

ESTUDO PRELIMINAR DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO

GABRIELA DE QUADROS DA LUZ¹; GUILHERME DA SILVA MENEGAZZI²;
MICHELE DUTRA ROSOLEN³; ÂNGELA MARIA FIORENTINI⁴; PATRÍCIA SILVA DIAZ⁵

¹Universidade Federal de Pelotas – ql.gabi@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – guilherme_menegazzi@hotmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas – michele.dutra@gmail.com

⁴ Universidade Federal de Pelotas - angefiore@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas - bilicadiaz@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

Bactérias ácido lácticas (BAL) compreendem um grupo de microrganismos Gram-positivos, geralmente não formadores de esporos, não-móveis, na forma de cocos ou bacilos e anaeróbios facultativos. Os gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus* são importantes membros deste grupo (SHOKRYAZDAN, 2017). Alguns destes, já utilizados em processos industriais por serem reconhecidos como seguros e estáveis nos processos fermentativos. No entanto, a descoberta de novos isolados de diferentes matrizes alimentares é de grande interesse para a indústria de alimentos e para a comunidade científica, tendo em vista que podem conferir diferentes atributos tecnológicos e sensoriais quando aplicado em alimentos (GUPTA; BAJA, 2017). O *Lactobacillus acidophilus* vem sendo descrito na literatura por apresentar características tanto fermentativas quanto probióticas (ORTAKCI; SERT, 2012). Além disso, estudos recentes têm procurado demonstrar o potencial antimicrobiano desse microrganismo (SARIKHANI et al., 2018). Outro microrganismo promissor deste grupo é o *Lactobacillus casei*, amplamente utilizados em suplementos alimentares, probióticos e principalmente em laticínios fermentados. O uso destes microrganismos visa a melhora e manutenção da microbiota intestinal (HUANG et al., 2018).

Sendo assim, algumas BAL possuem a capacidade de produzir moléculas biologicamente ativas, garantindo ao produto final um valor nutracêutico, ou até mesmo, quando ingeridos vivos produzirem um efeito metabólico positivo na saúde do consumidor, e assim serem classificados como probióticos. Para isso, deve-se levar em conta que é indispensável oferecer às BAL, durante os processos tecnológicos, condições ideais para a sua multiplicação. Assim como conhecer os fatores que influenciam no processo como temperatura ótima, concentração de inóculo, meio de cultivo, dentre outros fatores, são de grande importância para otimização do processo (LINARES et al., 2017).

Cabe destacar que a concentração de inóculo pode afetar no pH, acidez do meio, contagem de células viáveis dentre outras variáveis, e que diferentes microrganismos podem apresentar comportamentos distintos quando submetidos às mesmas condições de incubação (WARDANI et al., 2017). Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da concentração inicial de inóculo, em diferentes meios de cultivo, na contagem de células viáveis de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 (*L. acidophilus*) e *Lactobacillus casei* SLC3 (*L. casei*).

2. METODOLOGIA

2.1 Microrganismos

As amostras de *L. acidophilus* e *L. casei* foram obtidas da coleção em estoque do Laboratório de Microbiologia e do Laboratório de Tecnologia de Bioprocessos da Universidade Federal de Pelotas.

2.2 Condições de cultivo

O isolado de *L. acidophilus* previamente lyophilizado e as colônias de *L. casei* anteriormente cultivada em placas de petri foram pré-incubadas em meio de cultura seletivo caldo de Man Rogosa and Sharp (MRS) (Merck, USA) e Soro de queijo a 37°C por 24 h a 120 rpm. Após, foram estriados por esgotamento em placas contendo ágar MRS, a fim de se obter culturas puras.

2.3 Determinação de células viáveis

A contagem de células viáveis foi realizada através de diluição seriada em peptona bacteriológica 0,1%. A viabilidade celular foi verificada através da técnica de *drop plate* em ágar MRS, incubadas em jarras de anaerobiose a 37°C por 48 h.

2.4 Padronização do inóculo

Para o estudo de concentração do inóculo utilizou-se tanto o meio de cultivo MRS quanto o soro de queijo. Para isso, foi adicionado o *L. acidophilus* e *L. casei* nas proporções de 2, 6 e 10%. Posteriormente os cultivos foram incubados a 37°C por 24 h a 120 rpm. A concentração de inóculo foi estimada baseada no número de unidades formadoras de colônias em placas contendo ágar MRS a 37°C por 48 h de incubação em jarras de anaerobiose.

2.5 Análise estatística

Os resultados das análises de todos os experimentos foram calculados a partir da média de experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Graphpad Prism 7. Em todas as análises foi considerado um nível de significância de 95% ($p<0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

