

AVALIAÇÃO DAS CURVAS DE CRESCIMENTO MICROBIANO DE *LACTOCOCCUS LACTIS* SUBSP. *LACTIS* E *LISTERIA MONOCYTOGENES* EM MONO-CULTURA E CO-CULTURA

TAICIANE GONÇALVES DA SILVA¹; FELIPE MENDES DELPINO², GREICE DOTTO SIMÕES³;
SIMONE PIENIZ⁴

¹Univerisidade federal de Pelotas- ta.ici@hotmail.com

²Univerisidade federal de Pelotas - fmfdsocial@outlook.com

³Univerisidade federal de Pelotas – greicedotto@hotmail.com

⁴Univerisidade federal de Pelotas – nutrisimone@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

Bactérias ácido lácticas (BAL) são um grupo de micro-organismos Gram-positivos, não formadores de esporos, catalase negativos e tolerantes aos baixos pH. Possuem temperaturas de crescimento entre 30 e 42 °C para espécies mesófilas e termófilas, respectivamente, podendo apresentar-se na forma de cocos ou bacilos (MONROY et al., 2009; ABDEL-RAHMAN et al., 2013; SIAMANSOURI et al., 2013). Dentro deste grupo, está inserido o gênero *Lactococcus* sendo a principal espécie deste *L. lactis*, a qual é dívida em subespécies e, dentre estas, destacam-se como principais *L. lactis* subsp. *lactis* e *L. lactis* subsp. *cremoris* (PARAPOULI et al., 2013).

L. lactis subsp. *lactis* é utilizada pela indústria de alimentos na produção de queijos macios, pois atua modificando as características sensoriais como aroma, cor e sabor devido a sua acidificação, além de atuar como bioconservador por meio da produção de ácido láctico, acético e propiônico, antimicrobianos como as bacteriocinas, peróxidos de hidrogênio e diacetil, os quais podem reduzir a carga microbioana de patógenos (CASALTA e MONTEL, 2008; SUSKOVIC et al., 2010; KHEMARIYA et al., 2017).

Listeria monocytogenes é considerado um micro-organismo patogênico, caracterizado como um bacilo Gram-positivo, anaeróbio facultativo e não esporulado. Esse pode multiplicar-se entre as temperaturas de 1°C e 45°C, resistir ao pH entre 4,3 e 9,6 e concentração de sal (NaCl) de 10% (LOMONACO et al., 2015). A doença causada por este micro-organismo denomina-se listeriose, uma doença grave a qual pode ocasionar quadro de septicemia, gastrenterites, meningite e encefalite que podem levar ao óbito crianças, idosos e indivíduos imunocomprometidos (LOMONACO et al., 2015). Para que ocorra o controle de contaminação alguns estudos vêm evidenciando que a co-cultura deste patógeno com BAL, as quais podem interferir na sua multiplicação (CORR et al., 2009; JENABIAN et al., 2011).

Desta forma, o presente estudo tem por objetivo avaliar as curvas de crescimento microbiano entre *L. lactis* subsp. *lactis* e *L. monocytogenes* em mono-cultura e co-cultura.

2. METODOLOGIA

Neste estudo foram utilizados os micro-organismos *L. lactis* subsp. *lactis* (R7), isolado de queijo ricota convencional, e *L. monocytogenes* (L9), isolado de queijo minas artesanal, os quais são provenientes da coleção em estoque conservado do Laboratório de Nutrigenômica da Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Além destes, foi utilizada uma cepa padrão de *L. monocytogenes* ATCC 7644. As análises foram realizadas nos Laboratórios de Microbiologia de Alimentos e Nutrigenômica da UFPel.

