

ESTRESSE OXIDATIVO AUMENTA A PRODUTIVIDADE DE ESPOROS DE *Bacillus cereus* var. *Toyoi* EM FERMENTAÇÃO

SUELY RIBEIRO BAMPI¹; PATRÍCIA OLIVEIRA²; MARCELLE MOURA
SILVEIRA³; GIANA GABOARDI⁴; FABRÍCIO ROCHEDO CONCEIÇÃO⁵; ÂNGELA
NUNES MOREIRA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – suely_rbampi@hotmail.com;

²Universidade Federal de Pelotas – bilicadiaz@yahoo.com.br;

³Universidade Federal de Pelotas – marcellemsilveira@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – giana_gaboardi@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – fabricao.rochedo@ufpel.edu.br

⁶Universidade Federal de Pelotas – angelanmoreira@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

Probióticos são microrganismos vivos que, quando ingeridos em quantidades adequadas, apresentam efeito benéfico sobre a saúde do hospedeiro (FAO-WHO, 2001). Muitos benefícios tem sido relacionados ao consumo de probióticos, entre eles: o controle da microbiota intestinal; a promoção da resistência gastrintestinal a colonização por patógenos; a promoção da digestão da lactose em indivíduos intolerantes a lactose; a estimulação do sistema imune, o alívio da constipação; o aumento da absorção de minerais e da produção de vitaminas (SAAD, 2006), entre outros. Em geral, dependendo da linhagem empregada e do efeito benéfico desejado, o consumo desses microrganismos, entre 10^8 e 10^{11} UFC/dia, é recomendável (VINDEROLA & REINHEIMER, 2000).

A maioria das informações sobre a influência dos probióticos até o momento foi obtida com estudos baseados na utilização de lactobacilos ou bifidobactérias, bactérias utilizadas na alimentação humana e que são difíceis de armazenar e administrar para animais (BARRETO et al., 2003)

A bactéria *Bacillus cereus* var. *Toyoi* vem sendo utilizada como probiótico. A principal vantagem de *B. Toyoi* sobre as bactérias ácido lácticas na elaboração de probióticos está em sua capacidade de esporular, o que proporciona uma maior sobrevivência durante o trânsito gastrointestinal e durante a elaboração, transporte e armazenamento do produto alimentício (COPPOLA & GIL-TURNES, 2004).

Estudos tem mostrado que *B. Toyoi* contribui para maior ganho de peso em animais, melhoria das taxas de conversão alimentar, redução na incidência de fezes líquidas e diarreia pós-desmame e redução das taxas de mortalidade (ALEXOPOULOS et al., 2001; BAUM et al., 2002; GEDEK et al., 1993; KIRCHGESSNER et al., 1993; TARAS et al., 2005).

A produção de *B. Toyoi* se dá pelo cultivo da bactéria em meio NYSM (YOUSTEN, 1984), específico para o crescimento de esporos, em diferentes condições de tempo e temperatura. Alguns estudos trabalham com a metodologia de produção da bactéria cultivando o inóculo a 37°C por 96 h, sem o fornecimento de oxigênio (VILA et al., 2009; CASTELLI, 2011). Porém o fornecimento de oxigênio por pelo menos 72 h parece aumentar a concentração de UFC/ml (ROSS, 2009). Por isso o objetivo desse trabalho foi avaliar a produção, em fermentador, de *B. Toyoi* sob as mesmas condições de temperatura e diferentes condições de tempo e fornecimento de oxigênio, ou seja, com e sem estresse oxidativo.

2. METODOLOGIA

2.1. Produção de *B. Toyoi* em fermentador sem estresse oxidativo (fermentação 1)

A bactéria liofilizada foi ressuspensa em solução salina estéril, semeada em placas contendo ágar sangue e as placas incubadas por 24 h à 37°C. A seguir, 50 µL de uma suspensão contendo 3 a 5 colônias foram adicionados a 70 mL de caldo infusão de cérebro e coração (BHI) e o cultivo foi incubado em agitador orbital a 200 rpm, a 37°C por 16 a 18 h. Após, 70 mL do inóculo foram adicionados a 700 mL de caldo NYSM (YOUSTEN, 1984) e o cultivo foi incubado a 37°C sob agitação de 200 rpm durante 24 h.

