

## AVALIAÇÃO DE DOIS DIFERENTES MÉTODOS DE PURIFICAÇÃO DE ESPOROS BACTERIANOS

**LUCAS REICHERT MAUBRIGADES<sup>1</sup>; FRANCISCO DENIS SOUZA SANTOS<sup>2</sup>;  
VITÓRIA SEQUEIRA GONÇALVES<sup>3</sup>; NEIDA LUCIA CONRAD<sup>4</sup>; FÁBIO PEREIRA  
LEIVAS LEITE<sup>5</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [lucasmaubrigades@gmail.com](mailto:lucasmaubrigades@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [denis.santos195@gmail.com](mailto:denis.santos195@gmail.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – [vitoriasgon@gmail.com](mailto:vitoriasgon@gmail.com)

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – [conradneida@gmail.com](mailto:conradneida@gmail.com)

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – [fleivasleite@gmail.com](mailto:fleivasleite@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

Esporos são estruturas proteicas extremamente resistentes produzidas por algumas bactérias em resposta a condições ambientais adversas (HUANG et al., 2008). Por sua estabilidade e resistência a altas temperaturas, esporos de algumas espécies de bactérias do gênero *Bacillus*, como *Bacillus subtilis* e *Bacillus toyonensis*, são amplamente utilizados como probióticos na alimentação humana e animal (CUTTING, 2011). Além disso, também representam um indicativo para a validação de processos de esterilização e possuem propriedades imunomoduladoras, sendo capazes de aprimorar a eficácia de vacinas convencionais e recombinantes (KLAMPFL et al., 2012; DE SOUZA et al., 2014; ISTICATO, RICCA & BACCIGALUPI, 2019). Entretanto, a contaminação da preparação de esporos com células vegetativas viáveis ou inativadas, ou mesmo detritos celulares, pode interferir nas respostas imunológicas induzidas pelos抗ígenos associados aos esporos (TAVARES et al., 2013). Portanto, a produção de esporos altamente purificados e com alto rendimento representam um elemento essencial no processo de desenvolvimento de vacinas utilizando esporos em sua formulação.

A produção e purificação de esporos de *B. subtilis* e *B. toyonensis*, bem como de outras espécies de *Bacillus*, envolvem duas etapas principais. A primeira é a obtenção de um cultivo com elevada concentração de esporos, que pode ser alcançado apenas em condições de crescimento específicas e com a utilização do meio de cultura apropriado (POSADA-URIBE et al., 2015). A segunda etapa é o método de purificação dos esporos, os quais devem ser separados de células vegetativas e detritos celulares. Vários protocolos de purificação de esporos foram relatados usando diferentes espécies de *Bacillus*, porém os dados de rendimento e níveis de pureza em relação à contaminação com células vegetativas e detritos celulares, são de grande importância e geralmente não são discutidos (DRAGON & RENNIE, 2001; MONTEIRO et al., 2005).

Na tentativa de melhorar a reprodutibilidade do processo de purificação de esporos bacterianos e obter amostras com alta taxa de pureza, o objetivo do trabalho foi avaliar dois diferentes métodos de purificação de esporos em cultivos de *B. subtilis* e *B. toyonensis*.

### 2. METODOLOGIA

Para a produção dos esporos, os microrganismos *B. subtilis* ATCC 6633 e *B. toyonensis* BCT-7112<sup>T</sup> foram semeados em meio BHI ágar (Brain Heart Infusion, Difco) e incubados por 24 horas à temperatura de 37 °C. Colônias isoladas foram

