

AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE SEGURANÇA DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS ISOLADAS DE LEITE DE CABRA *IN NATURA*

PEDRO FERNANDES VIANA¹, KHADIJA BEZERRA MASSAUT², MARIA FERNANDA FERNANDES SIQUEIRA³, VITÓRIA LOPES ROCHA⁴, GRACIELA VOLZ LOPES⁵, ÂNGELA MARIA FIORENTINI⁶

¹*Universidade Federal de Pelotas – fernandes199921@gmail.com*

²*Universidade Federal de Pelotas – khadijamassaut@gmail.com*

³*Universidade Federal de Pelotas – maria.fernanda.fs97@gmail.com*

⁴*Universidade Federal de Pelotas – vitoriatro2@gmail.com*

⁵*Universidade Federal de Pelotas – graciela@lopes@yahoo.com.br*

⁶*Universidade Federal de Pelotas – angefiore@gmail.com*

1. INTRODUÇÃO

As bactérias ácido-láticas (BAL) fazem parte de um grupo de bactérias muito importante para a indústria de alimentos. São cocos ou bacilos Gram-positivos, catalase negativos, não produzem esporos, são anaeróbios facultativos e produzem ácido láctico como produto final da fermentação de carboidratos (LEVIT et al., 2020).

O isolamento e a caracterização de novas espécies de BAL ainda pouco investigados, se torna importante pois estas podem apresentar vantagens para obtenção de linhagens com características tecnológicas e funcionais diferenciadas, consequentemente, com potencial para futura aplicação em alimentos (ORTU et al., 2007). Além disso, ainda que a maioria das BAL sejam consideradas GRAS (Geralmente Reconhecido como Seguro), é necessário que seja avaliada a segurança microbiológica dos isolados antes de sua utilização (ANVISA, 2021).

Os testes de segurança baseiam-se na avaliação de fatores de virulência que indicam se o isolado possui um perfil patogênico, o que seria indesejável quando da aplicação em alimentos (VESTERLUND et al., 2007). EATON; GASSON (2001), relataram que, dentre os fatores que determinam a virulência de bactérias, podemos observar a resistência à determinados antimicrobianos e a presença de enzimas extracelulares como DNase, gelatinase, termonuclease e hemolisina.

Em muitas fontes é possível encontrar BAL autóctones, principalmente, matrizes alimentares *in natura* (PISANO et al., 2014). O leite de cabra *in natura*, pode ser uma importante fonte de BAL, pois possuem em composição macronutrientes como proteínas, carboidratos, gorduras e minerais (RAYNAL-LJUTOVAC et al., 2008), que favorecem a multiplicação de microrganismos.

Portanto, o objetivo do estudo foi selecionar espécies de BAL, procedentes de leite de cabra *in natura*, com ausência de fatores de virulência, a fim de possibilitar a utilização desses isolados na produção de alimentos.

2. METODOLOGIA

Para o isolamento de BAL provenientes de leite de cabra *in natura*, inicialmente, realizou-se uma seleção aleatória das colônias crescidas em ágar MRS (De Man, Rogosa e Sharpe) com subsequentes etapas de isolamento e purificação dos microrganismos. Após, foi feita coloração de Gram e teste da enzima catalase. Todos os isolados com características Gram-positiva e catalase negativa, foram submetidos aos testes de segurança microbiológica.

Os isolados selecionados foram, previamente, ativados em caldo MRS a 37 °C por 24 horas. Para o teste da enzima DNase, os isolados foram inoculados em ágar DNase e posterior incubação a 37 °C/24 horas. Como controle positivo foi utilizado *S. aureus* ATCC 25923 e controle negativo *L. sakei* subsp. *sakei* ATCC 15521. A leitura dos resultados foi realizada através da adição de solução de ácido clorídrico (HCl) 1 N nas placas, a formação de zonas transparentes em torno dos isolados foi interpretado como resultado positivo para produção de DNase (KATEETE et al., 2010).

