

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS POR BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS ISOLADAS DE CARNE OVINA

ROGER JUNGES DA COSTA¹; ANDRESA PEREIRA DA SILVA²; EDUARDA HALLAL DUVAL³, ÂNGELA MARIA FIORENTINI³

¹Universidade Federal de Pelotas – roger_costa17@yahoo.com.br

²Instituto Federal Sul-rio-grandense – andrezapdasilva@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – eduwardahd@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – angefiore@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Uma alternativa que vem sendo empregada na bioconservação de alimentos, com o objetivo de controlar o desenvolvimento de micro-organismos patogênicos e deteriorantes, é a utilização de metabólitos de origem bacteriana, as bacteriocinas (RODRIGUES, 2010).

O termo “bacteriocinas” refere-se a peptídeos antimicrobianos, sintetizados nos ribossomos, que atuam contra bactérias Gram-positiva e Gram-negativa, sendo a bactéria produtora, portadora de mecanismos de imunidade específicos que a protegem de sua própria bacteriocina (AND e HOOVER, 2003; COTTER et al., 2013).

As bactérias ácido-láticas (BAL) são micro-organismos Gram-positivos, apresentam morfologia de cocos, bacilos ou coco-bacilos, não formadores de esporos, anaeróbios, anaeróbios facultativos ou microaerófilos, catalase negativo, ácido tolerantes, com metabolismo estritamente fermentativo, apresentando o ácido lático como principal produto da fermentação de carboidratos (FUGELSANG & EDWARDS, 2007; MAKAROVA & KOONIN, 2007). Pelo fato de não afetarem a saúde humana e apresentarem potencial para melhorar a qualidade de alguns alimentos, as bacteriocinas de BAL são consideradas GRAS (*Generally Regarded as Safe*) (EIJSINK et al., 2002).

A partir do exposto, o objetivo deste trabalho foi isolar BAL de carne ovina e verificar a produção de substâncias antimicrobianas.

2. METODOLOGIA

2.1 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS (BAL)

Foram realizadas duas coletas em 12 carcaças ovinas, diretamente nos frigoríficos (Bagé/RS e Pelotas/RS), com o uso de swabs em 4 pontos da superfície das carcaças. As amostras foram transportadas em solução salina 1% em condições isotérmicas até os laboratórios, foram homogeneizadas e submetidas a diluições decimais com água peptonada 0,1% (v/v). Alíquotas de 0,1mL, das diluições apropriadas, foram inoculadas em superfície, em duplicita, em placas contendo ágar De Man, Rogosa e Sharpe (MRS) e incubadas a 37 °C por 72 horas, sob anaerobiose.

Além das carcaças ovinas, também foram isoladas BAL de cortes cárneos ovinos, refrigerados embalados à vácuo. Neste caso, uma amostra de 25 g foi homogeneizada em 225 mL de água peptonada 0,1%. Após, foram realizadas diluições decimais seriadas e o procedimento seguiu conforme descrito no parágrafo acima.

Após as 72 horas de cultivo, todos os isolados selecionados foram purificados, por esgotamento em estrias, em placas contendo ágar MRS, e incubados a 37 °C por 72 horas sob anaerobiose. Posteriormente, cada isolado

foi transferido para tubos de ensaio contendo ágar MRS inclinado e incubados a 37 °C por 24 horas, e após a multiplicação os mesmos foram mantidos sob refrigeração.

2.1.1 CARACTERIZAÇÃO

Os isolados que se desenvolveram, foram submetidos aos testes de coloração de Gram, morfologia e catalase, sendo selecionados aqueles que apresentavam as características de Gram-positiva e catalase negativa, independente da morfologia.

2.1.2 IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS DE BAL PRODUTORES DE SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS

Os isolados de BAL foram avaliados quanto a sua atividade antagonista, utilizando-se o cultivo puro, através do teste *spot-on-the-lawn*, de acordo com FLEMING et al. (1975), com adaptações. Como controle positivo, foi utilizada a cepa *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DY13 e, como micro-organismo indicador, a cepa de *Listeria monocytogenes* Scott A.

