

Isolamento e caracterização bioquímica de bactérias ácidas do gênero *Acetobacter* a partir de três amostras de kombucha cultivadas no estado de Goiás.

Eliane de Jesus Alves¹ (IC)*, Lorena Cantuária de Oliveira¹ (IC)*, Karina Freire d'Eça Nogueira Santos² (PG)(PQ), Enderson Petronio de Brito Ferreira³ (PQ) Claudia Cristina Garcia Martin-Didonet⁴ (PQ).

Email autor: lilifarmacia23@gmail.com*

¹UEG – Discentes Curso de Farmácia, CCET. Br 153 nº 3.105 - Fazenda Barreiro do Meio - Anápolis - Goiás - Brasil. Caixa Postal: 459. CEP: 75.132-903; ² Bolsista Pos-Doc Programa de Mestrado CAPS, CCET-UEG, Anápolis, GO; ³ Pesquisador Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO; ⁴ Prof^a. Orientadora CCET. Br 153 nº 3.105 - Fazenda Barreiro do Meio - Anápolis - Goiás - Brasil. Caixa Postal: 459. CEP: 75.132-903

Resumo: O kombucha é considerado um probiótico, por isso é muito utilizado na medicina popular em todo o mundo, originário da China. Uma estrutura de consistência gelatinosa e firme é formada na parte superior, denominada de mãe-de-kombucha. Nesta estrutura são encontrados microrganismos associados, havendo predominância do gênero *Acetobacter* de metabolismo ácido. Assim este trabalho consistiu no isolamento de bactérias ácidas em três diferentes matrizes de mães-de-kombucha (M1, M2 e M3). Foram isoladas e caracterizadas bioquimicamente 55 bactérias por teste de crescimento em placa com 8 diferentes fontes de carbono e quanto à presença de enzimas (proteases, celulase e amilases) além de crescimento nos meios seletivos AAM, LGI-P e MacConkey. Pelo crescimento no meio AAM é possível indicar que todos os isolados são bactérias ácidas. Já a presença de halo no meio GYC foi observada em 35 isolados indicando que estes podem ser do gênero *Acetobacter*, mas outros testes são necessários. Pelo dendrograma houve uma tendência agrupamento dos isolados segundo a amostra de isolamento com 65% de similaridade. A amostra mais diversa foi considerada a M1 corroborando que há uma variação na composição de bactérias dependendo da fonte da mãe-de-kombucha e presença de bactérias ácidas.

Palavras-chave: *Acetobacteriaceae*, probióticos e bactérias acéticas.

Introdução

O kombucha é uma bebida muito utilizada pela população, devido à ação de probióticos (BHATTACHARYA et al. 2013). Identificaram-se no kombucha colônias de bactérias e leveduras a qual foram associadas em fermentação sob condições



anaeróbicas, como resultado obteve-se uma bebida suave, adocicada e carbonatada, levemente ácida (MALBAŠA *et al.*, 2011; MARSH *et al.*, 2014).

A mãe-de-kombucha constitui um biofilme de celulose, sintetizado pela atividade de algumas bactérias ácidas da família *Acetobacteriaceae* sendo que foram observadas as bactérias do gênero *Acetobacter* (JOHNSY *et al.*, 2005; MARSH *et al.*, 2014).

As bactérias ácidas da família *Acetobacteriaceae* têm a capacidade de produzir pigmentos e exopolissacarídeos (EPS), como a celulose, além de vitaminas e a presença de enzimas como álcool desidrogenase e aldeído desidrogenase (MACAULEY *et al.*, 2001; KLAUWIYAPAMORNKUN; BOVONSOMBUT e BOVONSOMBUT, 2015).

A celulose possui uma série de aplicações comerciais para preparações de produtos farmacêuticos e na indústria alimentícia, por isso esse grupo de bactéria tem sido muito estudado (NGUYEN *et al.*, 2008). Dependendo da composição do meio de cultivo, a qualidade e quantidade de celulose podem variar o que foi estudado para várias estirpes de bactérias em sistema de cultivo de kombucha (TROVATTI, *et al.*, 2011).