Os parâmetros utilizados para descrever a multiplicação bacteriana são fase de latência (λ), taxa de crescimento máximo (μ_{max}), densidade populacional máxima (Nmax) e densidade populacional final (N24h). A taxa específica de crescimento máxima foi determinada como o declive da região linear entre o início da contagem microbiana versus o tempo de multiplicação: UFC/ml ($\Delta \ln \text{CFU ml}^{-1} / \Delta t$) no tempo (t) = 2–6 h para R7 e no t = 0-4 h para *L. monocytogenes*.

R7, *L. monocytogenes* ATCC 7644 e L9 foram inoculados duas vezes antes da utilização em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) a 37 °C por 24 horas. Nos tempos (t) 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 horas amostras foram coletadas para monitoramento do crescimento das colônias. A multiplicação foi determinada por contagem em placas em ágar *Man, Rogosa and Sharpe* (MRS) para R7 e ágar *Oxford* para *L. monocytogenes* ATCC 7644 e L9. Ambas *L. monocytogenes* foram incubadas aerobicamente em placas por 48 horas a 37 °C; já a R7 foi incubada anaerobicamente a 37 °C por 48 horas.

Cem (100) mL de caldo BHI (pH 6,5) foram pré-aquecidos (30°C) e inoculado 1 mL de cada cultura overnight. As culturas inoculadas formaram a co-cultura 1 (R7+L9) e co-cultura 2 (R7+*L. monocytogenes* ATCC 7644) as quais foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Nos tempos (t) = 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 horas amostras foram coletadas para monitoramento da multiplicação bacteriana. A multiplicação foi determinada por contagem em placas contendo ágar MRS (R7) e Oxford (*L. monocytogenes* ATCC 7644 e L9). Os dados foram analisados por meio de análise de variância bidirecional (Two-way ANOVA) e teste de Tukey a um nível de significância de 5% para comparação de médias, utilizando Past 2.17c.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Parâmetros que descrevem o crescimento são mostrados na Tabela 1, onde pode ser observada uma redução do Nmax da R7 em ambas as co-culturas em relação mono-cultura ($p=0,0002$ e $p= 0,0002$). Além disso, Nmax de + *L. monocytogenes* ATCC 7644 em co-cultura e L9 em co-cultura também apresentaram redução deste parâmetro em relação a suas mono-culturas ($p=0,0002$ e $p=0,0032$). Quando avaliado o N24h observou-se redução significativa nas co-culturas de + *L. monocytogenes* ATCC 7644 e L9 quando comparado com suas mono-culturas ($p=0,0121$ e $p=0,0338$). Estudo realizado por Jenabian (2011), o qual utilizou *Lactobacillus acidophilus* e *L. monocytogenes*, apresentou resultados semelhantes, porém, *L. acidophilus* não apresentou redução do Nmax como R7 no presente estudo.

Tabela 1. Fase de latência (λ), taxa de crescimento máximo (μ_{max}), densidade populacional máxima (Nmax) e densidade populacional final (N24h) de R7, L9 e + *L. monocytogenes* ATCC 7644.

Micro-organismos	Cultura	λ (h)	μ_{max} (h ⁻¹)	Nmax (Log UFC/mL ⁻¹)	N24h (Log UFC/mL ⁻¹)
R7	Mono-cultura	0,25±0,015	0,72±0,002	8,70±0,005	8,41±0,040
	Co-cultura 1	0,19±0,020	0,88±0,001	7,61±0,010*	7,56±0,010
	Co-cultura 2	0,27±0,010	0,81±0,006	7,66±0,030*	7,66±0,030
L9	Mono-cultura	0,22±0,085	0,78±0,015	7,53±0,010	7,48±0,020
	Co-cultura 1	0,15±0,045	0,88±0,000	6,90±0,140**	6,00±0,001****
ATCC 7644	Mono-cultura	0,12±0,015	0,85±0,010	7,45±0,000	7,28±0,010
	Co-cultura 2	0,06±0,025	0,88±0,075	6,95±0,075*	6,30±0,430***

Dados expressos em médias e desvio padrão com valor de $p=0,0002^$, $p=0,0032^{**}$, $p=0,0121^{***}$ e $p=0,0338^{****}$.

