

REDUÇÃO DO ÓXIDO DE TRIMETILAMINA POR BACTÉRIAS

Genésio Alves de Araújo — Gustavo Hitzschky Fernandes Vieira
Regine Helena S. Fernandes Vieira — Francisco José Siqueira Telles

Laboratório de Ciências do Mar
Universidade Federal do Ceará
Fortaleza — Ceará — Brasil

O óxido de trimetilamina (TMAO) é uma base nitrogenada encontrada em peixes marinhos, bem como em vários grupos de invertebrados, especialmente moluscos e crustáceos (Delaunay, 1967).

Sabe-se que a redução do TMAO produz trimetilamina (TMA), sendo este último composto utilizado como indicador da decomposição do tecido muscular, na maioria dos animais marinhos. A qualidade dos filés de peixes tem sido estimada pela quantidade de TMA detectada (Castell *et al.*, 1974).

Nos peixes, a formação de TMA a partir de TMAO é atribuída à ação de bactérias (Liston *et al.*, 1968), ou de enzimas encontradas nos cecos pilóricos (Amano & Yamada, 1964). Liston *et al.* (1968) indicam a enzima triaminase como responsável pela redução de TMAO a TMA, causada por bactérias, principalmente as do gênero *Pseudomonas* (Migula). Entretanto, continua discutível a relação entre a produção de TMA e a deterioração bacteriana do pescado (Laycock & Regier, 1971).

Poucos estudos foram feitos para demonstrar a transformação do TMAO em TMA, por ação das bactérias. Os métodos para medir a formação de TMA, a partir da reação entre TMAO e bactérias (meio de Wood & Baird *in* Wilson & Miles, 1966), preconizam um tempo de reação de quatro dias.

O presente trabalho objetiva diminuir este tempo da reação envolvendo TMAO e bactérias, estuda algumas das suas propriedades, e testa a eficiência de bactérias, para a produção de TMA a partir de TMAO.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas *Escherichia coli* (Migula) e espécies dos gêneros *Klebsiella* (Trevisan), *Proteus* (Hauser) e *Staphylococcus* (Rosenbach), classificadas de acordo com

Breed *et al.* (1957). A fim de se obter colônias isoladas, as bactérias foram semeadas em placas de Petri, devidamente esterilizadas, contendo os meios de Chapmann — para o desenvolvimento de *Staphylococcus* — e de CLED (Cystine — Lactose — Eletrolite — Deficient) — para *Escherichia coli*, *Klebsiella* e *Proteus*, sendo depois incubadas na estufa a 37°C, durante 24 horas.

Para a preparação da suspensão de bactérias foram tomadas 20 colônias e homogeneizadas em Potter, com 20,0 ml de tampão fosfato (0,01 M em NaCl 0,1 M, pH = 7,0), previamente esterilizado. O homogenato foi filtrado através de papel filtro qualitativo n.º 595 (Carl Schleicher & Schull).

A atividade triaminásica, medida na suspensão de bactérias, foi determinada como a capacidade de reduzir o óxido de trimetilamina (TMAO) a trimetilamina (TMA). A reação desenvolveu-se pela adição de 0,5 ml da suspensão de bactérias a 5,0 ml do meio de Wood & Baird, previamente esterilizado (pH = 7,2).

A incubação da mistura foi feita à temperatura de 37°C, durante 5 horas. Parou-se a reação pela adição de 3,0 ml de ácido tricloroacético (TCA) a 4%. A concentração de trimetilamina formada foi determinada pelo método de Dyer's, modificada por Shevan (*in* Uchiyama *et al.*, 1972). O tempo zero ou branco da reação correspondeu à adição de 0,5 ml da suspensão bacteriana a 5,0 ml do meio de Wood & Baird sem TMAO, o qual foi adicionado após a adição de TCA a 4%, conservadas as demais condições de incubação. Todos os valores de densidade ótica das amostras foram subtraídos daqueles referentes aos brancos. A unidade de atividade enzimática correspondeu à variação de 0,01 de densidade ótica, e foi expressa em unidade de atividade por colônia.

A determinação do pH ótimo baseou-se na incubação de bactérias no meio de Wood & Baird, com pH entre 5,0 e 12,0.

Para se conhecer a variação da atividade triaminásica, em função da temperatura e tempo, foram utilizadas as temperaturas de 30, 37 e 45°C e tempos de 2 a 6 horas.

A atividade triaminásica em função do pH, temperatura e tempo de reação foi semelhante para todas as bactérias estudadas; por isto, os dados apresentados são relativos apenas a *Escherichia coli*, tendo as demais bactérias apresentado comportamentos semelhantes, diante destes parâmetros.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A transformação de TMAO a TMA, através de bactérias, tem sido reportada por vários autores (Delaunay, 1967 ; Liston *et al.*, 1968 ; Laycock, 1971), que não esclarecem como as bactérias estão envolvidas no processo.

