

AVALIAÇÃO DE CURVAS DE CRESCIMENTO MICROBIANO DE *LACTOCOCCUS LACTIS* SUBSP. *LACTIS* E *SALMONELLA ENTERITIDIS* EM MONO-CULTURA E CO-CULTURA

TAICIANE GONÇALVES DA SILVA¹; ELLEN LUÍSE VAGHETTI HOERLLE²; THAYANE GARCIA BLUMBERG³; SIMONE PIENIZ⁴

¹Universidade federal de Pelotas – ta.ici@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas - ellen.hoerlle16@gmail.com

³Universidade federal de Pelotas – thayaneblumberg@hotmail.com

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

1. INTRODUÇÃO

As bactérias ácido lácticas (BAL) são um grupo de bactérias Gram-positivas com formas de cocos e bacilos em sua grande maioria apresentam multiplicação em condições anaeróbias, as quais realizam a fermentação da glicose produzindo ácido láctico (SIAMANSOURI et al., 2013; ABDEL-RAHMAN et al., 2013). Algumas bactérias deste grupo são utilizadas em matrizes alimentares devido sua capacidade de conferir aroma, cor e produzir ácidos orgânicos, como o ácido láctico, o qual auxilia no aumento da vida-de-prateleira ou vida útil dos alimentos, assim como, a segurança microbiana (MOKOENA, 2017). *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) é utilizada pela indústria de alimentos na produção de queijos macios, pois atua como bioconservador produzindo ácido láctico, acético e propiônico; antimicrobianos como as bacteriocinas, peróxidos de hidrogênio e diacetil os quais atuam reduzindo a carga microbiana de patógenos (KHEMARIYA et al., 2017; CASALTA e MONTEL, 2008; SUSKOVIC et al., 2010).

Salmonella Enteritidis é um microrganismo de grande importância, visto que está associado a infecções alimentares em seres humanos causando a doença chamada de salmonelose, a qual causa sinais e sintomas como diarreia, vômito e dor abdominal, podendo causar complicações e até mesmo óbito em crianças, idosos e indivíduos imunocomprometidos (RIBEIRO et al., 2022). Para que ocorra o controle da contaminação deste patógeno e de outros, alguns estudos vêm utilizando cepas bioconservadoras que podem interferir na sua multiplicação (COOR et al., 2009; JENABIAN et al., 2011; GASPARETTO, 2022).

Com isso, o presente estudo teve por objetivo avaliar curvas de crescimento microbiano de *L. lactis* subsp. *lactis* R7 e *S. Enteritidis* em mono-cultura e co-cultura.

2. METODOLOGIA

Os microrganismos utilizados são provenientes da coleção em estoque conservado do Laboratório de Nutrigenômica e Metabologia da Faculdade de Nutrição – Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), sendo estes *L. lactis* R7 (R7) isolado de queijo ricota convencional e *S. Enteritidis* ATCC 13076 (SE). As análises foram realizadas nos Laboratórios de Microbiologia de Alimentos e Nutrigenômica e Metabologia da UFPEL.

Os parâmetros utilizados para descrever a multiplicação bacteriana são fase de latência (λ), taxa de crescimento máximo (μ_{max}), densidade populacional máxima (N_{max}) e densidade populacional final (N_{24h}). 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. Unidade Formadora de Colônia (UFC)/ml ($\Delta \ln CFU ml^{-1} / \Delta t$) no tempo (t) = 2–6 h para *L. lactis* R7 e no t = 0–4 h para *S. Enteritidis*.

L. lactis R7 e *S. Enteritidis* foram inoculados duas vezes antes da utilização em caldo Brain Heart Infusion (BHI) a 37°C overnight. Após, 1 mL do inóculo foi adicionado em 100 mL de caldo BHI (pH 6,5) e incubados a 37°C por 24 h. Nos tempos (t) 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 h amostras foram coletadas para monitoramento do crescimento das colônias. A multiplicação foi determinada por contagem em placas em ágar Man Rogosa Sharpe (MRS) para *L. lactis* R7 e ágar Hektoen Entérico (HE) para *S. Enteritidis*. *Lactococcus lactis* R7 foi incubado anaerobicamente em placas de MRS por 48 h a 37°C, e *S. Enteritidis* foi incubado aerobicamente em placas de HE por 24 h a 37°C.