A presença de halos de inibição foi considerada como indicadora de atividade antagonista, em relação ao micro-organismo indicador.

2.1.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS SOBRENADANTES LIVRES DE CÉLULAS (SLC)

A atividade antimicrobiana dos SLC provenientes dos isolados de BAL foi avaliada através do método de difusão em ágar descrito por BISCOLA et al. (2013), com modificações. Primeiramente, foi obtido o SLC dos isolados de BAL a partir dos cultivos em caldo MRS a 37 °C, por 24 horas. Após, os cultivos foram centrifugados a 7.000 rpm, a temperatura ambiente, por 30 minutos. Posteriormente, o sobrenadante de cada amostra foi neutralizado (pH 7,0), utilizando-se solução de NaOH 1 N, e em seguida foi aquecido a 80 °C por 10 minutos (TODOROV e DICKS, 2004).

Alíquotas de 10 µL de cada SLC foram adicionadas na superfície de placas de Petri contendo ágar BHI com, aproximadamente, 10^5 UFC.mL⁻¹ do micro-organismo indicador (*Listeria monocytogenes* Scott A), e incubadas a 37 °C por 24 horas. A presença de halo de inibição no meio indicou capacidade bacteriocinogênica do isolado (BISCOLA et al., 2013, com modificações).

2.1.4 SENSIBILIDADE DO SOBRENADANTE LIVRE DE CÉLULAS ÀS ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

O SLC foi submetido ao teste de sensibilidade enzimática para determinação da natureza proteica da substância antimicrobiana, conforme VAN REENEN et al. (1998). Neste teste, 1 mL de cada SLC foi misturado com as enzimas proteinase k, tripsina, pepsina, α-quimiotripsina na concentração de 1 mg.mL⁻¹. Após, incubou-se a 37 °C por 30min e, posteriormente, levou-se ao aquecimento por 5min a 95 °C, para inativação enzimática.

Então, alíquotas de 10 µL de cada SLC foram adicionadas na superfície de placas de Petri contendo ágar BHI com, aproximadamente, 10^5 UFC.mL⁻¹ do micro-organismo indicador e foram incubadas a 37°C por 24 horas. A ausência de halo de inibição foi considerado indicativo que a substância inibidora do teste anterior é de origem protéica (tipo bacteriocina).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS

Após avaliação das colônias desenvolvidas no ágar, foram obtidos 186 isolados. Destes, 88 isolados apresentaram características compatíveis com BAL (Gram-positiva e catalase negativa). Dos 88 isolados, 86 possuíam formato de cocos e 2 caracterizados como cocos-bacilos.

No estudo de CASTRO et al. (2011) ao analisarem 14 tipos diferentes de embutidos fermentados, isolaram 141 cepas com características referentes às BAL com formato de bastonete. Em outra pesquisa que objetivou isolar BAL de carne crua fresca, foram obtidos 44 isolados de BAL (POTAKOS et al., 2014).

3.2 ISOLADOS DE BAL PRODUTORES DE SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS

Dos 84 isolados de BAL utilizados neste estudo, 36 (43%) foram capazes de inibir a multiplicação de *Listeria monocytogenes* Scott A, quando avaliados pelo teste *spot-on-the-lawn* e os halos de inibição variaram entre 1,2 a 6,2 mm.

Esse resultado foi superior ao encontrado por CASTRO et al. (2011), onde verificaram 21 isolados, dentre 141 testados, com atividade antagonista frente à *Listeria innocua* ATCC 33090.

3.3 ATIVIDADE BACTERIOCINOGENICA DOS ISOLADOS DE BAL

Através da técnica de difusão em ágar, 8 isolados (22,2%) apresentaram atividade bacteriocinogênica contra *Listeria monocytogenes* Scott A, formando halos de inibição que variaram de 8,7 a 11,7 mm. Esta atividade pode ser devido à produção de peptídeos antimicrobianos ou compostos semelhantes a bacteriocinas, visto que a atividade foi mantida mesmo após a neutralização e tratamento térmico do SLC.