Material e Métodos

Meios de cultivo e bactérias: Utilizou três diferentes matrizes mães de kombucha, cultivados em chá preto contendo açúcar (20g L⁻¹) e ácido acético (2%) para manter o pH próximo de 3,5. Depois foi cultivado por 10 dias em cultivo estático e 1 mL do sobrenadante da cultura foi coletado e utilizado para contagem por diluição em placa em meio GYC e LGI-P (NGUYEN *et al.*, 2008) incubadas a 28 °C, por 3 dias com determinação do número mais provável. A partir das colônias obtidas foram coletadas colônias com diferentes morfologias, e mantidas em glicerol (30%) em freezer, para as avaliações posteriores.

Caracterização: Os isolados foram avaliados quanto à capacidade de crescimento em testes em placas com 10 fontes de carbono: glicose, sacarose, frutose, inositol, ácido maleico, trealose, glicerol, sorbitol e arabinose. Para tanto foi



utilizado o meio GYC, contendo glicose e o meio LGI-P, contendo sacarose, para as demais fontes de carbono foram utilizado o meio mínimo. (SHARAFI; RASOOLI; BEHESHTI-MAAL, 2010). Foram testados também a capacidade de crescimento em meio AAM para bactérias ácidas, o meio MacConkey que contem lactose e o meio DYGS que contem glutamato (KADERE et al. 2008). A presença de enzimas (proteases, amilases e celulasas) foram realizada em placas segundo Cattelan (1999).

Análise dos dados: Para a análise dos dados obtidos os resultados foram convertidos em uma matriz binária (0 e 1) e analisados no software NTSYS sendo elaborado um dendrograma utilizando o método UPGMA e o coeficiente de Jaccard para a determinação da similaridade entre os isolados obtidos. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Resultados e Discussão

Foram isoladas 55 colônias de três matrizes de kombucha (M1, M2 e M3), sendo 12 da M1 (KGC6, KGC7, KGC8, KGC9, KGC10, KGC12, KGC13, KGC14, KGC18, KGC19, KGC20 e KGC21) foram isolados no meio GYC. Já da amostra M2 foram obtidos 21 isolados do meio LGI-P (KGL1, KGL2, KGL3, KGL4, KGL5, KGL11, KGL12, KGL13, KGL14, KGL15, KGL16, KGL17, KGL18, KGL19, KGL20, KGL27, KGL29, KGL30, KGL31, KGL32 e KGL39) e dois isolados (KGLB1 e KGLB8) a partir do meio batata. Da M3 foram 20 isolados obtidas do meio GYC (KKG21, KKG22, KKG23, KKG24, KKG25, KKG26, KKG27, KKG28, KKG29, KKG30, KKG31, KKG32, KKG33, KKG34, KKG35, KKG36, KKG37, KKG38, KKG39 e KKG40).

Dos 12 isolados da M1, todos foram capazes de utilizar a glicose (meio GYC), sacarose (meio LGI-P) e o glicerol. No meio DYGS, que contem glutamato, apenas os isolados KGC12, KGC13 e KGC14 apresentaram crescimento. Para o teste das enzimas na amostra M1 apenas o isolado KGC14 foi positivo para protease e o isolado KGC13 foi positiva tanto para celulase como protease. Estes 12 isolados de M1 apresentaram halo característico em meio GYC, sendo considerados como bactérias ácidas (Tabela 1).



Já dos 22 isolados da amostra M2 todos apresentaram crescimento no meio contendo frutose, ácido maleico, trealose, glicose e sacarose. No teste da presença de enzima não foi observado a presença para protease e celulase e para atividade de amilase apenas dois isolados foram positivos (KGL1 e KGL12).

Já dos 20 isolados da M3 foi observado crescimento em meio AAM e no meio GYC, porém neste último não houve formação de halo. Somente 2 isolados (KGC13 e KGC18) apresentaram crescimento em trealose e para a presença de enzimas somente para celulose foi observado um isolado com atividade (KGC13).

O gênero *Acetobacter* foi estudado quanto a utilização de fontes de carbono e foi detectado que não possui capacidade de utilizar trealose (SWINGS; DE LEY, 1981; KADERE et al. 2008).