Já a co-cultura foi inoculada em 100 mL de caldo BHI (pH 6,5) pré-aquecido (30°C) e, posteriormente, inoculado 1 mL de cada cultura de overnight. A co-cultura foi incubada a 37°C por 24 h. Nos tempos (t) = 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 h amostras foram coletadas para monitoramento da multiplicação bacteriana. A multiplicação foi determinada por contagem em placas contendo ágar MRS e HE. 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 Graphpad prism 10.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os parâmetros que descrevem o crescimento são mostrados na Tabela 1, onde foi observada diferença significativa entre o Nmax das mono-culturas. Embora no presente estudo não tenha sido observada esta diferença, estudo realizado por Silva (2021) com *L. lactis* R7 e duas cepas de *Listeria monocytogenes*, o Nmax de ambas *L. monocytogenes* apresentou redução significativa quando em co-cultura com *L. lactis* R7, assim como no N24h. Além disso, o mesmo estudo apresentou redução de *L. lactis* R7, já no presente estudo não ocorreu redução do Nmax de R7 em co-cultura.

Tabela 1. Fase de latência (λ), taxa de crescimento máximo (μ_{max}), densidade populacional máxima (Nmax) e densidade populacional final (N24h) de *Lactococcus lactis* e *Salmonella Enteritidis*.

Microrganismos*	Cultura	λ	μ_{max}	Nmax	N24h
		hora	h ⁻¹	Log UFC/mL	
R7	Mono-cultura	0,165±0,07**	0,325±0,14	8,30±0,00 ^a	8,30±0,00
	Co-cultura	0,205±0,03	0,409±0,07	8,54±0,21	8,45±0,64
SE	Mono-cultura	0,081±0,01	0,161±0,01	8,72±0,04 ^a	8,45±0,64
	Co-cultura	0,103±0,03	0,168±0,05	8,39±0,13	8,39±0,13

*R7: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* R7; SE: *Salmonella Enteritidis*.

**Dados expressos em médias ± desvio padrão com valores de p=0,033^a

As curvas de crescimento estão apresentadas na Figura 1, onde pode ser observada diferença significativa nos tempos de 6 h e 8 h (p=0,002 e p=0,027, respectivamente) entre as co-culturas de *L. lactis* R7 e *S. Enteritidis*. No tempo de 6 h *S. Enteritidis* em co-cultura apresentou 7,30 Log UFC/mL⁻¹, enquanto que, em mono-cultura no mesmo tempo a contagem foi de 7,39 Log UFC/mL⁻¹. Já no tempo de 8 h *S. Enteritidis* obteve crescimento de 7,60 Log UFC/mL⁻¹ em co-

cultura e $8,30 \text{ Log UFC/mL}^{-1}$ em mono-cultura. Estes resultados evidenciam um menor crescimento de *S. Enteritidis* quando em co-cultura com R7, porém ao serem comparados com *L. lactis* R7 e *S. Enteritidis* em co-cultura não foi observada diferença significativa. Resultado similar ao encontrado no presente estudo foi descrito por Gasparetto (2020) utilizando *Lactobacillus*, os quais não apresentaram redução no crescimento quando em co-cultura. Entretanto, no estudo de Gasparetto (2020) evidenciou-se redução no crescimento de *Salmonella Enteritidis* ATCC 13076, o que não foi demonstrado no presente estudo.

