

RESUMO EXPANDIDO ESTRUTURADO:

Tipo: Estudo Original

**Detecção de bactérias produtoras de ácido láctico contaminantes de
cerveja através de reações de amplificação de DNA**

Detection of beer-contaminating lactic acid bacteria (LABs) through DNA amplification
reactions

Detección de bacterias productoras de ácido láctico (*lactic acid bacterias, LABS*)
contaminantes de la cerveza mediante reacciones de amplificación de ADN

Maria Vitória Cavalheiro Berlofa^{1*}[0009-0001-9949-0606], Milena Coutinho Natucci¹[0009-0001-3045-6493], Ana
Clara da Silva¹[0009-0001-6867-6184], Yara Natércia Lima Faustino de Maria¹[0000-0001-5249-1882], David Aciole
Barbosa^{1,3}[0000-0003-3875-2307], René Aduan Jr.³[0000-0002-5816-2630], Regina Costa de Oliveira³[0000-0002-2446-
5510], Fabiano B. Menegidio^{1,3}[0000-0002-4705-8352], Daniela L. Jabes^{1,3} [0000-0001-7297-0784], Luiz R.
Nunes^{1,2}[0000-0001-9619-269X].

INTRODUÇÃO

A indústria cervejeira no Brasil é um dos setores mais relevantes da economia brasileira, envolvendo desde grandes membros do agronegócio até pequenos varejos, contando com o comércio de embalagens, maquinário e logística, entre outros. Ao longo do processo de produção, este setor emprega 2,7 milhões de pessoas, produzindo aproximadamente 14 bilhões de litros de cerveja por ano, o que corresponde a ~2% do PIB (Produto Interno Bruto) do Brasil, com faturamento em torno de R\$100 bilhões/ano e respondendo pela terceira maior produtora cervejeira do mundo (atrás apenas de China e Estados Unidos). Além disso, dados recentes indicam aumento continuado no número de cervejarias no Brasil entre os anos de 2000 e 2021^(1,2).

BSMs (*Beer Spoilage Microorganisms*) são microrganismos deteriorantes de cerveja que causam prejuízo à indústria por alterar o aroma e sabor da bebida. Embora a cerveja seja considerada um ambiente desfavorável para o crescimento de microrganismos devido a algumas de suas características (como a elevada acidez, a ação microbicida do lúpulo e o baixo teor de oxigênio), há um número limitado de bactérias e leveduras que são capazes de crescer nesse ambiente. Dentre os BSMs, destacam-se as bactérias produtoras de ácido láctico (*Lactic Acid Bacteria* - BALs)⁽³⁾, que contribuem com 70% dos casos de contaminação de cervejas^(4,5,6,7).

Atualmente, os métodos de detecção de BSMs mais utilizados na indústria se restringem à análise de cultivo microbiológico, utilizando meios seletivos. Entretanto, esse procedimento é inespecífico e demorado, impactando o fluxo de distribuição de cervejas de junto ao mercado. Devido à ineficiência intrínseca destes métodos, é comum a ocorrência de casos em que as cervejarias precisem arcar com despesas financeiras não programadas para descartar ou retirar os produtos das prateleiras, além de

¹ Universidade de Mogi das Cruzes (UMC), Mogi das Cruzes, SP, Brasil. *E-mail: mariavitoriacavalheiro@gmail.com

² Universidade Federal do ABC (UFABC), São Paulo, SP, Brasil.

³ EasyOmics

enfrentar possíveis reclamações, resultando em perda de credibilidade por parte dos consumidores em relação à marca⁽⁸⁾. Nesse contexto, faz-se necessária a detecção desses microrganismos através de uma técnica mais eficaz, rápida e com maior sensibilidade/especificidade, a fim de evitar maiores perdas para a indústria cervejeira.

OBJETIVO

Avaliar a especificidade de *primers* específicos para detectar a bactéria produtora de ácido láctico *Lentilactobacillus buchneri*, comumente destacada como contaminante de cerveja, através de ensaios de PCR.

MATERIAL E MÉTODOS

Como microrganismo controle do gênero *Lactobacillus*, foi utilizado o *Lentilactobacillus buchneri* (CCT 0847 – Fundação André Tosello) e seu cultivo realizado em meio MRS (De Man, Rogosa e Sharpe). O microrganismo foi estriado em placa de Petri com uma alça de platina e incubado por até 72h a 35°C. Para os testes de especificidade, utilizamos DNA de 28 microrganismos, entre bactérias e fungos, adquiridos de diferentes coleções microbiológicas. Os fungos testados foram: *Zygosaccharomyces rouxii*, *Saccharomyces cerevisiae* S33, *Malassezia furfur*, *Trichoderma* sp., *Brettanomyces bruxellensis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Wickerhamomyces anomalus*, EC118, *Fusarium verticillioides*, *Alternaria* sp. e, as bactérias: *Bacillus coagulans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* sp., *Citrobacter freundii*, *Kocuria kristinae*, *Klebsiella aerogenes*, *Zymomonas mobilis*, *Vibrio fischeri*, *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Pediococcus* sp. Todos os microrganismos foram crescidos em meios de cultura apropriados, de acordo com as instruções adquiridas de suas respectivas fontes e seus DNAs foram extraídos (individualmente), com o auxílio do DNeasy Blood & Tissue Kit, de acordo com as instruções do fabricante (Qiagen). A integridade do material extraído foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose 2% (dados não mostrados).

