

BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS ISOLADAS DE QUEIJO ARTESANAL: POTENCIAL TECNOLÓGICO E ATIVIDADE ANTAGONISTA CONTRA *Staphylococcus aureus*

JULIANA DE LIMA MARQUES¹; JESSICA FERNANDA HOFFMANN²; FÁBIO CLASEN CHAVES³; WLADIMIR PADILHA DA SILVA⁴; ÂNGELA MARIA FIORENTINI⁵

¹Universidade Federal de Pelotas– ju_marques@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas– jessicafh91@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas– fabio.chaves@ufpel.edu.br

⁴Universidade Federal de Pelotas– wladimir.padilha2011@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas– angefiore@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a busca por produtos artesanais e com menor adição de conservantes químicos tem aumentado e nesse contexto, surgem os produtos fermentados por bactérias ácido lácticas (BAL), amplamente utilizados pelas indústrias de alimentos na maturação, processamento e conservação de alimentos (LEROY; DE VUYST, 2004; ROSS et al., 2002). Estes micro-organismos fazem parte da microbiota natural de muitos alimentos, e são conhecidos por produzirem moléculas antimicrobianas, como ácidos orgânicos, dióxido de carbono, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas (CARR et al., 2002).

Entre os metabólitos produzidos, as bacteriocinas destacam-se, pois são capazes de dificultar o crescimento e multiplicação de diversos micro-organismos patogênicos e deteriorantes (TAMANINI et al., 2012; MARQUES, 2014).

Estudos demonstram que as BAL empregadas em alimentos são mais vantajosas quando isoladas da microbiota natural desses alimentos, pois apresentam potencial metabólico melhor adaptado às características do produto (CAMARGO, 2011).

Além da atividade antimicrobiana, é importante caracterizar as BAL quanto ao potencial tecnológico, ou seja, avaliados quanto a capacidade de suportar diferentes temperaturas, concentrações de NaCl, e valores de pH, para que sejam aplicadas industrialmente (GUCHTE et al., 2002). Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi isolar BAL de queijos artesanais e caracterizá-las quanto ao potencial tecnológico e a atividade antagonista contra *Staphylococcus aureus*.

2. METODOLOGIA

Foram coletadas duas amostras de queijos artesanais provenientes de Eldorado do Sul e Santana do Livramento. Para o isolamento das bactérias foram homogeneizadas 25 g de cada amostra em 225 mL de água peptonada 0,1% e feitas diluições decimais seriadas, onde 0,1 mL do inóculo foi semeado na superfície do ágar de Man, Rogosa e Sharpe (MRS). As placas foram incubadas em jarra de anaerobiose a 36°C por 72h. Após este período, foram selecionadas dez colônias características de BAL de cada amostra, transferidas para tubos contendo ágar MRS inclinado e incubados a 36°C, perfazendo um total de 20 isolados.

Para caracterização dos isolados, os mesmos foram submetidos a testes de coloração de Gram e de produção de catalase. Com a finalidade de avaliar o potencial tecnológico, os isolados caracterizados como BAL foram submetidos ao

crescimento em duas temperaturas (10 e 45°C), dois valores de pH (4,0 e 9,0) e duas concentrações de NaCl (4,5 e 6,0%). Esses testes foram realizados utilizando caldo MRS ajustado para cada condição, e os tubos foram incubados a 36°C por 7 dias, conforme proposto por DROSINOS et al. (2005).

Para verificar a habilidade de fermentar glicose e produzir CO₂, os isolados foram semeados em tubos de ensaio contendo tubos de Durham e caldo MRS acrescido de 3% de glicose e incubados a 37°C por 48h (LIMA et al., 2009).

Com os isolados que apresentaram crescimento em todas as condições tecnológicas, foi realizado o teste para detecção da atividade antagonista contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (FLEMING et al., 1975). Os isolados foram recuperados em caldo MRS e incubados a 36°C por 24 horas. Após, alíquotas de 2 µL do cultivo em caldo MRS foram inoculadas na superfície de placas contendo ágar MRS e incubadas em jarra de anaerobiose a 36°C por 24 horas. Também foi realizado o teste com o sobrenadante dos cultivos dos isolados, os quais foram centrifugados (6.800 x g) por 20 minutos a 4°C. Foi coletado o sobrenadante de cada isolado e neutralizado o pH antes de serem adicionados às placas de MRS (TODOROV, 2008).