A atividade triaminásica apresentou um pico máximo em pH 7,0 (tabela I, figura 1), semelhante ao encontrado por Wood & Baird (Wilson & Miles, 1966). Isto parece indicar a participação de somente uma enzima no sistema TMAO — TMA. O pH 7,0 está próximo daquele usado nos meios de cultura, para o crescimento em estudo.

TABELA I

Variação da atividade triaminásica de *Escherichia coli* (Migula), em função do pH do meio, à temperatura de 37°C.

pH do meio	Unidade de atividade	
	x colônia	x horas
5,0	263,6	
6,0	425,0	
7,0	680,0	
8,0	569,6	
9,0	459,0	
10,0	211,6	
11,0	34,0	
12,0	8,5	

A variação da atividade triaminásica, em função da temperatura e do tempo de incubação (tabela II, figura 2), indica um aumento diretamente proporcional desta atividade com o tempo, sendo 37°C a temperatura ótima da reação. O crescimento exponencial das bactérias induz o aumento da concentração de triaminase, que se manifesta numa proporcionalidade entre a velocidade de reação com o tempo de incubação, desde que o substrato esteja em excesso. Por outro lado, observa-se que um homogenato de bactérias, preparado como no presente estudo, possibilita a formação de TMA em nível favorável à sua detecção quantitativa, a partir de 4 horas de incubação. Isto se reveste de grande importância,

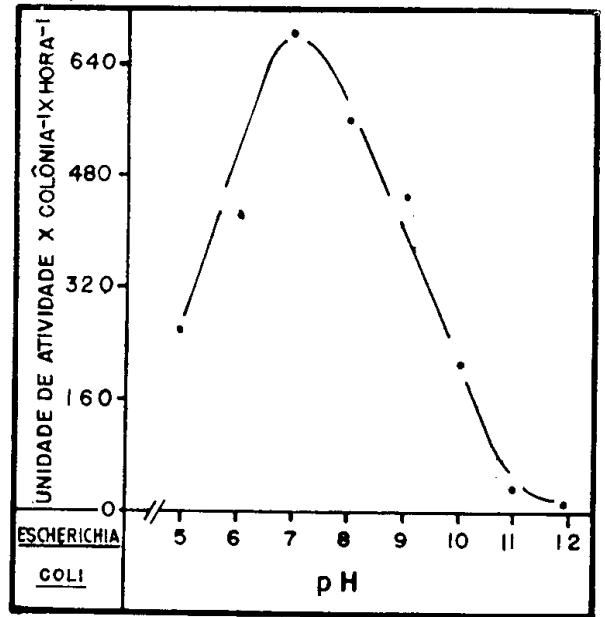


Figura 1 — Variação da atividade triaminásica de *Escherichia coli* (Migula), em função do pH. Período de incubação = 5 horas.

TABELA II

Variação da atividade triaminásica de *Escherichia coli* (Migula), em função da temperatura e tempo de ensaio

Temperatura (°C)	Unidade de atividade x colônia				
	tempo de incubação (horas)				
	2	3	4	5	6
30	0,0	63,8	867,0	2.550,0	3.995,0
37	43,0	425,0	2.550,0	2.890,0	4.250,0
45	43,0	149,0	1.488,0	2.720,0	4.038,0

TABELA III

Atividade triaminásica de várias espécies de bactérias, incubadas a 37°C, em pH = 7,0.

Bactérias	Unidade de atividade	
	x colônia	x horas
<i>Escherichia coli</i>	620,0	
<i>Staphylococcus</i>	25,6	
<i>Klebsiella</i>	187,0	
<i>Proteus</i>	527,0	

tendo em vista a grande redução do tempo de reação, antes fixado em 4 dias (Wilson & Miles, 1966), favorecendo extremamente o estudo das propriedades desta enzima.

Dentre as bactérias estudadas, a *Escherichia coli* foi a que apresentou maior atividade triaminásica (tabela III, figura 3), vindo em seguida as bactérias pertencentes aos gêneros *Proteus*, *Klebsiella* e *Staphylococcus*, em ordem decrescente.