As curvas de crescimento estão apresentadas a Figura 1, onde pode ser observada redução de R7 tanto na co-cultura 1 quanto na co-cultura 2 em relação a sua mono-cultura, a partir do tempo de 4 horas ($p<0,004$ e $p<0,001$) até as 24 horas ($p=0,020$ e $p<0,040$). L9 em co-cultura apresentou redução da multiplicação em relação a sua mono-cultura, sendo observado o pico máximo em co-cultura de 6,9 Log UFC/mL⁻¹ em 4 horas ($p=0,0009$) e em mono-cultura o pico máximo foi de 7,50 Log UFC/mL⁻¹ em 8 horas ($p=0,0003$). *L. monocytogenes* ATCC 7644 apresentou maior acentuação no declive da curva em co-cultura, visto que no tempo de 24 horas a mono-cultura apresentava 7,49 Log UFC/mL⁻¹ enquanto que na co-cultura foi observado 6,3 Log UFC/mL⁻¹ ($p<0,001$). Estudo realizado por COSTA (2016) co-inoculou uma cepa de *L. lactis* com *L. monocytogenes* e, assim, como no presente estudo, também evidenciou redução na multiplicação de *L. monocytogenes*.

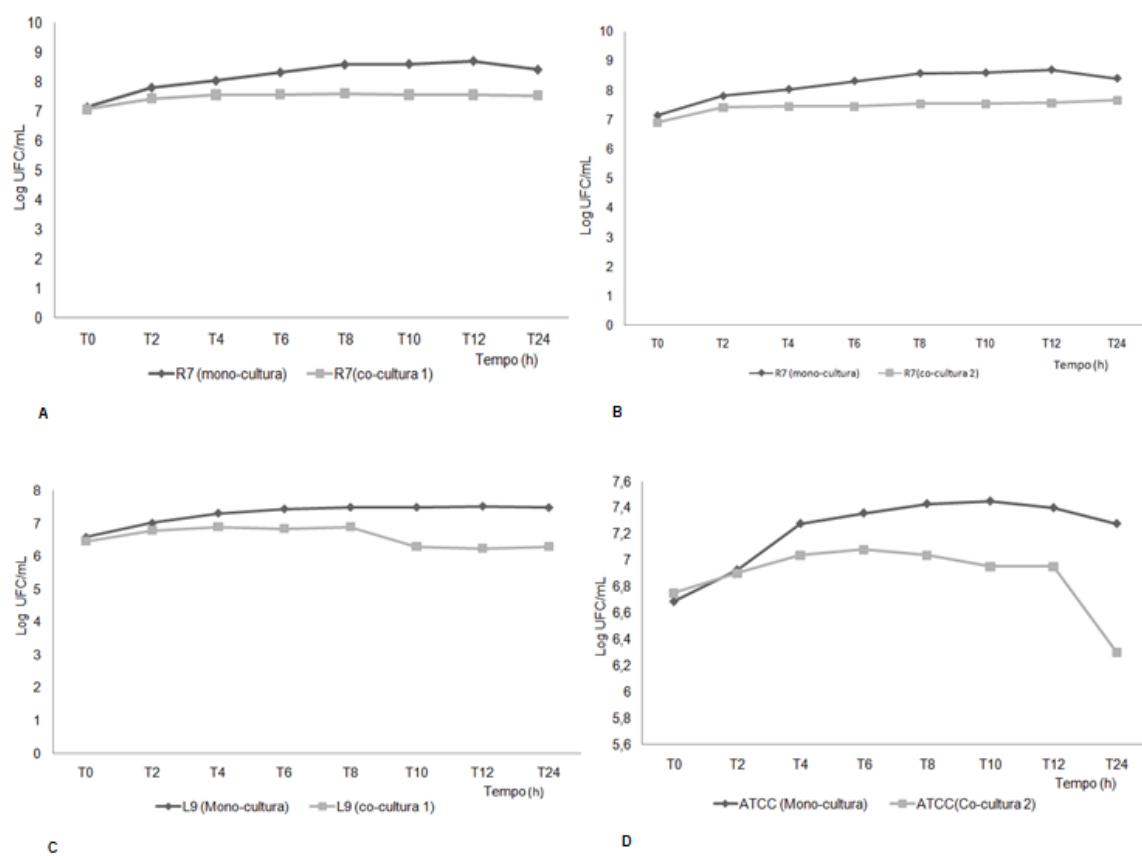


Figura 1. Curvas de crescimento de bacteriano. (A) R7 mono-cultura VS R7 co-cultura 1; (B) R7 mono-cultura VS R7 co-cultura 2; (C) L9 mono-cultura VS L9 co-cultura 1 e (D) ATCC mono-cultura VS ATCC co-cultura 2.

4. CONCLUSÕES

Conclui-se que apesar de haver redução da multiplicação de R7, ainda pode ser observada uma redução mais acentuada de L9 e *L. monocytogenes* ATCC 7644, resultado este que sugere algum mecanismo de ação da R7 frente aos patógenos estudados. Por meio deste resultado, mais estudos devem ser realizados para avaliar a ação da R7 frente a outros patógenos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-RAHMAN, M. A., TASHIRO, Y., Sonomoto, K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. **Biotechnol.** v.31, P877–902, 2013.
- CASALTA, E., MONTEL, M.C. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactococcus* genus. **International Journal of Food Microbiology.** v.126, p. 271–273, 2008.