inoculadas em frascos de 125 mL contendo 10 mL de meio LB (Luria-Bertani) incubados por 18 horas a 37 °C com agitação constante de 200 rpm. Esses cultivos foram inoculados em 90 mL de meio F (1% de glicose, 0.1% de L-glutamato, 0.05% de extrato de levedura, 0.5% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.1% de  $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ , 0.02% de  $\text{MgSO}_4$ , 0.01% de  $\text{NaCl}$ , 0.005% de  $\text{CaCl}_2$ , 0.0007% de  $\text{MnSO}_4$ , 0.001% de  $\text{ZnSO}_4$ , e 0.001% de  $\text{FeSO}_4$ ) (FOERSTER & FOSTER, 1966) e incubados em agitador orbital por 96 horas a 37 °C. Os cultivos foram centrifugados a 10.000 x g durante 10 minutos e concentrados em um volume final de 20 mL. Após, foram mantidos em banho-maria a 68 °C por 3 horas para inativação de células vegetativas. Em seguida, foi realizada a purificação dos esporos de acordo com dois diferentes métodos descritos anteriormente: o método 1 (tratamento com KCl 1M,  $\text{NaCl}$  0.5M, Tris HCl 50 mM, lisozima, SDS 0.05%. TRIS 50 mM e EDTA 10 mM) por NICHOLSON & SETLOW (1990) e o método 2 (tratamento com Tris HCl 50 mM, lisozima e SDS 0.05%) por TAVARES et al. (2013). A avaliação da pureza foi realizada ao final do processo por meio de coloração de Wirtz-Conklin e observação da lâmina em microscópio óptico. O rendimento de cada método foi calculado de acordo com ZHAO et al. (2008), através da concentração de esporos obtida após aplicação do método de purificação dividido pela concentração do cultivo de esporos após 96 horas (antes da purificação) x 100. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. A análise estatística foi realizada utilizando análise de variância (two-way ANOVA) com o auxílio do software GraphPadPrism 11 v7.0d (GraphPad Software, CA, USA).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

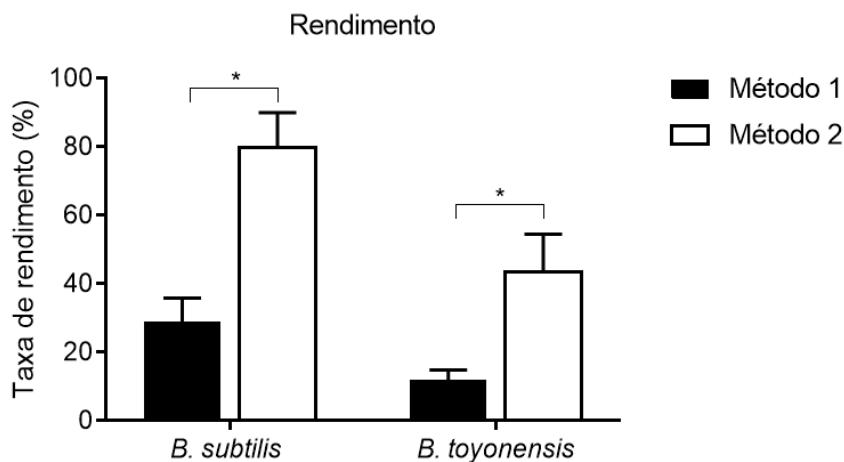
Conforme demonstrado na Tabela 1, a concentração do cultivo de esporos de *B. subtilis* obtida ao final das 96 horas foi de  $5,6 \times 10^7$  UFC/mL. Após ser submetido ao método de purificação 1, o cultivo apresentou concentração de  $1,2 \times 10^7$  UFC/mL, ao passo que após a aplicação do método de purificação 2, apresentou concentração de  $3,9 \times 10^7$  UFC/mL. Quando avaliado o cultivo de *B. toyonensis* obtido ao final das 96 horas, observou-se uma concentração de  $9,2 \times 10^8$  UFC/mL. Após ser submetido ao método de purificação 1, apresentou  $8,1 \times 10^7$  UFC/mL, enquanto que após a aplicação do método de purificação 2, resultou em  $3 \times 10^8$  UFC/mL.

**Tabela 1.** Contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) de *B. subtilis* e *B. toyonensis* cultivados em meio F antes e após purificação dos respectivos esporos por dois métodos distintos. Os valores apresentados representam a média de três replicatas.

Microrganismo	Antes da purificação (96h)	Método de purificação 1	Método de purificação 2
<i>B. subtilis</i>	$5,6 \times 10^7$ UFC/mL	$1,2 \times 10^7$ UFC/mL	$3,9 \times 10^7$ UFC/mL
<i>B. toyonensis</i>	$9,2 \times 10^8$ UFC/mL	$8,1 \times 10^7$ UFC/mL	$3 \times 10^8$ UFC/mL

Os cultivos bacterianos ao final das 96 horas obtiveram uma alta taxa de esporulação, atingindo em torno de 95% de esporos. Quando analisado o rendimento de cada cultivo (Figura 1), foi observado que o cultivo de *B. subtilis*

obteve valores de 28% após a purificação pelo método 1 e 80% após a purificação pelo método 2. O cultivo de *B. toyonensis* apresentou rendimento de 12% após a purificação pelo método 1 e de 43% após a purificação pelo método 2.