O teste de gelatinase foi determinado em meio de gelatina, preparado com 1% de extrato de levedura, 1,5% de triptona e 12% de gelatina. Os isolados ativados anteriormente, foram transferidos para tubos contendo o meio de cultura, incubados a 30 °C por sete dias e após, foram mantidos por 30 minutos, em refrigeração. Como controle positivo utilizou-se *S. aureus* ATCC 25923 e negativo *E. coli* ATCC 8739. Para leitura dos resultados, foi observado o estado físico do meio, sendo considerados como resultados positivos, os tubos que após a refrigeração permaneceram no estado líquido, confirmando a presença da enzima gelatinase (PEREIRA et al., 2009).

Por fim, o teste de atividade hemolítica foi determinado de acordo com EATON; GASSON (2001). Os isolados foram previamente ativados em meio TSA (Ágar Trypticase Soja), suplementado com 7% de sangue equino desfibrinado e, as placas foram incubadas a 37 °C/24 horas. Como controle positivo foi utilizada *L. monocytogenes* ATCC 7644. A reação positiva para presença de hemolisinas foi identificada como β-hemólise, com a ocorrência de lise total dos eritrócitos, através do aparecimento de zonas transparentes, α-hemólise, quando há lise parcial dos eritrócitos formando zonas verdes ao redor das colônias dos isolados ou γ-hemólise, reação negativa indicando ausência de hemolisina.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram selecionados do leite de cabra *in natura*, 21 isolados e destes apenas quatro (1, 2, 14 e 21) foram caracterizados como Gram-positivos e catalase negativos, os quais foram submetidos aos testes enzimáticos de segurança microbiológica (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados dos testes de segurança microbiológica dos isolados de BAL procedentes de leite de cabra *in natura*

Isolado	DNase	Gelatinase	Hemolisina
1	-	-	-
2	-	-	-
14	-	-	-
21	-	-	-

(-) ausência da atividade da enzima

Ao avaliar a presença da enzima DNase, responsável por degradar ácidos nucleicos (DNA), todos os isolados apresentaram resultados negativos (Tabela 1 e Figura 1). A DNase é uma enzima que permite a infecção do hospedeiro por ser capaz de degradar o DNA. Geralmente, esse fator de virulência não é observado com muita frequência em amostras oriundas de alimentos, quando comparados com amostras clínicas (BARBOSA et al., 2010).

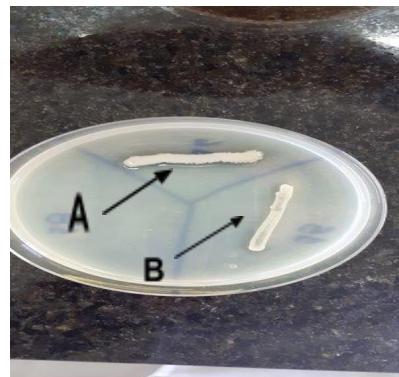


Figura 1. Resultado do teste de enzima, DNase, resultado positivo (A), resultado negativo (B)

Quanto ao teste de gelatinase, os quatro isolados também apresentaram ausência da enzima testada (Tabela 1 e Figura 2). A enzima gelatinase, hidrolisa gelatina, colágeno, caseína, hemoglobina e outros peptídeos bioativos. FRANCO (2016), avaliou oito isolados de BAL de alimentos, e estes não apresentaram atividade da enzima gelatinase, assim como MAHASNEH et al. (2015), que analisaram 17 isolados de *Lactobacillus* spp. com potencial probiótico provenientes de produtos fermentados e observaram que estes não apresentaram atividade da gelatinase, dados que corroboram com o presente estudo.



Figura 2. Resultado do teste de enzima gelatinase positivo para atividade da enzima gelatinase (A) e negativo para atividade da enzima gelatinase (B)

A análise da atividade hemolítica, permite identificar a presença ou ausência de enzimas capazes de causar a lise dos eritrócitos no sangue humano. No presente estudo (Tabela 1), os quatro isolados apresentaram resultado negativo para a atividade hemolítica, ou seja, as bactérias analisadas, não apresentaram nenhuma alteração de coloração ao redor das colônias, caracterizando a ausência de atividade de hemolisinas, o que representa uma característica importante, a falta de capacidade dos isolados de liser eritrócitos humanos e animais (BARBOSA et al., 2010), caracterizando-os como não hemolíticos.