- COSTA, A.C.C.C. Isolamento de bactérias láticas produtoras de bacteriocinas e avaliação de sua atividade frente a patógenos alimentares em sistema de bioconservação de produto lácteo. Goiânia. 2016. 68f. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás.
- CORR, S.C.; HILL, C.; GAHAN, C.G. Understanding the mechanisms by which probiotics inhibit gastrointestinal pathogens. **Advances in Food and Nutrition Research.** n.56, p.1–15, 2009.
- JENABIAN, S.M.; VOGENSEN, F.K.; JESPERSEN, L. The quorum sensing luxS gene is induced in *Lactobacillus acidophilus* NCFM in response to *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology.** v.149, p.269–273, 2011.
- KHEMARIYA, P., SINGH, S., NATH, G., GULATI, A.K. Probiotic *Lactococcus lactis*: A Review. *Turkish Journal of Agriculture . Food Science and Technology.* v. 5, n.6, p.556-562, 2017.
- LOMONACO S, NUCERA D, FILIPELLO V. The evolution and epidemiology of *Listeria monocytogenes* in Europe and the United States. **Infect Genet Evol.** ;v.35, p.172–83, 2015.
- MONROY, D.M.C., CASTRO, B.T., FERNÁNDEZ, P.F.J., MAYORGA, R.L. Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. **ContactoS** v. 73, p. 63-72, 2009.
- PARAPOULI M, DELBES-PAUS C, KAKOURI A, KOUKKOU AI, MONTEL MC, SAMELIS J. Characterization of a wild, novel nisin a-producing *Lactococcus* strain with an *L. lactis* subsp. *cremoris* genotype and an *L. lactis* subsp. *lactis* phenotype, isolated from Greek raw milk. **Appl Environ Microbiol.**v.79, p.3476–84, 2013.
- SIAMANSOURI M, MOZAFFARI S, ALIKHANI F. Bacteriocins and lactic acid bacteria. **J. Biol. Today's World.** v. 2, p. 227-234, 2013.
- SUSKOVIC J, KOS B, BEGANOVIC J, PAVUNC AL, HABJANIC K, MATOSIC S. Antimicrobial Activity- The most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. **Fd Technol Biotechnol.** v.48, n.3, p.296-307, 2010.