Tabela 1 – Índice de solubilização de cálcio (IS) em placa com meio GYC obtido para 35 isolados de duas amostras de kombucha (M1 e M2) cultivadas em Goiás, sendo 12 isolados da M1 (KGC) e 23 isolados de M2 (KGL).

Bactéria	IS	Bactéria	IS	Bactéria	IS
KGC-6	1,85	KGL-1	2	KGL-18	1,81
KGC-7	1,75	KGL-2	1,63	KGL-19	1,9
KGC-8	1,33	KGL-3	1,73	KGL-20	1,9
KGC-9	1,5	KGL-4	1,64	KGL-27	1,9
KGC-10	1,85	KGL-5	1,80	KGL-29	2,22
KGC-12	1,33	KGL-11	1,64	KGL-30	1,90
KGC-13	4,2	KGL-12	1,2	KGL-31	2
KGC-14	1,75	KGL-13	2,1	KGL-32	1,81
KGC-18	1,37	KGL-14	1,9	KGL-33	1,9
KGC-19	1,33	KGL-15	1,9	KGL B-1	1,8
KGC-20	1,75	KGL-16	2	KGL B-8	2
KGC-21	1,6	KGL-17	1,80		

IS = índice de solubilização obtido entre o diâmetro do halo formado sobre o diâmetro da colônia. Fonte: A autora deste trabalho, 2018.

Pelos resultados obtidos então é possível que a maioria das bactérias testadas não pertençam a este gênero, podendo apenas supor que os isolados são pertencentes a família *Acetobacteriaceae*, como evidenciado pelo crescimento em



meio AAM (SWINGS; DE LEY, 1981). Avaliações genéticas serão necessárias para confirmação e colocação taxonômica dos isolados aqui obtidos.

Pela avaliação da capacidade de formação de halo foi calculado o índice de solubilização de cálcio em meio GYC sendo observado que os 35 isolados das amostras M1 e M2 foram capazes de liberar soluções ácidas de solubilização (Tabela 1). Observando o IS a média geral foi de 1,8 sendo que o maior valor foi obtido para o isolado KGC13 (IS=4,2) e o menor de 1,33 para os isolados KGC8, KGC12 e KGC19 da M1 (Tabela 1). Já para isolados da M2 o valor médio da IS também foi de 1,8 sendo que o maior valor foi observado para KGL29 (IS=2,22) e o menor para KGL12 (IS=1,2).

Foi observado que os 55 isolados da M1, M2 e M3 tiveram um crescimento melhor no meio GYC e os que apresentaram crescimento em LGI-P, foram consideradas como capazes de utilizar sacarose.

O crescimento em meio GYC e a presença de halo de solubilização de cálcio é considerado chave para que bactérias sejam consideradas do gênero *Acetobacter* sendo portanto que os isolados das amostras M1 e M2 podem ser considerados deste gênero (SANTOS, 2016; YAMADA, 2016). Ainda segundo Yamada (2016) as bactérias do gênero *Acetobacter* são capazes de utilizar a glicose no meio de cultivo com concentrações menores que 30%, como foi observado para as bactérias aqui testadas indicando que os isolados podem ser deste gênero (SANTOS, 2016).

