



Isolamento e caracterização bioquímica de bactérias ácidas do gênero *Gluconacetobacter* obtidas de três amostras de kombucha cultivadas no estado de Goiás.

Lorena Cantuária de Oliveira¹ (IC)*, Eliane Alves de Jesus¹ (IC), Karina Freire d'Eça Nogueira Santos² (PG)(PQ), Enderson Petrônio de Brito Ferreira³ (PG)(PQ), Claudia Cristina Garcia Martin-Didonet⁴ (PG)(PQ).

*Email autor: cantuarialorena@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 Pós-Doc Programa de Mestrado CAPS, CCET-UEG, Anápolis, GO; ³ Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, ⁴Profª. 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 amplamente utilizado no mundo por ter efeitos benéficos para saúde. Várias bactérias ácidas já foram identificadas e estão presentes entre os microrganismos associados no kombucha. O presente estudo teve como objetivo isolamento e caracterização bioquímica de bactérias ácidas do gênero *Gluconacetobacter*, em três diferentes matrizes de kombucha. Para isolamento foram utilizados meios GYC e LGI-P e obtidos 55 isolados: 12 de M1 (KGC) 23 de M2 (KGL) e 20 de M3 (KCC). Os testes bioquímicos em placa avaliaram a capacidade de crescimento em diferentes fontes e presença de enzimas (proteases, lipases, amilases). A partir dos dados foi construído um dendrograma de similaridade utilizando o coeficiente de Jaccard através do software NTSys. Todos os isolados testados foram considerados como bactérias ácidas pelo crescimento no meio AAM. Foi estimado uma similaridade de 70% entre os isolados e 3 clusters foram formados sendo este agrupamento relacionado com a amostra utilizada para o isolamento. M1 teve maior diversidade, seguida da M2 e M3 com menor variação metabólica. Foi possível isolar e observar variabilidades metabólicas de acordo com a amostra. A partir destas observações outros estudos são necessários para caracterizar efetivamente a função destas na atuação metabólica da produção do pró-biotico kombucha.

Palavras-chave: metabolismo bacteriano, bactérias acéticas, probióticos.

Introdução

O kombucha é uma bebida fermentada a base de chá, de baixo teor alcoólico, considerada como pro-biótica, utilizada culturalmente há centenas de anos em todo o mundo, sendo originário da China (BLANC, 1996; BHATTACHARYA et al.





2013). O kombucha é consumido pela população para o tratamento de várias doenças. (BHATTACHARYA et al. 2013; ALOULOU et al., 2012). Os efeitos benéficos para a saúde têm sido correlacionados com a atividade antioxidante de compostos presentes no kombucha (MALBAŠA et al., 2011).

A fermentação do kombucha é promovida pela presença de bactérias e leveduras associadas sob condições anaeróbicas o que leva a produção uma bebida adocicada e carbonatada, levemente ácida como resultado dos compostos produzidos pela cultura simbiótica dos microrganismos (MALBAŠA et al., 2011; MARSH et al., 2014).

A associação de bactérias e leveduras, no kombucha, produz um biofilme gelatinoso, denominado de mãe-de-kombucha, sendo que este tem como base a presença de celulose bacteriana microcristalina. As bactérias predominantes no kombucha já foram identificadas como pertencentes à família *Acetobacteriaceae*, conhecidas como bactérias ácidas (JOHNSY et al., 2005; MARSH et al., 2014, GOMES et al., 2018).