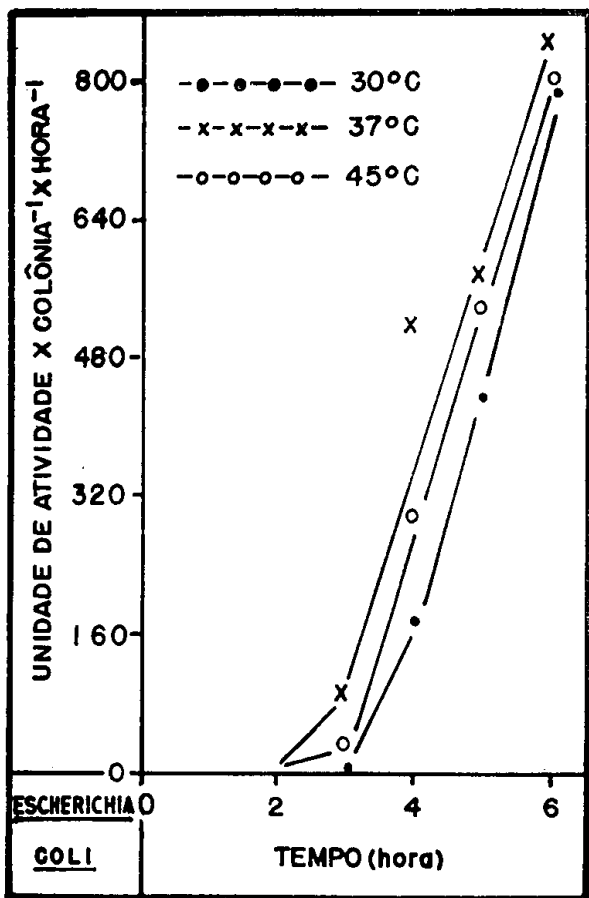


Figura 2 — Variação da atividade triaminásica de *Escherichia coli* (Migula), em função da temperatura e tempo de reação.

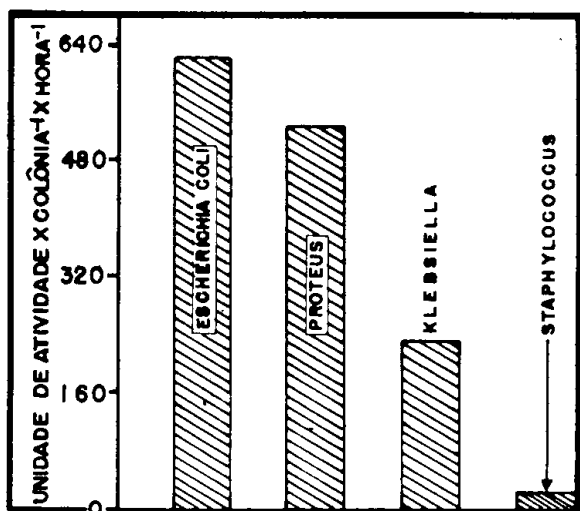


Figura 3 — Atividade triaminásica das bactérias estudadas. Período de incubação = 5 horas e pH = 7,0.

CONCLUSÕES

1 — As bactérias *Escherichia coli* e as dos gêneros *Staphylococcus*, *Klebsiella* e *Proteus*, reduzem o TMAO a TMA.

2 — A preparação de amostras, permitiu a formação da TMA a partir de 4 horas da

reação, envolvendo TMAO e suspensão de bactérias.

3 — A triaminase mostrou uma atividade máxima em pH 7,0 e na temperatura de 37°C.

4 — Em termos de atividade triaminásica, *Escherichia coli* foi a bactéria que se apresentou mais eficiente, vindo por ordem decrescente as dos gêneros *Proteus*, *Klebsiella* e finalmente *Staphylococcus*, esta última com quase nula atividade.

SUMMARY

The present paper deals with some modifications in the reaction involving trimethylamine oxide (TMAO) and bacteria, in order to diminish the duration of the reaction and to study some of its properties. It also tests the efficacy of some bacteria in the reduction of TMAO to trimethylamine (TMA).

The triaminase activity showed its highest level at pH 7,0 and varied in a direct proportion to the time of reaction. The optimum temperature reaction was 37°C.

Among the studied bacteria, *Escherichia coli* showed the highest activity, but this activity was at a standstill in *Staphylococcus* suspension.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

Amano, K & Yamada, K. — 1964 — Formaldehyde formation from trimethylamine oxide by the action of pyloric caeca of cod. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, Tokyo, 30 (8) : 639 — 645, 3 figs.

Breed, S. R. et al. — 1957 — *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. The Williams & Wilkins Company ; XVIII + 1094 pp., Baltimore.

Castell, C. H., Smith, B. & Dyer, W. J. — 1974 — Simultaneous Measurements of Trimethylamine and Dimethylamine in Fish, and Their Use for Estimating Quality of Frozen — Stored Gadoid Fillets. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, Ottawa, 31 (4) : 383 — 389, 5 figs.

Delaunay, H. — 1967 — Excretion. In: *The biology of marine animals*. Sir Isaac Pitman & Sons, Ltd, 2nd., pp. 276 — 301, 3 figs., London.

Uchiyama, H. et al. — 1972 — Analytical Methods for Estimating Freshness of Fish. In: *Utilization of Marine Products*. Overseas Technical Cooperation Agency, pp. 204 — 240, 12 + 2 figs., Tokyo.

Laycock, R. A. & Regier, L. W. — 1971 — Trimethylamine — Producing Bacteria on Haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) Fillets during Refrigerated Storage. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, Ottawa, 28 (3) : 305 — 309, 5 figs.

Liston, J. et al. — 1968 — Bases químicas e bacteriológicas de las alteraciones del pescado. In: *Tecnología de la Industria Pesquera*. Editorial Acríbia, pp. 403 — 416, Zaragoza.

Wilson, G. S. & Miles, A. A. — 1966 — *Principles of Bacteriology and Immunity*. Edward Arnold Ltd, 5th ed., XII + 1192 + LIII pp., illus., London.