

EFEITO DO EXTRATO PIROLENHOSO NA CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE CEPAS DE ESCHERICHIA COLI ENTEROTOXIGÊNICA ISOLADAS DO TRATO GASTROINTESTINAL DE SUÍNOS

CARMEN M.S. AMBROSIO, CARMEN M.S. AMBROSIO¹; ALBERTO CLAUDIO MIANO¹; CÂNDIDA P. F. AZEVEDO²; EDUARDO M. DA GLORIA²; ALEXANDRE S. PIMENTA³; URBANO S. RUIZ²

¹ Dirección de Investigación y Desarrollo, Universidad Privada del Norte (UPN), PERU²ESALQ, Universidade de São Paulo, BRASIL³ Universidade Federal do Rio Grande do Norte, BRASIL

Contato: carmen.sinche@upn.edu.pe / Apresentador: CARMEN M.S. AMBROSIO

Resumo: O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antibacteriana de um extrato pirolenhoso (EP) sobre a cinética de crescimento de duas cepas de *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) isoladas do trato gastrointestinal de suínos. *E. coli* U21 (K88 LT/STb/F18/STa) e *E. coli* U7 (K88/LT/STb) foram submetidas a diversas concentrações do EP (0,047-6%) para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM), assim como, o efeito do EP sobre a cinética de crescimento das ETECs. As curvas da cinética de crescimento foram modeladas utilizando o modelo modificado de Gomperzt, o qual permitiu determinar a população bacteriana máxima (A), a taxa máxima de multiplicação (μ_{max}) e a duração da fase Lag (?). Os resultados da CIM e CBM mostraram que *E. coli* U7 foi mais sensível ao efeito de EP (CIM=3%; CBM=6%). No entanto, o EP causou alterações maiores na cinética de crescimento de *E. coli* U21, já que suas A e μ_{max} diminuíram conforme a concentração de EP foi aumentada. Contrariamente, ? aumentou conforme a concentração de EP foi aumentada. Para *E. coli* U7, somente μ_{max} foi afetada. Portanto, EP apresenta atividade antibacteriana sobre ETECs isoladas de suínos e tem potencial para ser uma alternativa aos antibióticos utilizados na alimentação de suínos.

PalavrasChaves: aditivo antimicrobiano; trato gastrointestinal; diarreia pós-desmame, suinocultura.

EFFECT OF A PYROLIGNEOUS EXTRACT ON THE GROWTH KINETICS OF ENTEROTOXIGENIC E. COLI ISOLATED FROM PIG GUT

Abstract: The aim of this study was to evaluate the antibacterial activity of a pyroligneous extract (PE) and its effect on growth kinetic of two enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) strains isolated from pig gut. *E. coli* U21 (K88 LT/STb/F18/STa) and *E. coli* U7 (K88/LT/STb) were exposed to several concentrations of PE ranging from 0.047-6% in order to determine the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal Bactericidal Concentration (MBC) as well as the effect of EP on the growth kinetics of both ETEC strains. The curves of the growth kinetics were modeled using the modified Gomperzt Model, which enabled to determine the maximal bacterial population (A), the maximum growth rate (μ_{max}) and the Lag phase duration (?). Results of the MIC and MBC showed the *E. coli* U7 was more sensitive to the PE effect (MIC=3%, MBC=6%). However, PE caused greater disturbances on the normal growth kinetics of *E. coli* U21, as it was observed that A and μ_{max} were reduced as much as the concentration of EP was increased. Conversely, ? was increased as much as PE concentration was increased. In *E. coli* U7 only μ_{max} was affected. Therefore, PE has an antibacterial activity on ETECs strains isolated from pig gut and PE has the potential to be an alternative to antibiotics in pig feeding.

Keywords: antimicrobial additive, gastrointestinal tract, post-weaning diarrhea, pig sector.

Introdução: O uso de antibióticos na alimentação de suínos tem sido comum desde 1950 para melhorar o desempenho animal (Teillant et al., 2015) e, entre outros fatores, controlar diarreia pós-desmame causada por *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC). No entanto, esta prática tem sido identificada como possível causa do surgimento de microrganismos resistentes aos antibióticos, e restrições ao seu uso na alimentação animal têm sido adotadas (MARSHALL; LEVY, 2011). Neste contexto, se faz necessário a busca por alternativas para substituir os antibióticos na suinocultura. O extrato pirolenhoso (EP) é obtido pela condensação da fumaça formada durante a carbonização da madeira para produção de carvão e estudos tem mostrado que EP tem propriedades antimicrobianas (DE SOUZA ARAÚJO et al., 2018). O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antibacteriana de um EP e seus efeitos sobre a cinética de crescimento de duas cepas de ETEC isoladas do trato gastrointestinal de suínos.