Um dos gêneros mais estudados das bactérias ácidas é o *Gluconacetobacter*, pois possui importantes aplicações industriais, como por exemplo, a capacidade de conversão oxidativa de sorbitol à sorbose, que é um intermediário importante na produção da vitamina C (SPINOSA, 2002). Estas bactérias possuem características próprias como capacidade de produzir exopolissacarídeos (EPS), como a celulose, e a presença de enzimas como álcool desidrogenase e aldeído desidrogenase (MACAULEY et al., 2001; KLAUPIYAPAMORNKUN; BOVONSOMBUT e BOVONSOMBUT, 2015). Possui ampla utilização comercial, já conhecida, na elaboração de produtos farmacêuticos e em alimentos (KLAUPIYAPAMORNKUN; BOVONSOMBUT e BOVONSOMBUT, 2015, GOMES et al., 2018). Vários fatores podem influenciar na composição dos compostos produzidos durante a fermentação do kombucha como temperatura e pH de cultivo, e também a microbiota associada, que é a responsável pela maioria dos produtos formados (NEFFE-SKOCIŃSKA et al., 2017). Desta forma é esperado uma variação quanto a composição de bactérias dependendo da matriz utilizada e do



local de origem além dos outros parâmetros físicos para a fermentação do kombucha.

Assim este trabalho objetivou isolar e caracterizar bactérias com características ácidas do gênero *Gluconacetobacter* de três amostras de kombucha cultivadas no estado de Goiás.

Material e Métodos

Obtenção dos isolados/amostras: Três matrizes de kombucha de diferentes procedências foram obtidas comercialmente (M1, M2 e M3) e cultivadas em chá preto contendo açúcar (50g L^{-1}) para obter o crescimento das colônias. Foram cultivadas durante 10 dias e o sobrenadante (1 mL) da cultura foi coletado. A alíquota coletada foi inoculada nos meios GYC e meio LGI-P (HUNGRIA; SILVA, 2011), e as placas foram incubadas entre a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ por até 7 dias para observar o crescimento de colônias. Após o crescimento, as colônias bacterianas de cada amostra foram coletadas e mantidas em meio líquido GY em glicerol (30%) estéril, e mantidas em freezer, para as avaliações posteriores.

Caracterização bioquímica: Os isolados foram avaliados bioquimicamente quanto à capacidade de crescimento em testes em placas com fontes de carbono (ácido acético, frutose, inositol, ácido maleico, trealose, glicerol, sorbitol, arabinose) que são adicionados assepticamente (SHARAFI; RASOOLI e BEHESHTI-MAAL, 2014). Também foram utilizados testes em placas para a detecção da presença de enzimas (proteases, lipases, amilases) segundo Cattelan (1999) e avaliados a produção de ácido em meio GYC, que contem cálcio. Utilizando este meio foi avaliada a capacidade de solubilização do cálcio pelo índice de solubilização (IS). O IS foi calculado utilizando as medidas do diâmetro em cm do halo claro, formado pela solubilização do cálcio, e o diâmetro da colônia.

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 um total de 55 bactérias referentes às três diferentes matrizes utilizadas, sendo 12 bactérias à partir de M1 (designadas como KGC), 23 bactérias obtidas à partir de M2 (KGL), e 20 da matriz M3 (KKG).

O teste básico para considerar as bactérias pertencentes ao grupo de bactérias ácidas foi o crescimento em meio GYC (SANTOS, 2016) onde foi observado o surgimento de halos em torno das colônias dos isolados bacterianos. Este halo é esperado, pois estas bactérias exsudam ácidos, principalmente ácido acético, que solubiliza o hidróxido de cálcio e torna o meio límpido, sendo uma das características esperadas para as bactérias ácidas do gênero *Gluconacetobacter*. Dentre as bactérias ácidas já observadas em kombucha há um predomínio dos gêneros *Acetobacter* e *Gluconacetobacter* (GOMES et al., 2018). A diferença entre estas duas bactérias esta principalmente em seu metabolismo onde se destaca a capacidade de utilizar lactato (SWINGS; DE LEY, 1981).