**Figura 1.** Taxa de rendimento dos cultivos de *B. subtilis* e *B. toyonensis* após cada método de purificação

Protocolos que utilizam tratamento com lisozima e lavagens múltiplas podem fornecer taxas de pureza de esporos acima de 98% (HARWOOD & CUTTING). Essa informação é consistente com os resultados obtidos no presente trabalho, visto que os dois métodos avaliados utilizam a lisozima durante o processo e os cultivos apresentaram taxa de pureza aproximada de 95%. A lisozima é uma enzima que destrói o peptídeoglicano, principal componente da parede celular das bactérias Gram-positivas, causando sua lise (PRIMO et al., 2018).

Os dois métodos avaliados possuem lavagem com água, que consistem da centrifugação da suspensão de esporos, subsequente decantação do sobrenadante e ressuspensão do sedimento de esporos em água por homogeneização. Portanto, quanto maior o número de lavagens menor a concentração final de esporos, pois esporos podem ser perdidos durante o processo. Essa observação pode explicar o fato dos cultivos de esporos submetidos ao método 1, que é composto de um maior número de etapas e lavagens, terem apresentado um menor rendimento quando comparado ao método 2, que consistia de menos etapas e de um menor número de lavagens da suspensão de esporos. Esses dados estão de acordo com trabalhos anteriores, que também relataram um melhor rendimento e menores perdas utilizando métodos de purificação que possuíam menos lavagens (TAVARES et al., 2013, ZHAO et al., 2008). Portanto, os resultados indicam que o método 2 foi mais eficiente na purificação dos esporos, obtendo valores de rendimento superiores quando comparados ao método 1, além de apresentar uma maior concentração de esporos ao final do processo, visto que ocorrem menos perdas no número de esporos viáveis durante o processo.

#### 4. CONCLUSÕES

O presente estudo mostrou que o processo de purificação de esporos de *B. subtilis* e *B. toyonensis* pode ser significativamente aprimorado em relação a pureza e rendimento de recuperação, por meio da escolha do método de purificação. Em

conjunto, esses resultados representam uma contribuição relevante para futuros trabalhos que necessitem da utilização de esporos de *B. subtilis* e *B. toyonensis* com alta taxa de pureza.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CUTTING, S. M. *Bacillus* probiotics. **Food Microbiology**. v. 28, n. 2, p. 214-220, 2011.

DE SOUZA, R. D. et al., *Bacillus subtilis* Spores as Vaccine Adjuvants: Further Insights into the Mechanisms of Action. **PLoS ONE**, v. 9, 2014.

DRAGON, D. C. & RENNIE, R. P. Evaluation of spore extraction and purification methods for selective recovery of viable *Bacillus anthracis* spores. **Letters Applied Microbiology**, v. 33, p. 100–105, 2001.

FOERSTER, H. F & FOSTER, J. W. Endotrophic calcium, strontium, and barium spores of *Bacillus megaterium* and *Bacillus cereus*. **Journal of Bacteriology**, v. 91, p. 1333–1345, 1996.

HARWOOD, C. & CUTTING, S. **Molecular Biology Methods for *Bacillus***, John Wiley & Sons Ltd., 1990.

KLAMPFL, T. G. et al. Cold atmospheric air plasma sterilization against spores and other microorganisms of clinical interest. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 15, p. 5077–5082, 2012.

MONTEIRO, S. M. et al. A procedure for high-yield spore production by *Bacillus subtilis*. **Biotechnology Progress**, 21:1026–1031, 2005.

NICHOLSON W. L. & SETLOW P. Sporulation, germination and outgrowth. In: Harwood CR, Cutting SM (eds) **Molecular biological methods for *Bacillus***. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, p. 391–450, 1990.

POSADA-URIBE, L. F. et al. Effect of medium components and culture conditions in *Bacillus subtilis* EA-CB0575 spore production. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 10, p. 1879-1888, 2015.

PRIMO, E. D. et al. The disruptive effect of lysozyme on the bacterial cell wall explored by an in-silico structural outlook. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, 2018 v. 46, n. 1, p. 83-90.

SANTOS, F. D. S et al. *Bacillus toyonensis* improves immune response in the mice vaccinated with recombinant antigen of Bovine herpesvirus type 5. **Beneficial Microbes**, v. 9, p. 133-142, 2018.

TAVARES, M. B. et al. *Bacillus subtilis* Endospores at High Purity and Recovery Yields: Optimization of Growth Conditions and Purification Method. **Current Microbiology**. v. 66, p. 279-285, 2013.

ZHAO, J. et al. Evaluation of endospore purification methods applied to *Bacillus cereus*. **Separation and Purification Technology**. v. 61, n. 3, p. 341–347, 2008.