



Descarboxilação da lisina em isolados do trato gastrointestinal (TGI) de animais submetidos à ingestão alcoólica e terapêutica com bactéria presuntivamente probiótica

MARISA SOARES DOS SANTOS, Jotta Novaes Junior, Letícia Antunes Athayde, Ronize Viviane Jorge de Faria, Mariléia Chaves Andrade, Sergio Avelino Mota Nobre

Introdução

A família *Enterobacteriaceae* tem por característica serem bacilos Gram-negativos, oxidase negativos, fermentadores de glicose com ou sem produção de gás, catalase positivos e reduzem nitrato a nitrito. A maioria das enterobactérias é encontrada no trato gastro intestinal de humanos, no reino animal, na água, solo e vegetais [1].

Os microrganismos efetuam as suas variadas atividades bioquímicas utilizando nutrientes obtidos a partir do ambiente que os rodeia. Essas reações bioquímicas que ocorrem dentro ou fora dos microrganismos são catalisadas por enzimas. A metabolização de moléculas orgânicas origina produtos finais cuja detecção pode ajudar na caracterização e identificação desses microrganismos [2]. Muitas espécies de bactérias possuem enzimas capazes de descarboxilar aminoácidos específicos no meio de cultura. A enzima descarboxilase remove uma molécula de CO₂ de um aminoácido para formar amina de reação alcalina. O teste de lisina descarboxilase mostra-se útil para diferenciar as espécies de *Citrobacter lactose* negativas de espécies de *Samonella sp.* Quase todas as cepas de *Shigella sonnei*, e espécies de *Klebsiella* e *Enterobacter*.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a prevalência de isolados bacterianos capazes de sintetizar a enzima descarboxilase em isolados do trato gastrointestinal (TGI) de camundongos submetidos à injúria por ingestão alcoólica e tratamento com bactérias ácido-lácticas (BAL) presuntivamente probióticas.

Material e Métodos

Camundongos fêmeas (entre 8-10 semanas de idade) da linhagem C57BL/6 selvagens, mantidos em gaiolas com água e ração (*Labina ad libitum*), a uma temperatura aproximada de 25±2°C e em ciclo claro-escuro de 12 horas foram aleatoriamente separados em 4 grupos, contendo 6 animais/grupo em cada gaiola.

O grupo 1 foi representado pelos animais tratados com salina + caldo BHI (Caldo Infuso Coração) (Salina - BHI), o grupo 2 foi representado pelos animais tratados com salina + Bactéria Ácido Láctica (Salina - BAL), o grupo 3 foi representado pelos animais tratados com etanol + Caldo BHI (EtOH - BHI) e o grupo 4 foi representado pelos animais tratados com etanol + BAL (EtOH - BAL).

Durante 4 dias consecutivos, foi realizada a administração intragástrica (i.g.) de 0,2 mL de EtOH (50%)/animal ou salina, e vinte e quatro horas após a última administração i.g. (EtOH ou salina), os animais foram tratados com 0,2 mL de BAL em Caldo BHI ou somente o meio de cultura Caldo BHI, por via intragástrica, durante 4 dias consecutivos.

Após um intervalo de 7 dias, foram realizadas as intervenções experimentais. Durante a necropsia foram retirados os seguintes órgãos: estômago, intestino delgado e intestino grosso.

Para as análises microbiológicas, procederam-se diluições seriadas das amostras (10⁻² e 10⁻⁴). Alíquotas das diluições foram distribuídas superficialmente no meio de cultura Agar MacConkey e foram incubadas a 37°C, por 24 horas (overnight).

As colônias desenvolvidas a partir das amostras foram selecionadas utilizando microscópio estereoscópico, conforme características morfológicas. Para confirmar a distinção entre as colônias, procedeu-se a bacterioscopia a partir da coloração de Gram. Colônias distintas foram então multiplicadas e conservadas a -20 °C, com aporte de crioprotetor.

Realizou-se o teste de Descarboxilação da lisina com vinte e dois isolados, em que tubos contendo meio Agar Lisina Ferro (LIA) foram inoculados com um fio reto e longo. As colônias em estudo, isoladas, obtida de uma placa Agar, foi tocada com a alçada da agulha de inoculação, que foi introduzida na profundidade do tubo por duas vezes, até alcançar



3 a 5 mm do fundo. Quando o fio inoculador foi retirado da profundidade do tubo ,efetuou-se a sementeira da superfície inclinada com movimentos de trás pra frente [4].

O projeto foi submetido à Comissão de Ética em Experimentação e Bem-estar Animal (CEEBEA) da Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES) sob processo de nº 043/2013 para análise e apreciação.