Foi ainda realizado teste de presença de lactose, pelo meio MacConkey, com resultado positivo para todos os isolados das amostras KGL e KGLB, e resultado negativo para todos os isolados KGC indicando que as bactérias podem ter outra estratégia metabólica e não ser dos gêneros esperados. O gênero *Acetobacter* não possui a capacidade de utilizar alguns açúcares como trealose e lactose (SWINGS; DE LEY, 1981; KADERE et al. 2008). Assim foi observado que em 8 isolados (KGC-1, KGC-2, KGC-3, KGC-4, KGC-, KGC-11, KGC-15, KGC-16), não houve crescimento em trealose, o que pode indicar que estas bactérias possam ser do gênero *Acetobacter*. A classificação das bactérias isoladas de kombucha, como ácidas, foi obtida a partir do crescimento em meio AAM que utiliza ácido acético e etanol como fontes de carbono indicando que todas apresentam metabolismo ácido (SWINGS; DE LEY, 1981; KADERE et al. 2008). Mas a classificação definitiva destes isolados deverá ser realizada a partir de outros testes bioquímicos, como avaliar a produção de ácido acético e ácido glucurônico e caracterização genética.

As caracterizações bioquímicas foram realizadas para os 55 isolados obtidos das 3 matrizes de 15 diferentes meios de cultivo. Através dos resultados foi possível



diferenciar as bactérias quanto ao metabolismo. O meio LGI-P é meio semi-seletivo para *Gluconoacetobacter*, e o meio Carr e AAM é seletivo para bactérias ácidas, assim com o meio GYC e que tem a finalidade de detectar bactérias ácidas como as da família *Acetobacteriaceae*, com formação de um halo claro ao redor das colônias, indicando a solubilização do cálcio por meio da liberação de compostos ácidos no meio.

A determinação capacidade de formação de ácido e solubilização do carbonato de cálcio foi obtida para 35 isolados das amostras M1 e M2 sendo que os isolados da M3 não apresentou capacidade de formar halo. A partir dos isolados que formaram halo de solubilização foi estimado o índice de solubilização (IS), expresso pela relação do diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia em cm (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975) (Tabela 1).

Todos os 35 isolados testados apresentaram índices de solubilização de cálcio, sendo que a média geral dos índices dos 12 isolados KGC (M1) foi de 1,6 e a média dos 23 isolados KGL foi um pouco superior de 1.9. Estes resultados indicam que as bactérias tem um comportamento semelhante em relação a esta característica indicando que podem ser da mesma família bacteriana, mas outros testes serão realizados para confirmar esta hipótese. Entre os isolados da amostra M1 o maior IS foi observado para o isolado KGC 5 ($IS=2$), e o menor para os isolados KGC15 e KGC 24 com IS de 1,44. Já os isolados da amostra M2, 43% dos isolados apresentaram $IS \geq 2$ sendo que para o isolado KGL-7 foi observado o maior IS de 2,25. Por estes dados já é possível indicar que os isolados das duas amostras têm diferenças quanto à atividade enzimáticas de liberação de compostos ácidos para a solubilização de cálcio do meio GYC, indicando uma diferença metabólica da amostragem populacional bacteriana nas duas amostras avaliadas.

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-1	1,86	KGL-6	2,22	KGL-35	2,10
KGC-2	1,71	KGL-7	2,25	KGL-36	1,82
KGC-3	1,71	KGL-8	1,90	KGL-37	1,20
KGC-4	1,63	KGL-9	2,00	KGL-38	1,64
KGC-5	2,00	KGL-10	2,22	KGL-39	2,00
KGC-11	1,33	KGL-21	2,00	KGL-40	1,80
KGC-15	1,44	KGL-22	2,00	KGL-41	2,00
KGC-16	1,56	KGL-23	1,82	KGL-42	2,20
KGC-17	1,63	KGL-24	1,73	KGL B-5	2,10
KGC-22	1,56	KGL-25	1,82	KGL B-41	1,60
KGC-23	1,30	KGL-26	2,00	KGL B-42	1,55
KGC-24	1,44	KGL-34	1,80		