A fermentação ocorreu em fermentador New Brunswick 110 (New Brunswick Scientific, NJ, USA), autoclavando-se por 45 minutos a 121°C o meio NYSM acrescido de 15 g.L⁻¹ de glicerol. Para a fermentação, utilizou-se 7 L de meio, com 10% em volume do inóculo obtido. O cultivo ocorreu a 37°C, 500 rpm e 1 vvm de ar durante 48 horas. Ao término deste período, as condições de temperatura, rotação e ar foram desligadas e o cultivo mantido no fermentador por mais 192 h a fim de promover a esporulação, sob refrigeração a 4°C.

Ao final das 192 h, a suspensão foi aquecida em banho-maria a 80°C durante 15 minutos para eliminar formas vegetativas do bacilo. O cultivo foi centrifugado a 4000 g por 15 minutos, sob refrigeração de 4°C, e concentrado a um volume de 700 mL. A concentração de *B. Toyoi* foi determinada através da diluição em série decimal do cultivo em solução salina (NaCl 0,9%) estéril e da contagem das UFCs/mL em placas contendo ágar BHI, após a incubação das mesmas a 37°C por 24 h. O percentual de esporos viáveis foi calculado dividindo-se a contagem de esporos do cultivo (em UFC/mL) após o aquecimento do cultivo para eliminação das células vegetativas pela contagem de esporos antes do aquecimento e multiplicando-se por 100.

2.2. Produção de *B. Toyoi* em fermentador por estresse oxidativo (fermentação 2)

O processo de produção por estresse oxidativo foi semelhante ao descrito anteriormente com as seguintes modificações: ao final das 48 h de fermentação, onde as condições de temperatura e rotação foram desligadas, o suprimento de ar foi mantido por 72 h e não foi aplicada a refrigeração.

A suspensão foi aquecida em banho-maria, centrifugada e quantificada conforme citado anteriormente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 são apresentadas as porcentagens de esporos viáveis e as contagens (em UFC/mL) dos esporos presentes em amostras retiradas 48, 72, 96 e 192 h após as fermentações, com e sem estresse oxidativo, antes e após o aquecimento para eliminação das células vegetativas.

Tabela 1. Quantificação (em UFC/mL) e porcentagens de esporos viáveis de *B. Toyoi* produzidos por fermentação com e sem estresse oxidativo, antes e após o aquecimento para eliminação das células vegetativas, após diferentes períodos.

Amostras	Fermentação 1 (sem estresse oxidativo)			Fermentação 2 (com estresse oxidativo)		
	Contagens (UFC/mL)			Contagens (UFC/mL)		
	Antes do aquecimento	Depois do aquecimento	Esporos viáveis (%)	Antes do aquecimento	Depois do aquecimento	Esporos viáveis (%)
1 ^a (48 h)	2 x 10 ⁹	1 x 10 ⁸	5	3 x 10 ¹⁰	1 x 10 ¹⁰	33,33
2 ^a (72 h)	1 x 10 ⁹	1 x 10 ⁸	10	3 x 10 ¹⁰	2 x 10 ¹⁰	66,66
3 ^a (96 h)	2 x 10 ⁹	3 x 10 ⁸	15			
4 ^a (192h)	3 x 10 ⁹	1 x 10 ⁹	33,33			

Quando *B. Toyoi* foi produzido sem estresse oxidativo, ao final das 192 h foi atingido o percentual de 33,33% de esporos viáveis, sendo este valor dobrado para 66,66% quando produzido por estresse oxidativo ao final de 72 h. Resultado semelhante foi encontrado por Kang et al. (2013), onde em condições anaeróbicas a expressão da bactéria *E. coli* foi reprimida.

Aceituno et al. (2012) concluiu que, para a produção de *Saccharomyces cerevisiae*, um ambiente rico em oxigênio exerce um grande efeito metabólico na mitocôndria da levedura, estimulando sua produção por processo fermentativo, corroborando com nossos resultados.

Ross (2009) utilizou a metodologia de produção para *B. Toyoi* somente por estresse oxidativo e encontrou resultados semelhantes ao presente trabalho, com uma contagem de aproximadamente 2,0 x 10¹⁰ UFC/mL.