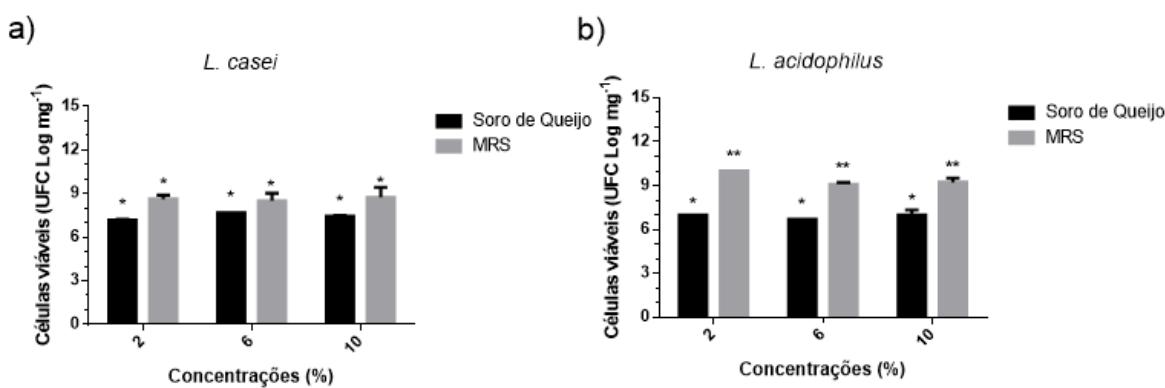


Figura 1. Viabilidade celular de *Lactobacillus casei* SLC3 (a) e *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 (b) em meios compostos por soro de queijo ou MRS nas concentrações 2, 6 e 10%. (*) Não apresenta diferença estatística ($p>0,05$) e (**) apresenta diferença estatística ($p<0,05$).

Conforme representado na figura 1, a utilização de um meio de cultivo comercial (MRS) e outro não convencional (soro de queijo) acarretou em diferenças no desenvolvimento celular tanto de *L. casei* (Fig. 1a) quanto *L.*

acidophilus (Fig. 1b). Na Figura 1a, podemos observar que não houve diferença estatística quando comparado o soro de queijo com o MRS, os quais obtiveram semelhantes concentrações de células viáveis. Em relação às diferentes concentrações de inóculo estudadas, o *L. casei* obteve crescimento celular similar tanto para soro de queijo quanto para MRS. Indicando dessa forma, que a concentração de inóculo, assim como o meio de cultivo, não interferem significativamente no número de células viáveis.

Na Figura 1b, o caldo MRS demonstrou influenciar na maior concentração de células viáveis quando comparado ao soro de queijo ($p<0,05$) nas três condições avaliadas. Entretanto, quando analisado cada meio de cultivo individualmente é possível observar que o número de células viáveis nas concentrações de 2, 6 e 10% são semelhantes. Mostrando dessa forma, que o aumento na concentração de inóculo não acarretou no aumento da concentração de células viáveis. Apesar disso, cabe salientar que o uso de baixas concentrações de inóculo é favorável para o cultivo celular, pois corroboram com fatores positivos como baixo custo e menor tempo.

WARDANI et al (2017) analisaram o crescimento de *Lactobacillus plantarum* Dad 13 em diferentes concentrações de inóculo, onde comprovaram um aumento significativo do crescimento celular nas condições de 1, 3, 5 e 10% ao final de 24h, no qual constatou a concentração ideal de inóculo em 5%.

4. CONCLUSÕES

Dante dos resultados alcançados nesse estudo, é possível observar a importância do meio de cultivo para o desenvolvimento bacteriano. No presente estudo, o MRS favoreceu significativamente somente o crescimento de *L. acidophilus* nas concentrações de 2, 6 e 10%. Enquanto o soro de queijo promoveu o desenvolvimento celular semelhante em ambos os microrganismos estudados nas três condições avaliadas. Sendo assim, é possível afirmar que apesar de o meio de cultivo comercial ter se mostrado mais eficiente para o desenvolvimento celular de *L. acidophilus*, o soro de queijo é um meio promissor para o cultivo de *Lactobacillus casei* SLC3 e *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 pois permite a utilização de baixas concentrações de inóculo, contribuindo dessa forma tanto para o baixo custo da pesquisa quanto para o aproveitamento do resíduo da indústria de laticínios.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- GUPTA, M., BAJAJ, B. K. Characterization of Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria Isolated from Kalarei and Development of Probiotic Fermented Oat Flour. *Probiotics & Antimicrobial Proteins*, 75, 1-8. 2017.
- HUANG, C.-H., LIOU, J.-S., LEE, A.-Y, TSENG, M., MIYASHITA, M., HUANG, L., WATANABE, K., Polyphasic characterization of a novel species in the *Lactobacillus casei* group from cow manure of Taiwan: Description of *L. chiayensis* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2018.01.008>. 2018.
- LINARES, D., M., GÓMEZ, C., RENES, E., FRESNO, J. M., TORNADIJO, M. E., ROSS, R. P., STATON, C. Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria with Potential to Design Natural Biofunctional Health-Promoting Dairy Foods. *Frontiers in Microbiology*, 8(846), 1-11. 2017.

ORTAKCI, F., & SERT, S. Stability of free and *encapsulated Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 in yogurt and in an artificial human gastric digestion system. **Journal of Dairy Science**, 95(12), 6918–6925. doi:10.3168/jds.2012-5710. 2012.

SARIKHANI, M., KERMANSHAHI, R. K., GHADAM, P., & GHARAVI, S. The role of probiotic *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 bacteriocin on effect of HBsu on planktonic cells and biofilm formation of *Bacillus subtilis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, 115, 762–766. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.03.087. 2018.

SHOKRYAZDAN, P., JAHROMI M. F., LIANG, J. B., HO, Y. W. Probiotics: From Isolation to Application. **Journal of the American College of Nutrition**, 36(8), 666-676. 2017.

WARDANI S. K., CAHYANTO, M. N., RAHAYU, E. S., UTAMI, T. The effect of inoculum size and incubation temperature on cell growth, acid production and curd formation during milk fermentation by *Lactobacillus plantarum* dad 13. **International Food Research Journal**, 24(3), 921-926. 2017.