Material e Métodos: Foram utilizadas duas cepas de ETEC isoladas do trato gastrointestinal de suínos: *E. coli* U7 (K88/ LT/ STb) e *E. coli* U21 (K88/ LT/ STb/ F18/ Sta). A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada pelo método de microdiluição utilizando uma microplaca de 96 poços. Preparou-se um inóculo de 1×10^6 UFC/mL de cada bactéria em solução de NaCl (0,85%) e uma solução estoque do EP a 12% v/v com Caldo Müeller Hinton. A partir da solução estoque foram feitas diluições duplas seriadas em uma faixa de 6 a 0,047 % v/v. Vinte microlitros do inóculo foram adicionados a cada poço contendo 180 μ L das concentrações de EP. A microplaca foi incubada em um leitor de microplacas a 37°C por 24h. A CIM foi estabelecida como a menor concentração do EP que inibiu o crescimento bacteriano visível. A determinação da concentração bactericida mínima (CBM) foi realizada a partir dos poços onde não houve crescimento bacteriano visível. Semeou-se 50 μ L de cada poço em ágar Muller-Hinton. Após 20 h de incubação a 37°C, foi definida a CBM como a menor concentração de EP capaz de causar a morte da bactéria representada pela ausência de colônias no ágar. A cinética de crescimento bacteriano foi construída a partir de leituras de absorbância a 600 nm dos poços da microplaca, realizadas a cada hora durante 24 h. As curvas foram modeladas utilizando o modelo modificado de Gomperzt (ZWIETERING et al., 1990), o qual permitiu determinar a população bacteriana máxima (A), a taxa máxima de multiplicação (μ_{max}) e a duração da fase Lag (?). Os ensaios foram realizados em triplicata.

Resultado e Discussão: A *E. coli* U7 foi a cepa mais sensível ao efeito do EP, já que apresentou CIM mais baixo (CIM=3%) do que *E. coli* U21 (CIM=6%). No entanto, a CBM (6%) foi igual para ambas bactérias. O EP causou alterações maiores na cinética de crescimento de *E. coli* U21 do que *E. coli* U7, já que houve um efeito dose-dependente significativo do EP sobre os parâmetros da cinética de crescimento A, μ_{max} e λ de *E. coli* U21. No caso do parâmetro A, a concentração sub-CIM mais alta (1,5%) reduziu ($P<0,05$) A em 31,6% em relação ao controle (0% de EP). No caso de μ_{max} , este parâmetro foi reduzido seguindo uma tendência quadrática, sendo que a sub-CIM mais alta (1,5%) reduziu ($P<0,05$) em 68,6% μ_{max} em relação ao controle. Contrariamente, λ aumentou ($P<0,05$) conforme a concentração de EP foi aumentada seguindo uma tendência quadrática, sendo que EP a 1,5% aumentou ($P<0,05$) λ em 1,66 vezes em relação ao controle. Para *E. coli* U7, somente μ_{max} foi afetada ($P<0,05$). Estes resultados estão em linha com resultados prévios que mostraram que o EP é efetivo para causar a inibição de diversas cepas de *E. coli* causadoras de infecções (DE SOUZA ARAÚJO et al., 2018). Similarmente, a efetividade de três EP para inibir *E. coli* tem sido reportada (WEI; MA; DONG, 2010).

Tabela 1. Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM) do extrato pirolenhoso

Cepa bacteriana	Extrato pirolenhoso	
	CIM (% v/v) ¹	CBM (% v/v) ¹
<i>E. coli</i> U21	6	6
<i>E. coli</i> U7	3	6

¹Determinado por curvas de sobrevivência e teste de resazurina

Tabela 2. Parâmetros calculados do modelo modificado de Gompertz para cada concentração do extrato pirolenhoso avaliada.