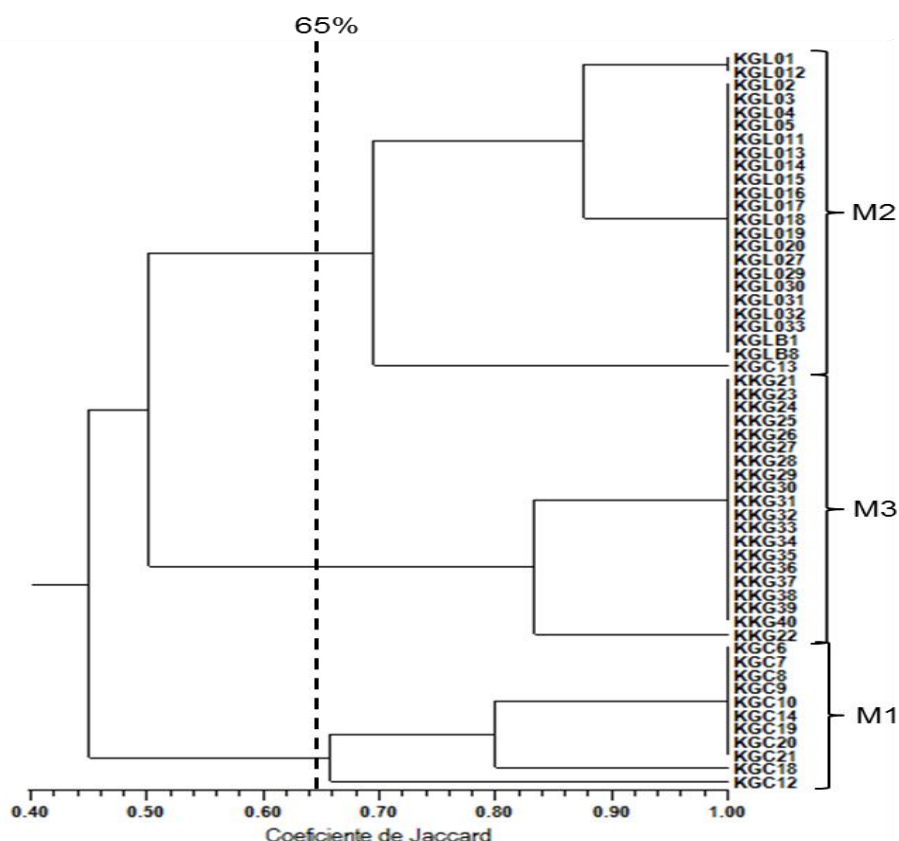
No presente trabalho apenas os 20 isolados da M3 cresceram em meio GYC, mas não apresentaram halo. Este dado pode indicar que estes 20 isolados não pertençam ao gênero *Acetobacter*, mas podem ser da família *Acetobacteriaceae* pois todos os isolados cresceram no meio AAM, que contem etanol de ácido acético (SWINGS; DE LEY, 1981).

Pelo dendrograma de similaridade foi possível observar uma similaridade arbitrária de 65% e a formação de 3 grandes grupos (clusters) sendo que a maioria dos isolados pertenceram a respectiva amostra de isolamento M1, M2 e M3 (Figura 1). Apenas o isolado KGC13 que foi isolado da M1, agrupou com os isolados da M3

(Figura 1). É possível observar também pelos pontos de bifurcação do dendrograma que os isolados mais diversos foram da M1 com formação de 3 subgrupos e do agrupamento do isolado KGC13 com os isolados da amostra M3. A partir desta avaliação bioquímica dos isolados é possível supor que houve uma variação na composição das bactérias em cada amostra.

Já foi observado que pode haver grande variação na composição microbiota associada à kombucha sendo dependente de fatores físico-químicos e também da origem deste probióticos (NEFFE-SKOCIŃSKA et al. 2017). Assim o mesmo foi detectando nas diferentes fontes de mãe-de-kombucha testadas, que foram cultivadas no estado de Goiás, onde foram detectada diferença na capacidade metabólica das bactérias e conseqüentemente uma variação genética intrínseca.

Figura 1 Dendrograma de similaridade a partir dos dados bioquímicos, utilizando UPGMA e o coeficiente de Jaccard pelo software NTSYS (versão 2.1) de isolados bacterianos obtidos de 3 amostras de kombucha (M1, M2, M3) cultivados no estado de Goiás.





Considerações Finais

Foi possível o isolamento de 55 bactérias com características de bactérias ácidas em três amostras de kombucha cultivadas em Goiás.

Pelas caracterizações bioquímicas foram observadas similaridade de 65% entre isolados, sendo que a maior diversidade metabólica foi obtida para a amostra M1 seguida da amostra M2 e menor variabilidade entre os isolados da amostra M3.

O isolado KGC13 se destacou do restante pela capacidade de produção de ácido sendo promissora para estudos de compostos ácidos.

Ainda as bactérias isoladas serão utilizadas para estudos posteriores de caracterização genética.

Agradecimentos

Agradeço a minha orientadora Claudia Didonet gostaria de agradecer pela oportunidade que me foi concedida de realizar esse projeto, contribuindo para meu conhecimento. Agradeço a professora Karina que sempre esteve disposta a ajuda contribuindo para um melhor aprendizado e a amiga Maynara que me ajudou e também contribuiu para meu conhecimento. Agradecimento ao CCET-UEG, ao CNPq e a bolsa BIP/UEG.