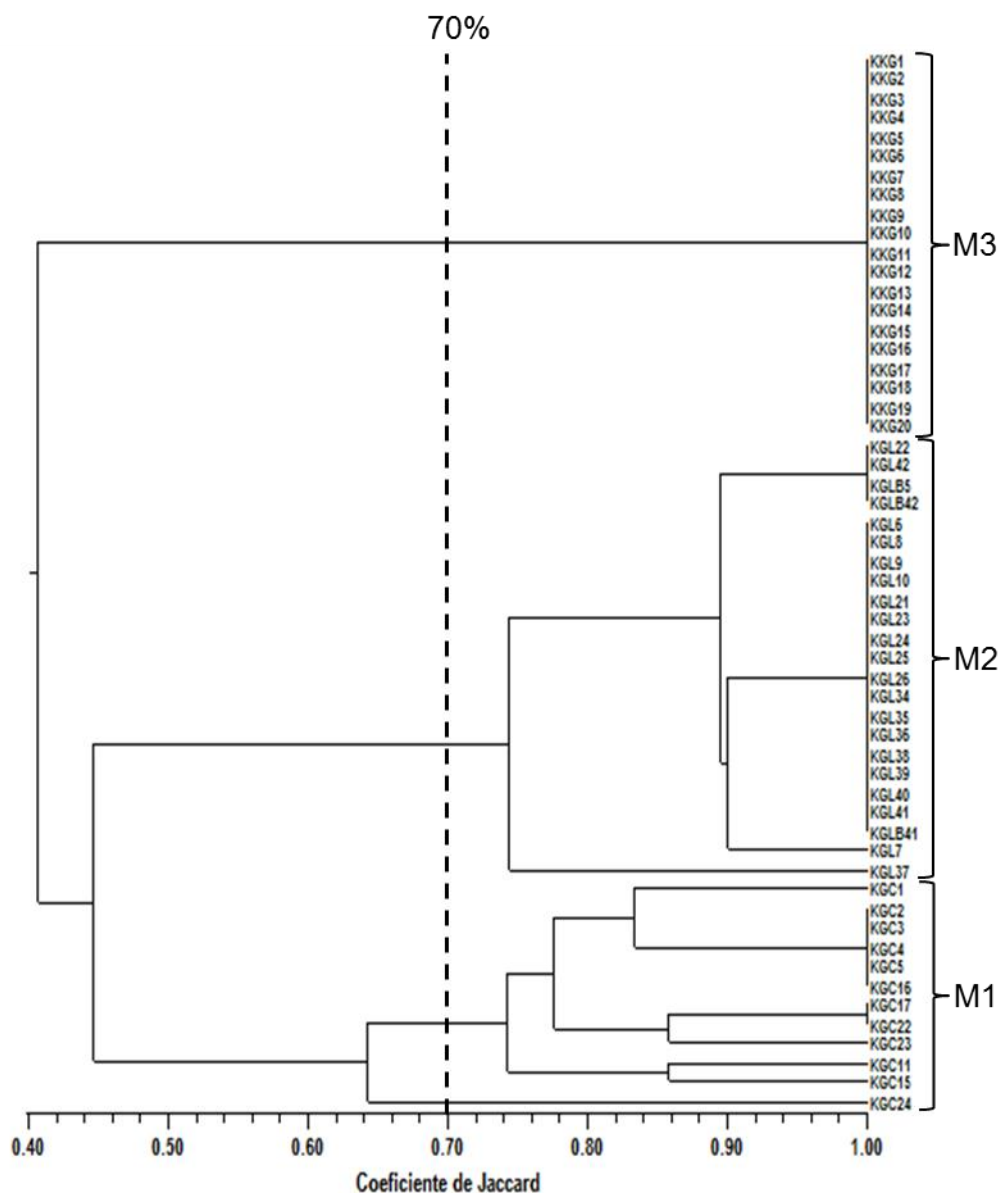
IS = índice de solubilização obtido entre o diâmetro do halo formado sobre o diâmetro da colônia.

Fonte: A autora deste trabalho, 2018.

A partir dos dados obtidos foi realizada a análise de agrupamento e estimada a similaridade entre as 55 bactérias isoladas das 3 amostras de kombucha (Figura 1). Por esta análise e utilizando arbitrariamente 70 % de similaridade foram identificados 3 grupos ou clusters mais similares e que houve uma influencia da fonte de isolamento, sendo observado que cada um dos grupos foi específico quanto a amostra utilizada (Figura 1). Pelo dendrograma foi também observado uma maior variação metabólica na amostra 1, pela presença de pontos de ramificação dentro do grupo, indicando diversidade interna (Figura 1).