C _{EP} ¹ (%)	<i>E. coli</i> U21				<i>E. coli</i> U7			
	A (OD _{600nm}) ^a	μ_{max} (h ⁻¹) ^a	λ (h) ^a	R ²	A (OD _{600nm}) ^b	μ_{max} (h ⁻¹) ^b	λ (h) ^b	R ²
6	-	-	21,00 ± 0,00	-	-	-	-	-
3	-	-	14,75 ± 2,34	0,95	0,876 ± 0,238	0,044 ± 0,002	20,46 ± 5,20	0,99
1,5	0,534 ± 0,092	0,030 ± 0,005	16,07 ± 5,80	0,96	0,787 ± 0,076	0,050 ± 0,005	15,77 ± 1,90	0,99
0,75	0,641 ± 0,114	0,034 ± 0,011	15,92 ± 3,16	0,97	0,769 ± 0,028	0,050 ± 0,001	15,23 ± 0,45	0,99
0,375	0,686 ± 0,067	0,035 ± 0,008	11,45 ± 0,84	0,98	0,727 ± 0,066	0,043 ± 0,005	15,84 ± 0,44	0,99
0,188	0,567 ± 0,076	0,042 ± 0,006	10,63 ± 0,23	0,97	0,756 ± 0,148	0,039 ± 0,005	17,23 ± 2,48	0,99
0,094	0,486 ± 0,113	0,039 ± 0,013	10,38 ± 0,37	0,99	0,694 ± 0,123	0,042 ± 0,005	15,12 ± 1,73	0,99
0,047	0,670 ± 0,104	0,067 ± 0,018	8,90 ± 0,67	0,99	0,769 ± 0,025	0,048 ± 0,004	15,45 ± 1,35	0,99
0,00	0,781 ± 0,094	0,095 ± 0,006	-	-	-	-	-	-

(-) parâmetros não determinados devido a inibição total do crescimento.

A = densidade da população bacteriana máxima, μ_{max} = taxa máxima de multiplicação, λ = duração da fase Lag

¹ Concentração do extrato pirolenhoso

^aHouve diferença significativa nos parâmetros da cinética de crescimento depois da exposição às concentrações do extrato pirolenhoso ($p<0,05$).

^bNão houve diferenças significativas ($p<0,05$).

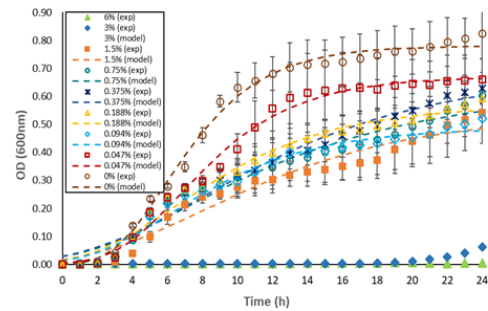
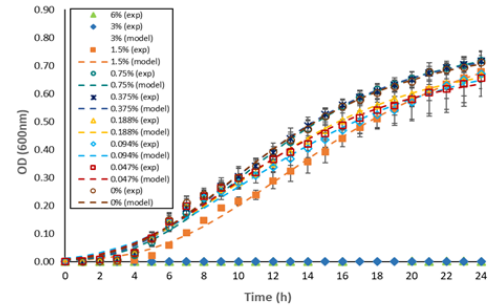


Figura 1: Cinética de crescimento bacteriano em função das concentrações do extrato pirolenhoso a) *E. coli* 7 e b) *E. coli* 21. Os pontos são os valores experimentais; as barras verticais são o desvio padrão e as curvas (linha tracejada) são os dados modelados.

Conclusão: O EP apresenta atividade antibacteriana sobre ETECs isoladas de suínos, causando sua inibição ou morte a concentrações de 3-6%. Além disso, concentrações sub-inibitórias de EP são capazes de alterar significativamente a cinética de crescimento de ETECs. Portanto, EP tem potencial para ser alternativa aos antibióticos utilizados na alimentação de suínos para combater infecções causadas por ETECs.

Agradecimentos: Agradecemos a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pelo financiamento desta pesquisa (Projeto 2019/16519-1) e a empresa Ibiré pelo fornecimento do extrato pirolenhoso.

Referências Bibliográficas: CROMWELL, G. L. Why and how antibiotics are used in swine production. *Animal biotechnology*, v. 13, n. March 2015, p. 7–27, 2002. DE SOUZA ARAÚJO, E. et al. Antibacterial and antifungal activities of pyrolytic acid from wood of *Eucalyptus urograndis* and *Mimosa tenuiflora*. *Journal of Applied Microbiology*, v. 124, n. 1, p. 85–96, 1 jan. 2018. MARSHALL, B. M.; LEVY, S. B. Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clinical microbiology reviews*, v. 24, n. 4, p. 718–33, 1 out. 2011. TEILLANT, A.; BROWER, C. H.; LAXMINARAYAN, R. Economics of Antibiotic Growth Promoters in Livestock. *Annual Review of Resource Economics*, v. 7, n. 1, p. 349–374, 2015. WEI, Q.; MA, X.; DONG, J. Preparation, chemical constituents and antimicrobial activity of pyrolytic acids from walnut tree branches. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, v. 87, n. 1, p. 24–28, 1 jan. 2010. ZWIETERING, M. H. et al. Modeling of the Bacterial Growth Curve. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, p. 1875–1881, 1990.