Referências

ALLOULOU, A. et al. Hypoglycemic and antilipidemic properties of kombucha tea in alloxan-induced diabetic rats. **BMC Complement. Altern. Med.**, vol.12, p 63-70, 2012.

BHATTACHARYA, S.; GACHHUI, R.; SIL, P.C. Effect of Kombucha, a fermented black tea in attenuating oxidative stress mediated tissue damage in alloxan induced diabetic rats. **Food and Chemical Toxicology**, vol. 60, p.328-340, 2013.

CHEN, XIAO-HONG; LOU, WEN-YONG; ZONG, MIN-HUA; SMITH, THOMAS J Optimization of culture conditions to produce high yields of active *Acetobactersp.*



CCTCC M209061 cells for anti-Prelogreduction of prochiral ketones. **BMC Biotechnology**, vol.11,110-122,2011.

FERREIRA, D. F. *SISVAR*: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium** (Lavras), vol. 6, p. 36-41, 2008.

JOHNSY, G.; RAMANA, K. V.; SABAPATHY, S. N.; BAWA, A. S. Physico-mechanical properties of chemically treated bacterial (*Acetobacter xylinum*) cellulose membrane. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, vol.21, p.1323–1327, 2005.

KADERE, T. T., MIYAMOTO, T.; ONIANG`O, R. K.; KUTIMA, P. M.; NJOROGGE, S. M. Isolation and identification of the genera *Acetobacter* and *Gluconobacter* in coconut toddy (mnazi). **African Journal of Biotechnology**, vol. 7, pp. 2963-2971, 2008.

MACAULEY, S.; MCNEIL, B.; HARVEY, L.M. The genus *Gluconobacter* and its applications in biotechnology. **Critical Reviews in Biotechnology**, vol.21, p.1-25, 2001.

MALBAŠA, R., LONČAR, E. S., VITAS, J. S., ČANADANOVIĆ-BRUNET, J. M. Influence of starter cultures on the antioxidant activity of kombucha beverage. **Food Chemistry**, vol.127, p.1727-1731, 2011.

MARSH A. J. et al. Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (teafungus) samples. **Food Microbiology**, vol.38: p.171-8, 2014.

NGUYEN V.T.; FLANAGAN B.; GIDLEY M.J.; DYKES G.A. Characterization of cellulose production by a *Gluconacetobacter xylinus* in from kombucha. **Current Microbiology**, vol.57, p. 449-53, 2008.

NEFFE-SKOCIŃSKA, K.; SIONEK, B.; ŚCIBISZ, I.; KOŁOŻYŃ-KRAJEWSKA, D. Acid contents and the effect of fermentation condition of Kombucha tea beverages on physicochemical, microbiological and sensory properties, *CyTA - Journal of Food*, vol. 15, p.601-607, 2017.



SAMBROOK, J. et al. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual** (Third Edition). 2000, 2100p.

SHARAFI, S. M.; RASOOLI, I.; BEHESHTI-MAAL, K. Isolation, characterization and optimization of indigenous acetic acid bacteria and evaluation of their preservation methods. **Iranian Journal of Microbiology**, vol. 2, p. 41–48. 2010.

SWINGS J.; DE LEY J. The genera *Gluconobacter* and *Acetobacter*. In: **The Prokaryotes, a Hand book on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria**. Starr M. P.; Stolp, H.; Truper, H. G., Balows B, Schlegel HG (Eds.). springer Verlag, Berlin, pp. 771-778, 1981.

TROVATTI, E. et al; *Gluconacetobacter sacchari*: an efficient bacterial cellulose cell-factory. **Carbohydr. Polym.**, vol.86, p.1417-1420, 2011.

YAMADA. Y. Systematics of Acetic Acid Bacteria. In: **Acetic Acid Bacteria. Systematics of Acetic Acid Bacteria**. Matsushita, K.; Toyama, H.; Tonouchi, N.; Okamoto-Kainuma A. (ed.) Springer, Japão, p.1-50, 2016.