Em seguida, foram desenhados 3 pares de *primers* específicos para *L. buchneri* na plataforma IDT, utilizando sequências disponíveis no banco NCBI, e sintetizados pela *Thermo Fisher*. Nos testes de especificidade, foram preparados dois *pools*, um contendo DNA de bactérias e outro de fungos, contendo 10 ng/uL de DNA genômico (DNAg) dos diferentes microrganismos acima citados. Para controle positivo, foi utilizado um par de *primers* para a região conservada do gene ribossomal 16S rRNA (348 bp), capaz de amplificar bactérias em geral. As reações de PCR consistiram em 40 ng de DNA, 0,5 µl (cada) do primer *forward* e *reverse* (10 µM), 1 µL de dNTP's (10 mM), 1,5 µL de Buffer MgCl₂ (50 mM), 0,2 µL Taq Sinapse DNA polimerase (Invitrogen) em um volume final de 25 µL. O processo de ciclagem foi feito nas seguintes

¹ Universidade de Mogi das Cruzes (UMC), Mogi das Cruzes, SP, Brasil. *E-mail: mariavitoriacavalheiro@gmail.com

² Universidade Federal do ABC (UFABC), São Paulo, SP, Brasil.

³ EasyOmics

condições: 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos (95°C por 45s, 57°C por 45s e 72°C por 45s) e 72°C por 10 min. O resultado foi avaliado através de eletroforese em gel (agarose a 1,5%) corado com brometo de etídeo.

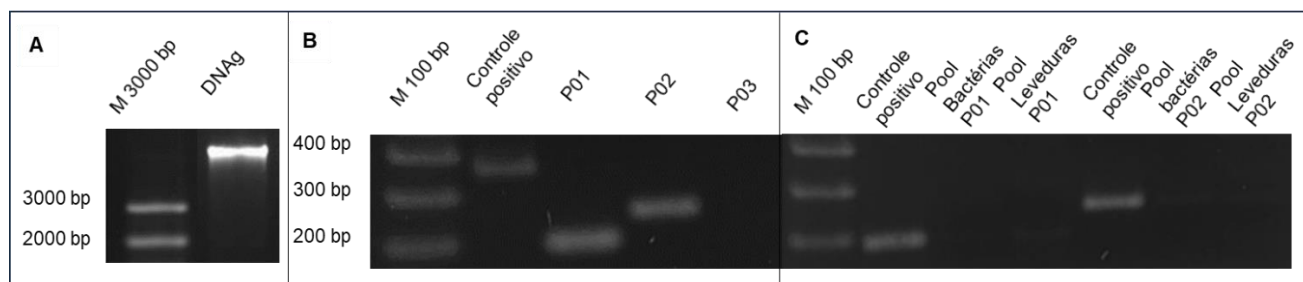
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na extração, obtivemos 1,65 µg de DNAg de *L. buchneri* e sua integridade estava preservada, como pode ser verificado na Figura 1A, que apresenta o resultado da eletroforese em gel de agarose. Em seguida, foram desenhados e sintetizados três conjuntos de *primers* (P01, P02 e P03), gerando fragmentos de, respectivamente, 200 bp, 280 bp e 200 bp. Como resultado da amplificação por PCR realizada individualmente com cada um desses conjuntos de *primers*, foi possível amplificar o DNA de *L. buchneri* utilizando os pares P01 e P02 (*amplicons* de 200 pb e 280 pb). Entretanto, com o conjunto P03 não obtivemos resultado positivo (Figura 1B).

Para avaliar a especificidade dos conjuntos de *primers*, testes de PCR contendo DNA total de 13 bactérias e 15 fungos foram realizados. As espécies foram escolhidas por serem frequentemente encontradas no ambiente cervejeiro como contaminantes ou membros da microbiota/micobiota comum da água, lúpulo, malte e pele humana. Conforme apresentado na Figura 1C, os pares de *primers* P01 e P02 não amplificaram o *pool* de DNA de bactérias e fungos, o que garante a especificidade de ambos em amplificar somente o material genético de *L. buchneri*. Diante desses resultados, os conjuntos P01 e P02 parecem ser viáveis para detecção de *L. buchneri*.