Resultados e Discussão

Dos vinte e dois (22) isolados de enterobactérias mesófilas aeróbias obtidas, 68,1% não expressaram a enzima descarboxilase da lisina, sendo destes 27,2% residentes do sítio estômago, 18,2% sítio do intestino delgado e 22,70% sítio do intestino grosso. Mostraram-se positivos para a enzima descarboxilase, 31,70% dos isolados, sendo que 18,2% sítio estômago, 4,5% sítio intestino delgado e 9% no sítio do intestino grosso (Fig.1).

Percebemos que a maioria dos microrganismos em estudo não produziu a enzima descarboxilase, os diferentes tratamentos no qual os camundongos foram submetidos podem ter influenciado neste resultado. No tratamento 1(salina + caldo BHI) nos três sítios de amostragem (estômago, intestino delgado e grosso) não ocorreu a descarboxilação da lisina. No tratamento 2 (salina + Bactéria Acido Láctica) e tratamento 3 (etanol + Caldo BHI) somente no sítio intestino grosso foram detectados isolados que não expressaram a enzima.No tratamento 4 (etanol + BAL) isolados do sítio de amostragem estômago também não sofreram descarboxilação (Fig.2).

Nos tratamentos contendo a BAL (bactéria acido láctica) em estudo, percebe-se que o número de isolados que não que não expressam a enzima descarboxilase, diminuiu, aparecendo isolados em apenas um dos sítios amostrados (Fig.2).

Conclusão

As populações bacterianas em estudo revelaram uma alta ocorrência de inativação da enzima descarboxilase podendo estar associado ao fato dos tratamentos em que estes foram submetidos. As informações sugerem que com a presença da BAL(bactéria acido láctica) introduzida como probiotico, alterou significativamente o processo metabólico dos microrganismos em estudo. O mecanismo de ação desta bactéria deverá ser mais bem compreendido em estudos posteriores.

REFERÊNCIAS

- [1] ANVISA; Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde; ed.Agencia Nacional de Vigilância Sanitária,modulo V,pag. 15.
- [2] Microbiologia Médica; Métodos de identificação e caracterização: principais provas bioquímicas; disponível em:https://www.google.com.br/url?sa=t&rect=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0CBwQFjAA&url=http%3A%2F%2Fusers.med.up.pt%2Fcc04-10%2Fmicropratica%2Fmicro_p_4.doc&ei=JN_0U4W0LoL18AGz14G4Bw&usq=AFQjCNGxqfAY2IGBshRsHlxDXEZfLm8O8g&sig2=7LuIHJyIyrygAQPD8yE5Bg&bvm=bv.73231344,d.b2U > acesso 20.08.2014.
- [3] KONEMAN, Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido;Descarboxilação da Lisina; Washington C.Winn Jr, et al; Rio de Janeiro;Guanabara Koogan,2010.. 6°. Ed; pag. 222 e 223.
- [4] KONEMAN, Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido; Princípios Bioquímicos, Washington C.Winn Jr, et al; Rio de Janeiro;Guanabara Koogan,2010. 6°. Ed; pag. 215.

ANEXO

Figura 1. Prevalência de bactérias entéricas mesófilas aeróbias isoladas do trato gastrointestinal (TGI) de camundongos C57BL/6 submetidos a injúria por ingestão alcoólica e tratamento com bactérias

ácido-lácticas (BAL) presuntivamente probióticas, com expressão da enzima Lisina Descarboxilase.

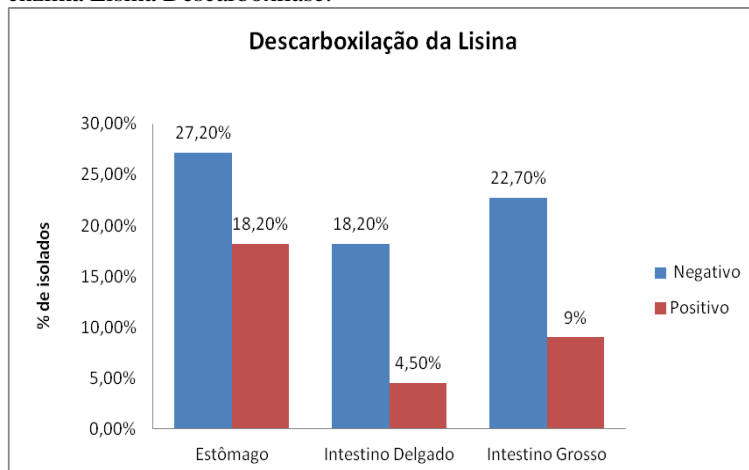


Tabela 1. Frequência de isolados com descarboxilação negativa.

Tratamentos	Sítios Amostrados		
	Estômago	Intestino delgado	Intestino grosso
Descarboxilação da Lisina Negativo			
Salina - BHI	3(-)	4(-)	2(-)
Salina - BAL	ND	ND	1(-)
EtOH - BHI	ND	ND	2(-)
EtOH - BAL	2(-)	ND	ND

ND = Não detectado