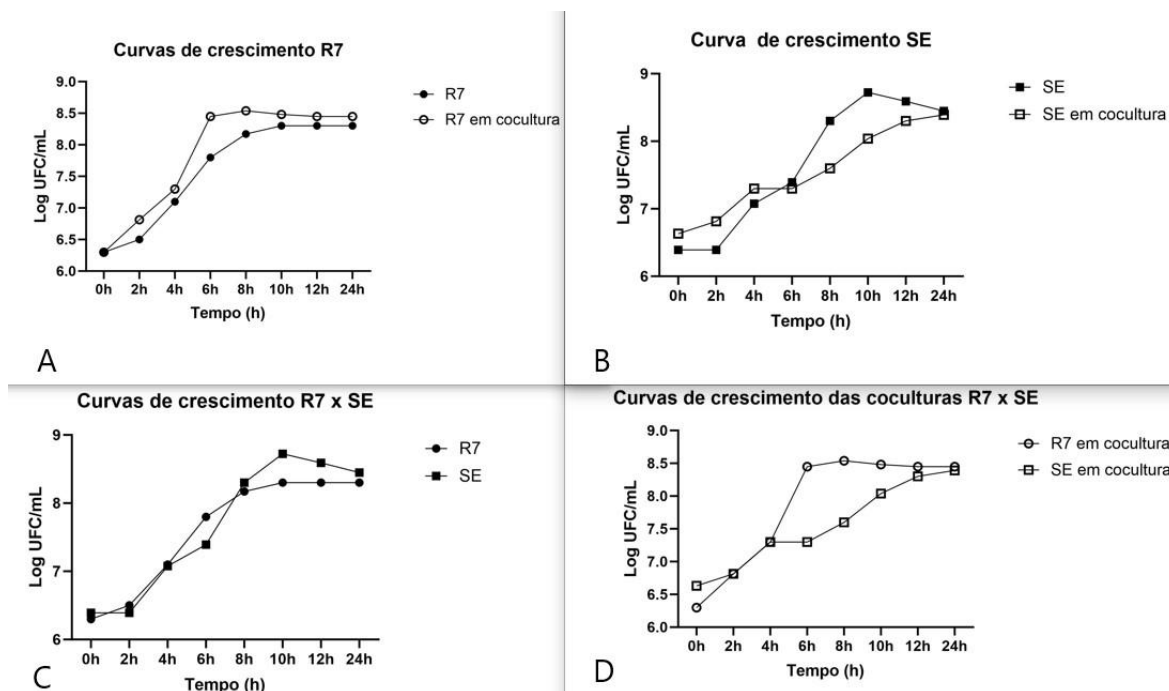


Figura 1. Curvas de crescimento de bacteriano. (A) R7 mono-cultura VS R7 co-cultura; (B) SE mono-cultura VS SE co-cultura; (C) R7 mono-cultura VS SE mono-cultura e (D) R7 co-cultura VS SE co-cultura.

4. CONCLUSÕES

Embora não tenha sido observada diferença significativa entre mono-culturas e co-culturas, ainda sim observou-se uma tendência de redução do crescimento de *S. Enteritidis* em co-cultura com o probiótico *L. lactis* R7. Sendo assim, mais estudos devem ser realizados para analisar o potencial de *L. lactis* R7 frente a outros patógenos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

RIBEIRO, L. F.; SIMÃO, E. S.; WEBER, L. D. *Salmonella Enteritidis* e *Salmonella Typhimurium* nos produtos de origem avícola e sua importância na saúde pública: uma revisão. **Revista GeTeC**. v. 11, n. 36, 2022.

ABDEL-RAHMAN, M. A.; TASHIRO, Y.; Sonomoto, K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. **Biotechnology advances**. v. 31, n. 6, p. 877-902, 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 lácticas 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.

GASPARETTO, I. F. Atividade antimicrobiana in vitro de probióticos em *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* e *Shigella flexneri*. 2020. 53f. Dissertação (mestrado em ciências) - Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

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.

MOKOENA, M. P. Lactic acid bacteria and their bacteriocins: Classification, biosynthesis and applications against uropathogens: A mini-review. **Molecules**. v. 22, n. 8, p. 1255, 2017.

PARAPOULI, M.; DELBES-PAUS, C.; KAKOURI, A.; KOUKKOU, A.I.; MONTEL, M.C.; 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. **Applied and environmental microbiology**. v. 79, n. 11, p. 3476-3484, 2013.

SIAMANSOURI, M.; MOZAFFARI, S.; ALIKHANI, F. Bacteriocins and lactic acid bacteria. **Journal of Biology**. v. 2, n. 5, p. 227-234, 2013.

SILVA, T.G. Efeito da co-cultura de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (R7) em *Listeria monocytogenes*. 2021. 44f. Dissertação (mestrado em nutrição e alimentos) - Programa de pós-graduação em nutrição e alimentos da Universidade Federal de Pelotas.

SUSKOVIC, J.; KOS, B.; BEGANOVIC, J.; PAVUNC, A.L.; HABJANIC, K.; MATOSIC, S. Antimicrobial Activity- The most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. **Food Technology and Biotechnology**. v. 48, n. 3, p. 296-307, 2010.