FIGURA 1. Eletroforese em gel de agarose 2% do DNAg de *Lentilactobacillus buchneri* (A) e produtos da reação de PCR (B e C).

No painel A: A extração de DNA total de *L. buchneri* resultou em uma banda única e íntegra, estando apta para continuação dos experimentos. Painel B: Amplificação a partir de DNA total de *L. buchneri* com os *primers* P01, P02 e P03, mostrando que os conjuntos P01 e P02 funcionaram, obtendo *amplicons* únicos de 200 pb e 280 pb, respectivamente, enquanto a reação com o conjunto P03 não funcionou. Painel C: Teste de especificidade utilizando os *primers* P01 e P03 com os *pools* de bactérias e leveduras. Como resultado, ambos pares de *primers* não amplificaram a partir dos *pools* de DNAs heterólogos, demonstrando que tanto o P01 e P02 são específicos para *L. buchneri*.



¹ Universidade de Mogi das Cruzes (UMC), Mogi das Cruzes, SP, Brasil. *E-mail: mariavitoriacavalheiro@gmail.com

² Universidade Federal do ABC (UFABC), São Paulo, SP, Brasil.

³ EasyOmics

Fonte: os autores.

A importância em detectar *L. buchneri* com pares de *primers* específicos é primordial, tendo em vista que esta espécie bacteriana é frequentemente encontrada como deteriorante na indústria cervejeira, alterando o sabor e aroma da bebida. Esse estudo identificou dois conjuntos de *primers* que apresentam potencial para aprimorar as técnicas atuais de detecção de BSMs na indústria cervejeira, o que pode conferir maior precisão e eficácia aos testes de que utilizam a amplificação de DNA^{8,9,10}. No entanto, ressaltamos a necessidade de realizar novos testes para avaliar a sensibilidade dos conjuntos gerados a fim de serem usados, no futuro, para o desenvolvimento de testes qualitativos e quantitativos em ambientes industriais.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo avaliou a especificidade de três pares *primers* em ensaios de PCR para a detecção *Lentilactobacillus buchneri*, bactéria produtora de ácido láctico comumente destacada como contaminante de cerveja. Dentre os conjuntos testados, dois se mostraram eficientes, tanto em amplificar o DNA de *L. buchneri*, como em não amplificar o material genético de 13 espécies de bactérias e 15 fungos. Portanto, os dois conjuntos se mostraram eficientes em reconhecer esse BSM de maneira específica e poderão ser utilizados, no futuro, em testes qualitativos/quantitativos desenvolvidos para uso na indústria cervejeira.

REFERÊNCIAS

- (1) Anuário da Cerveja. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2021.
- (2) Cerv Brasil. Associação Brasileira da Indústria da Cerveja. 2021.
- (3) Jevons, A. L. & Quain D. E. Identification of spoilage microflora in draught beer using culture-dependent methods. J. Appl. Microbiol. 2022.
- (4) Rodríguez-Saavedra, M. et al. Pectinatus spp. – Unpleasant and recurrent brewing spoilage bacteria. International Journal of Food Microbiology. 2021.
- (5) Xu, Z. et al. Genomic analysis of a hop-resistance *Lactobacillus brevis* strain responsible for food spoilage and capable of entering into the VBNC state. Microbial Pathogenesis. 2020.
- (6) Xu, Z. et al. Spoilage Lactic Acid Bacteria in the Brewing Industry. Journal of microbiology and biotechnology. 2020.
- (7) De Vuyst, L. & Frédéric, L. Functional Role of Yeasts, Lactic Acid Bacteria and Acetic Acid Bacteria in Cocoa Fermentation Processes. FEMS Microbiology Reviews. 2020.
- (8) Condina, M. R. et al. Rapid Separation and Identification of Beer Spoilage Bacteria by Inertial Microfluidics and MALDI-TOF Mass Spectrometry. Lab on a Chip. 2019.

¹ Universidade de Mogi das Cruzes (UMC), Mogi das Cruzes, SP, Brasil. *E-mail: mariavitoriacavalheiro@gmail.com

² Universidade Federal do ABC (UFABC), São Paulo, SP, Brasil.

³ EasyOmics

- (9) Heini, S.& Reingard, G. Systems Biology of Robustness and Flexibility: Lactobacillus Buchneri-A Show Case. Journal of Biotechnology, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.01.007>.
- (10) Eliodório K. et al. Advances in yeast alcoholic fermentations for the production of bioethanol, beer and wine. Gadd GM, Sariaslani S, editors. ScienceDirect. Academic Press; 2019. p. 61–119.

¹ Universidade de Mogi das Cruzes (UMC), Mogi das Cruzes, SP, Brasil. *E-mail: mariavitoriacavalheiro@gmail.com

² Universidade Federal do ABC (UFABC), São Paulo, SP, Brasil.

³ EasyOmics