Esse resultado foi superior ao encontrado por CASTRO et al. (2011), onde somente 3 isolados mantiveram a atividade no SLC contra *Listeria innocua* ATCC 33090, de um total de 21 testados. BISCOLA et al. (2013), isolaram e caracterizaram uma substância tipo bacteriocina a partir de amostras de charque. Dentre 100 isolados com atividade antimicrobiana, somente 5 isolados apresentaram ação bacteriocinogênica no SLC.

3.4 SENSIBILIDADE DO SOBRENADANTE LIVRE DE CÉLULAS AS ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

Dentre os 8 isolados que apresentaram atividade bacteriocinogênica contra *Listeria monocytogenes* Scott A, 7 confirmaram que a substância antagonista tinha natureza protéica, demonstrando sensibilidade a, pelo menos, três das enzimas proteolíticas testadas (pepsina, α-quimotripsina e proteinase k).

No estudo de CASTRO et al. (2011), dentre 3 isolados testados, somente 1 apresentou sensibilidade às enzimas tripsina e proteinase k, considerando-se que esse isolado era produtor de uma substância tipo bacteriocina. Já para BISCOLA et al. (2013), dos 5 isolados que possuíam atividade antimicrobiana no SLC, 2 isolados apresentaram sensibilidade a enzimas proteolíticas, revelando a natureza proteica da substância inibidora, apoiando a hipótese da produção de substância tipo-bacteriocina.

4. CONCLUSÕES

Neste trabalho obteve-se resultados positivos, pois foi possível obter uma substância antimicrobiana tipo bacteriocina a partir de bactérias ácido-láticas

isoladas de carne ovina. Por isso, esses resultados apontam para um futuro promissor na obtenção de substâncias antimicrobianas e sua possível utilização na bioconservação de alimentos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AND, H.C.; HOOVER, D.G. Bacteriocins and their food applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Malden, v.2, n.3, p.82-100, 2003.

BISCOLA, V.; TODOROV, S.D.; CAPUANO, V.S.C.; ABRIQUEL, H.; GÁLVEZ, A.; FRANCO, B.D.G.M. Isolation and characterization of a nisin-like bacteriocin produced by a *Lactococcus lactis* strain isolated from charqui, a Brazilian fermented, salted and dried meat product. **Meat Science**, v.93, n.3, p.607–613, 2013.

CASTRO, M.P.; PALAVECINO, N.Z.; HERMAN, C.; GARRO, O.A.; CAMPOS, C.A. Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages: Characterization of antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin production. **Meat Science**, v.87, p.321–329, 2011.

COTTER, P.D.; ROSS, R.P.; HILL, C. Bacteriocins: a viable alternative to antibiotics? **Nature Reviews Microbiology**, London, n.11, p.95-105, 2013.

EIJINK, V.G.H.; AXELSSON, L.; DIEP, D.B.; HAVARSTEIN, L.S.; HOLO, H.; NES, I.F. Production of class II bacteriocins of lactic acid bacteria; na example of biological warfare and communication. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.81, 2002.

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.

FUGELSGANG, K.C.; EDWARDS, C.G. **Wine microbiology: practical applications and procedures**. Springer, 2.ed., 2007.

MAKAROVA, K.S.; KOONIN, E.V. Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. **Journal Bacteriology**, v.189, p.1199–1208, 2007.

POTHAKOS, V.; SNAUWAERT, C.; VOS, P.; HUYS, G. Psychrotrophic members of *Leuconostoc gasicomitatum*, *Leuconostoc gelidum* and *Lactococcus piscium* dominate at the end of shelf-life in packaged and chilled-stored food products in Belgium. **Food Microbiology**, n.39, p.61-67, 2014.

RODRIGUES, T.T. **Revisão bibliográfica da utilização de bacteriocinas como conservantes alimentícios na última década**. 2010. Monografia (Bacharelado em Farmácia) - Universidade Comunitária da Região de Chapecó.

TODOROV, S.D.; DICKS, L.M.T. Characterization of mesentericin ST99, a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* ST99 isolated from boza. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.31, n.7, p.323–329. 2004.

VAN REENEN, C.A.; DICKS, L.M.T.; CHIKINDAS, M.L. Isolation, purification and partial characterization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Applied Microbiology**, v.84, p.1131–1137, 1998.