A concentração dos inóculos de *S. aureus* foram ajustadas utilizando os padrões de McFarland, na escala 3 [correspondendo a 9x10⁸ unidades formadoras de colônias (UFC) mL⁻¹] e realizadas diluições, até a concentração aproximada de 10⁵ UFC mL⁻¹, inoculados em ágar BHI (*Brain Heart Infusion*) semi-sólido adicionado nas placas como uma sobrecamada. As placas foram incubadas a 36°C por 24h.

A atividade antagonista foi avaliada pela formação de halos inibitórios ao redor da colônia de cada isolado. O diâmetro dos halos foi medido com o auxílio de paquímetro (King tools®), sendo a medida de inibição, a diferença entre os diâmetros do halo de inibição frente ao patógeno menos o diâmetro do crescimento do isolado.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos dez isolados das amostras de Eldorado do Sul submetidos à caracterização morfológica (coloração de Gram) e teste de produção de catalase, 80% apresentaram-se como gram-positivos e 100% apresentaram-se como catalase negativa, enquanto que dos dez isolados das amostras de Santana do Livramento, 90% apresentaram-se como gram-positivos e 100% apresentaram-se como catalase negativa. Todos os isolados das amostras de Eldorado do Sul apresentaram morfologia de cocos, enquanto que 20% os isolados das amostras de Santana do Livramento apresentaram morfologia de bacilos e 80% de cocos. Os isolados classificados como gram-positivos e catalase negativa foram submetidos aos testes de aplicação tecnológica.

Em relação à identificação do potencial tecnológico, dos 17 isolados submetidos aos testes de crescimento em diferentes temperaturas (10°C e 45°C), concentrações de NaCl (4,5% e 6%), valores de pH (4,0 e 9,0), todos se desenvolveram em pelo menos uma das condições propostas.

De oito isolados das amostras de Eldorado do Sul, 37,5% (3/8) apresentaram crescimento a 10°C. Nas outras condições testadas (45°C, NaCl 4,5 e 6% e pH 4 e 9) houve crescimento de 100% dos isolados. Em relação ao metabolismo fermentativo, todos os isolados foram homofermentativos, ou seja, produzem apenas ácido lático como produto final.

Quanto aos isolados das amostras de Santana do Livramento, 56% apresentaram crescimento a 10 e 45°C. Quando submetidos às concentrações de NaCl (4,5 e 6%) houve crescimento de 89 e 78%, respectivamente, já em pH 4 e 9, 100% dos isolados foram resistentes. Em relação ao metabolismo fermentativo, apenas um isolado apresentou-se como heterofermentativo, ou seja, produz alcoóis e ácidos como produtos finais da fermentação. Em queijos artesanais geralmente são utilizadas bactérias homofermentativas, visto que o principal metabólito da fermentação é o ácido láctico (CARR et al., 2002).

Dos isolados procedentes de queijos artesanais de Eldorado do Sul e Santana do Livramento, 37,5% (3) e 22,2% (2), respectivamente, apresentaram crescimento em todas as condições submetidas e esses foram selecionados para realizar a atividade antagonista. O crescimento em diferentes condições possibilita a aplicação dos isolados em diferentes produtos, processos e condições de armazenagem (FRANCIOSI et al., 2009; THAPA et al., 2006).

Os inóculos contendo células viáveis dos isolados testados apresentaram antagonismo frente a *S. aureus* ATCC 25923, com halos de inibição entre 10 a 13 mm de diâmetro. Os sobrenadantes (livre de células) de cada isolado promoveram halos de inibição que variaram de 7 a 14 mm indicando que o mecanismo de ação antagonista está relacionado a moléculas secretadas no meio de cultura.