4. CONCLUSÕES

Ambos os processos de fermentação utilizados na produção de *B. Toyoi* foram eficazes e apresentaram contagens viáveis de esporos. Entretanto, a produção causando um estresse oxidativo produziu 56,66% de esporos a mais após 72 h, sendo mais viável, visto que poupa tempo e alcança uma produção maior, comprovando que processos aeróbicos alcançam elevadas produtividades.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEITUNO, F. F.; ORELLANA, M.; TORRES, J.; MENDOZA, S.; SLATER, A. W.; MELO, F.; AGOSINA, E. Oxygen Response of the Wine Yeast *Saccharomyces cerevisiae* EC1118 Grown under Carbon-Sufficient, Nitrogen-Limited Enological Conditions. **Applied and Environmental Microbiology**. Santiago, Chile. v. 78 n. 23 p. 8340–8352, 2012.

ALEXOPOULOS, C., KARAGIANNIDIS, A., KRITAS, S.K., BOSCO, C., GEORGOULAKIS, I.E., KYRIAKIS, S.C., Field evaluation of a bioregulator containing live *Bacillus cereus* spores on health status and performance of sows and their litters. **J. Vet. Med. A: Physiol. Pathol. Clin. Med.** Macedonia, 48 (3), 137–145, 2001.

BARRETO, M. G. P.; SILVA, N.; SILVA E. N.; BOTELHO, L. Quantificação de *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobactérias* e *Bactérias Totais* em Produtos Probióticos Comercializados no Brasil. **Braz. Food Technol**, Brasil. São Paulo, v. 6 n. 1, p. 119-126, 2003.

BAUM, B., LIEBLER-TENORIO, E.M., ENSS, M.L., POHLENZ, J.F., BREVES, G. *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus cereus* var. *Toyoi* influence the morphology

and the mucins of the intestine of pigs. **Z. Gastroenterol.** Tierärztliche Hochschule Hannover, 40 (5), 277–284, 2002.

CASTELLI, R. M. **SINERGISMO DOS PROBIÓTICOS *Saccharomyces boulardii* E *Bacillus cereus* var. Toyoi SOBRE A IMUNOMODULAÇÃO EM CAMUNDONGOS.** 2011. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Pelotas, RS.

COPPOLA, M. M.; GIL-TURNES, C. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 4, p. 1297-1303, 2004.

GEDEK, B., KIRCHGESSNER, M., WIEHLER, S., BOTT, A., EIDELSBURGER, U., ROTH, F.X. The nutritive effect of *Bacillus cereus* as a probiotic in the raising of piglets. 2. Effect and microbial count, composition and resistance determination of gastrointestinal and fecal microflora. **Arch. Tierernahr.** München, 44 (3), 215–226, 1993.

FAO/WHO. 2002. **Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization.** Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Working Group Report, London, p. 1-11

KANG, A.; TAN, M. H.; LING, H.; CHANG, M. W. Systems-level characterization and engineering of oxidative stress tolerance in *Escherichia coli* under anaerobic conditions. **Mol. BioSyst.** Singapura, v. 9, 285—295, 2013.

KIRCHGESSNER, M., ROTH, F.X., EIDELSBURGER, U., GEDEK, B. The nutritive efficiency of *Bacillus cereus* as a probiotic in the raising of piglets. 1. Effect on the growth parameters and gastrointestinal environment. **Arch. Tierernahr.** München, 44 (2), 111–121, 1993.

ROOS, T. B. **Efeito imunomodulador de *Bacillus cereus* var. Toyoi e *Saccharomyces boulardii* em animais vacinados contra Herpesvírus Bovino tipo 5.** 2009. Dissertação de Doutorado - Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, n. 1, p. 01-16, 2006.

TARAS, D., VAHJEN, W., MACHA, M., SIMON, O. Response of performance characteristics and fecal consistency to long-lasting dietary supplementation with the probiotic strain *Bacillus cereus* var. toyoi to sows and piglets. **Arch. Anim. Nutr.** Berlin. 59 (6), 405–417, 2005.

VILA, B.; FONTGIBELL, A.; BADIOLA, I.; ESTEVE-GARCIA, E.; JIMENEZ, G.; CASTILLO, M.; BRUFAU, J. Reduction of *Salmonella enterica* var. enteritidis colonization and invasion by *Bacillus cereus* var. Toyoi inclusion in poultry feeds. **Poultry Science**, Constantí, v. 88, n. 5, p. 975–979, 2009.

VINDEROLA, C. G.; REINHEIMER, J. A. Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *Lactobacillus acidophilus* and lactic starter in fermented dairy products. **International Dairy Journal**, Santa Fe, v. 10, p. 271-2175, 2000.