> (2,221)
23-F7	Fezes de frango**	<i>Streptococcus loxodontisalivarius</i> (99,0)	<i>Enterococcus faecium</i> (2,199)
33-P2.10	Fezes de filhote de porco**	<i>Streptococcus loxodontisalivarius</i> (90,8)	<i>Enterococcus faecium</i> (2,159)
36-H27	Leite materno*	<i>Streptococcus loxodontisalivarius</i> (99,0)	<i>Enterococcus faecium</i> (2,160)
37-H24	Leite materno*	<i>Streptococcus loxodontisalivarius</i> (90,8)	<i>Enterococcus faecium</i> (2,007)
39-LVBp	Leite de Vaca**	<i>Streptococcus loxodontisalivarius</i> (90,8)	<i>Enterococcus faecalis</i> (2,349)

*Feira de Santana/BA; ** Ruy Barbosa/BA

A concordância entre os métodos de identificação foi baixa. Cerca de 42,8% dos isolados que utilizaram o API 50 CH apresentaram identificação divergente da obtida no sistema Maldi-Tof; e 100% dos isolados identificados pelo API 20 STREP também tiveram resultados distintos. A técnica de Maldi-Tof apresentou o dobro de diversificação das espécies identificadas em relação aos Kits API, que especificaram um total de apenas três espécies diferentes (*L. plantarum*, *E. asini* e *S. loxodontisalivarius*).

Cada Kit API só pode ser utilizado para um seletivo grupo de cepas e uma de suas maiores limitações é a baixa reprodutibilidade pela plasticidade fenotípica bacteriana (MORAES et al., 2013). Por isso, ele pode identificar bactérias diferentes como um mesmo microrganismo, reduzindo a variedade detectada e trazendo resultados pouco confiáveis. Esta situação é confirmada pelo estudo de Elmaci (2015), pois demonstra que certos grupos taxonômicos gerados com base nas propriedades fenotípicas não correspondem às relações filogenéticas. Como algumas espécies não são distinguidas fenotipicamente, é necessário utilizar métodos como o PCR e o Maldi-Tof juntamente com os testes bioquímicos (DONATO, 2007).

O trabalho de Zanini et al. (2012) estudou a identificação bioquímica e molecular de *Lactobacillus* spp. notando divergências em resultados do sistema API 50 CH. Ao utilizarem amostras de referência estas foram identificadas erroneamente com 99,7 a 98,9% de certeza. Segundo os autores, tais variações são frequentes indicando interpretações subjetivas, portanto este método não deve ser utilizado como único critério para a identificação de BAL.

Sobre a tentativa de identificação molecular, o principal empecilho para prosseguir com o sequenciamento foi a obtenção de amostras de DNA com baixo rendimento e grau de pureza durante a extração, já que 63% delas apresentaram valores menores que 1,4 e 2,0 na relação A_{260}/A_{280} indicando contaminação por proteínas (SILVA, 2017). Segundo De et al. (2010), esta situação é comum em BAL pela dificuldade em romper a parede celular com alta concentração de peptidoglicano. Além disso, as BAL produzem metabólitos que inibem a reação de PCR e podem danificar o DNA, necessitando otimizar o processo para prosseguir com o experimento.

Ao otimizar o processo, os resultados obtidos foram satisfatórios, pois todas as amostras de DNA apresentaram pureza acima de 1,4 e ao serem submetidas ao PCR os produtos gerados tiveram alto grau de pureza. Mesmo assim, não foi possível prosseguir com o sequenciamento, pois nesta etapa seria de extrema importância utilizar *primers* específicos para a espécie como forma de conseguir resultados confiáveis na identificação.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Das 16 BAL estudadas foi possível obter: três espécies diferentes (*L. plantarum*, *E. asini* e *S. Loxodontisalivarius*) por meio da identificação fenotípica utilizando os Kits API 50 CH e API 20 STREP; seis espécies diferentes pelo método do Maldi-Tof; e quatro isolados com similaridade de identificação entre as duas técnicas. Apesar do método fenotípico ser bastante utilizado em laboratórios de microbiologia foi possível observar que este não deve ser usado como único critério para identificar BAL pela alta probabilidade de interpretações errôneas. Em relação à identificação molecular, conseguiu-se otimizar o processo da extração de DNA obtendo um material de excelente qualidade no PCR, no entanto, para alcançar resultados confiáveis no sequenciamento é necessário o uso de *primers* específicos.

No geral, a utilização da taxonomia polifásica faz-se necessária para a obtenção de linhagens de BAL devidamente identificadas, visto a sua importância biotecnológica.

REFERÊNCIAS

- ANGELETTI, S. Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (Maldi-Tof MS) in clinical microbiology. *J Microbiol Meth*, [s.l.], v. 138, p.20-29, jul. 2017.
- BIER, D. et al. Identificação por espectrometria de massa Maldi-Tof de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* isolados de carcaças bovinas. *Pesquisa Vet Brasil*, [s.l.], v. 37, n. 12, p.1373-1379, dez. 2017.
- BROLAZO, E. M. et al. Correlation between API 50 CH and multiplex polymerase chain reaction for the identification of vaginal lactobacilli in isolates. *Braz J Microbiol*, [s.l.], v. 42, n. 1, p.225-232, mar. 2011.
- DE, S. et al. A Simple Method for the Efficient Isolation of Genomic DNA from Lactobacilli Isolated from Traditional Indian Fermented Milk (dahi). *Indian J Microbiol*, [s.l.], v. 50, n. 4, p.412-418, out. 2010.
- DONATO, S. T.. *Comparação de Métodos Convencionais e Semi-Automatizados para Identificação de Enterococcus spp. frente à Biologia Molecular em Identificações Discrepantes*. 2007. 85 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Microbiologia Médica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.
- ELMACI, S. B. et al. Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from traditional pickles of the Çubuk region in Turkey. *Folia Microbiol*, [s.l.], v. 60, n. 3, p.241-251, 18 maio. 2015.
- FARIA, A. C. S. et al. Avaliação microbiológica e molecular de líquidos articulares e peri-articulares de suínos. *Pesq Vet Brasil*, [s.l.], v. 31, n. 8, p.667-671, ago. 2011.
- MORAES, P. M. et al. Comparison of phenotypic and molecular tests to identify lactic acid bacteria. *Braz J Microbiol*, [s.l.], v. 44, n. 1, p.109-112, 2013.
- MOREIRA, J. L. S.; MOTA, R. M.; HORTA, M. F. Identification to the species level of *Lactobacillus* isolated in probiotic prospecting studies of human, animal or food origin by 16S-23S rRNA restriction profiling. *BMC Microbiol.*, v. 5, p. 5-15, 2005.
- PAULO, E. M. 2010. *Produção de exopolissacarídeos (EPS) por bactérias lácticas visando microencapsulação de Lactobacillus acidophilus La-5 pelo processo de Spray drying*. 2010. Tese 212f. (Doutorado), Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2010.
- SILVA, A. N. *Biotecnologia II: Aplicações e Tecnologias*. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- SOUZA, F. S. et al. Genetic Variability of *Melipona subnitida* (*Hymenoptera Apidae*) in Introduced and Native Populations. *J Insect Sci*, v. 18, n. 5, p. 1-6, 2018.
- ZANINI, S. F. et al. Identificação bioquímica e molécula de *Lactobacillus* spp. isolados do íleo de frangos de corte tratados ou não com antimicrobianos. *Cienc Rural*, [s.l.], v. 42, n. 9, p.1648-1654, set. 2012.