Oitenta por cento (4/5) dos isolados avaliados apresentaram antagonismo frente a *S. aureus* ATCC 25923. Alexandre et al. (2002) ao isolar BAL de queijo-de-minas artesanal encontrou 15% (30/192) de isolados com atividade antagonista contra *S. aureus*. Muitos trabalhos têm verificado atividade antimicrobiana de BAL frente a patógenos, principalmente contra bactérias Gram-positivas, já que as bactérias Gram-negativas apresentam membrana externa, dificultando a permeabilidade dos compostos antimicrobianos (MEIRA et al., 2010).

4. CONCLUSÕES

Foi possível isolar BAL a partir de queijos artesanais com potencial tecnológico e atividade antagonista frente *S. aureus*. Para aplicação em queijos são necessárias análises posteriores, como a identificação molecular para confirmação de gênero e espécie, teste da atividade antagonista frente a outros micro-organismos patogênicos e a caracterização das moléculas responsáveis por esta atividade.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDRE, D.P.; SILVA, M.R; SOUZA, M.R; SANTOS, W.L.M. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo-de-minas artesanal do Serro (MG) frente a microrganismos indicadores. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** vol.54 no.4 Belo Horizonte July/Aug. 2002

CAMARGO, R. J. **Ação de bacteriocinas de bactérias lácticas no controle de *Listeria monocytogenes* e no aumento da vida de prateleira de mortadela fatiada.** 2011. 72 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Universidade de São Paulo.

CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: a literature survey. **CRC Critical Reviews in Microbiology**, v.28, n.4, p.281-370, 2002.

DROSINOS, E.H.; MATARAGAS, M.; XIRAPHI, N.; GAITIS, G.; MOSCHONAS, F.; METAXOPOULOS, J. Characterization of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage. **Meat Science**, v. 69, p.307-317, 2005.

FLEMING, H. P.; ETCHELLS, J. L.; COSTILOW, R. N. Microbial inhibition by an isolate of *Pediococcus* from cucumber brines. **Applied Microbiology**, v.30, n.6, p.1040-1042, 1975.

FRANCIOSI, E.; SETTANNI, L.; CAVAZZA, A.; POZNANSKI, E. 2009. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. **International Dairy Journal**, v.19, p.3–11, 2009.

GUCHTE, M.; SERROR, P.; CHERVAUX, C. *et al.* Stress responses in lactic acid bacteria. **Ant. Leeuw. J.**, v.82, p.187-216, 2002.

LEROY, F.; VUYST, L. de. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science and Technology**, v.15, p. 67-78, 2004.

LIMA, C.D.L.C.; LIMA, L.A.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; FERREIRA, E.G.; ROSA, C.A.. Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 61, n. 1, p. 266-272, 2009.

MARQUES, J. L. **Caracterização fenotípica e molecular de bactérias ácido lácticas isoladas de presunto cozido e verificação do potencial tecnológico e bacteriocinogênico contra *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*.** 2014. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

MEIRA, S. M. M.; HELFER, V. E.; MEDINA, L. F. C.; BRANDELLI, A. Atividade antagonística de *Lactobacillus* frente a bactérias de importância em alimentos. In: 3º Simpósio de Segurança Alimentar, 2010, Florianópolis. Anais do 3º Simpósio de Segurança Alimentar. Florianópolis: SBCTA, 2010.

ROSS, P.R. , Morgan, S., Hill, C.. Preservation and fermentation: past, present and future. **International Journal of Food Microbiology**, v. 79, p.3-16, 2002.

TAMANINI, R.; BELOTI, V.; SILVA, L. C. C.; ANGELA, H. L. da.; YAMADA, A. K.; BATTAGLINI, A. P. P.; FAGNANI, R.; MONTEIRO, A. A. Antagonistic activity against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* from lactic acid bacteria isolated from raw Milk. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 5, p. 1877-1886, 2012.

THAPA, N.; PAL, J.; TAMANGA, J. Phenotypic identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally processed fish products of the Eastern Himalayas, **International Journal of Food Microbiology**, v. 107, p. 33-38, 2006.

TODOROV, S. D. Bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* AMA-K isolated from Amasi, a Zimbabwean fermented milk product and study of the adsorption of bacteriocin AMA-K to *Listeria* sp. **Brazilian Journal Microbiology**, v.39, n.1, p.178-187, 2008.