Como esperado as diferentes fontes de mãe-de-kombucha houve uma diferença na composição das bactérias. O mesmo foi observado por NEFFE-SKOCIŃSKA et al. (2017) detectando diferenças na composição da microbiota associada a kombucha variando a temperatura de cultivo e o tempo. Há poucos estudos avaliando diferentes amostras de kombucha quanto à composição de bactérias ácidas, sendo necessários estudos destas bactérias para avaliar a diversidade taxonômica existentes nestas diferentes fontes avaliadas.

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.



Fonte: A autora deste trabalho, 2018.

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 70% 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.
- Os isolados obtidos serão utilizados para estudos posteriores e caracterização genética.

Agradecimentos

A Prof.^a Claudia Cristina Garcia Martin-Didonet por sua orientação. A Universidade Estadual de Goiás e a todos os colaboradores do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico 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.**, v.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**, v.60, p.328-340, 2013.

BLANC, P. J. Characterization of the tea fungus metabolites. **Biotechnol. Lett.**, v. 18, p.139–142, 1996.

CARR, J.G. Identification of acetic acid bacteria. In: **Identification methods for Microbiologists**, Part B. Gibbs BM, Shapton DA (eds). Academic Press, London, pp 1-8, 1968.

CATTELAN, A. J.; HARTEL, P. G.; FUHRMANN, J. J. Screening for rhizobacteria to promote early soybean growth. **Soil Science Society of America Journal**, v. 63, p.1670–1680, 1999.

GOMES, R. J.; BORGES, M. F.; ROSA, M. F.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H.; SPINOSA, W. A. Acetic Acid Bacteria in the Food Industry: Systematics, Characteristics and Applications. **Food Technol. Biotechnol.**, vol. 56, p. 239-151, 2018.

REALIZAÇÃO



HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. **Mycologia**, v. 67, n. 3, p. 597-607, 1975.

HUNGRIA, M.; SILVA, K. Manual de curadores de germoplasma – micro-organismos: rizóbios e bactérias promotoras do crescimento vegetal. **Documento 332**. Embrapa. Brasília, Distrito Federal, 2011.

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**, v.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.

KERSTERS. K.; LISDIYANTI. P.; KOMAGATA. K.; SWINGS. J. The Family *Acetobactaceae*: The Genera *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter*, and *Kozakia*. **Prokaryotes**. v.5, p.163–20, 2006.

KLAWPIYAPAMORNKUN, T.; BOVONSOMBUT, S.; BOVONSOMBUT, S. Isolation and characterization of acetic acid bacteria from fruits and fermented fruit juices for vinegar. **Prod. Food and Appl. Biosci. J.**, v.3 , p 30–38, 2015.

MACAULEY, S.; MCNEIL, B.; HARVEY, L.M. The genus *Gluconobacter* and its applications in biotechnology. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.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**, v.127, p.1727-1731, 2011.

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

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.



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**, v. 2, p. 41–48. 2010.

SANTOS, MAFALDA JORGE. **Kombucha: Caracterização da microbiota e desenvolvimento de novos produtos alimentares para uso em restauração**. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Gastronómicas pela Universidade Nova de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa – Portugal, 2016. 38-49 p.

SPINOSA, W. A. **Isolamento, seleção, identificação e parâmetros cinéticos de bactérias acéticas provenientes de indústrias de vinagre**. Campinas, Tese de Doutorado em Ciências de Alimento - Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, SP, 2002. 93 p.

SWINGS J.; DE LEY J. The genera *Gluconobacter* and *Acetobacter*. **In:** The Prokaryotes, a Hand book on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria. Starr MP, Stolp H, Truper HG, 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.**, v.86, p.1417-1420, 2011.