4. CONCLUSÕES

Por meio dos resultados obtidos conclui-se que, quatro isolados com ausência de fatores de virulência demonstram segurança microbiológica quanto aos testes avaliados, sendo considerados possíveis candidatos para futura utilização como culturas iniciadoras em alimentos. Porém, demais testes precisam ser realizados para esses isolados, como testes de suscetibilidade aos antimicrobianos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia Para Instrução Processual De Petição De Avaliação De Probióticos Para Uso Em Alimentos. ALIMENTOS - GUIA** nº 21, versão 1, de 21 de fevereiro de 2019. Brasília, DF: Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019.
- BARBOSA, J.; GIBBS, P.A.; TEIXEIRA, P. Virulence factors among *enterococci* isolated from traditional fermented meat products produced in North of Portugal. **Food Control**, v.21, p.651-656, 2010.
- EATON, T. J. & GASSON, M. J. Molecular Screening of *Enterococcus* Virulence Determinants and Potential for Genetic Exchange between Food and Medical Isolates Molecular Screening of *Enterococcus* Virulence Determinants and Potential for Genetic Exchange between Food and Medical Isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.4, p.1628-1635, 2001.
- FRANCO, B. Use of Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria (LAB) Biofilms for the Control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, and *Escherichia coli* O157:H7 Biofilms Formation. **Frontiers in Microbiology**, v.7, p.863, 2016.
- KATEETE, D. P.; KIMANI, C.N.; KATABAZI, F.A.; OKENG, A.; OKEE, M.S.; NANTEZA, A., NAJJUKA, F., C. Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase , and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, p.9, 23, 2010.
- LEVIT, R.; SAVOY G. G.; MORENO L. A.; LEBLANC, J. G. Recent update on lactic acid bacteria producing riboflavin and folates: application for food fortification and treatment of intestinal inflammation. **Journal of Applied Microbiology**, v.130, n.5, p.1412-1424, 2021.
- MAHASNEH, A. M.; HAMDAN, S.; MAHASNEH, S. A. Probiotic Properties of *Lactobacillus* Species Isolated from Local Traditional Fermented Products. **Jordan Journal of Biological Sciences**, v.8, n.2, p.81-87, 2015.
- ORTU, S.; FELIS, G.E.; MARZOTTO, M.; DERIU, A.; MOLICOTTI, P.; SECHI, L.A.; DELLAGLIO, F.; ZANETTI, S. Identification and functional characterization of *Lactobacillus* strains isolated from milk and Gioddu, a traditional Sardinian fermented milk. **International Dairy Journal**, v.17, p.1312-1320, 2007.
- PEREIRA, V.; LOPES, C.; CASTRO, A.; SILVA, J.; GIBBS, P.; TEIXEIRA, P. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. **Food Microbiology**, v.26, n.3, p.278-282, 2009.
- PISANO, M. B.; VIALE, S.; CONTI S.; MELIS, M. P.; COSENTINO, S. Preliminary evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from Sardinian dairy products. **BioMed Research International**, 2014.
- RAYNAL-LJUTOVAC, K.; LAGRIFFOUL, G.; PACCARD, P.; GUILLET I.; CHILLIARD, Y. Composition of goat and sheep milk products: An update. **Small Ruminant Research**, v.97, p.57-72, 2008.
- REQUE, P.M.; BRANDELLI, A. Encapsulation of probiotics and nutraceuticals: Applications in functional food industry. **Trends in Food Science & Technology**, 2021.
- VESTERLUND, S.; VANKERCKHOVEN, V.; SAXELIN, M.; GOOSSENS, H.; SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.C. Safety assessment of *Lactobacillus* strains: presence of putative risk factors in faecal, blood and probiotic isolates. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 116, n. 3, p. 325-331, 2007.