

AVALIAÇÃO DE CURVAS DE CRESCIMENTO MICROBIANO DE *PEDIOCOCCUS PENTOSACEUS* E *LISTERIA MONOCYTOGENES* EM MONOCULTURA E CO-CULTURA

THAYANE GARCIA BLUMBERG¹; TAICIANE GONÇALVES DA SILVA²;
SIMONE PIENIZ³

¹Universidade Federal de Pelotas – thayaneblumberg@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – ta.ici@hotmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas – nutrisimone@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

Bactérias ácido láticas (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). Entre as BAL com potencial probiótico, destaca-se *Pediococcus pentosaceus*, um micro-organismo presente na microbiota natural de mamíferos (FAO, 2002), o qual possui como principal função promover a fermentação dos produtos alimentícios, favorecer a acidificação do meio com consequente aumento da vida útil dos alimentos e, agregar valor como cultura adjunta com potencial probiótico.

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 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, gastroenterites, meningite e encefalite que podem levar a 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 juntamente com BAL, podem interferir a 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 *P. pentosaceus* e *L. monocytogenes* em mono-cultura e co-cultura.

2. METODOLOGIA

Neste estudo foram utilizados os micro-organismos *P. pentosaceus* (P107), proveniente de presunto cozido fatiado (MARQUES, 2014), pertencente a coleção de bactérias probióticas e culturas iniciadoras do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Além destes, foi utilizada uma cepa padrão de *L. monocytogenes* ATCC 7644 (LM). 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: Unidade Formadora de Colônia (UFC)/mL ($\Delta \ln \text{CFU mL}^{-1} / \Delta t$) no tempo (t) = 2–6 horas para *P. pentosaceus* P107 e no t = 0–4 horas para *L. monocytogenes*.

Pediococcus pentosaceus P107 e *L. monocytogenes* 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 *P. pentosaceus*, o qual foi incubado anaerobicamente a 37 °C por 48 horas, e para a contagem de *L. monocytogenes* foi utilizado ágar *Oxford*, incubado aerobicamente por 48 horas a 37 °C.

Cem (100) mL de caldo BHI (pH 6,5) foram pré-aquecidos (30 °C) e inoculados com 1 mL de cada cultura *overnight*. As culturas inoculadas formaram a co-cultura 2 (*P. pentosaceus* P107+*L. monocytogenes*) a qual foi incubada 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 (*P. pentosaceus* P107) e Oxford (*L. monocytogenes*). 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

Parâmetros que descrevem o crescimento são mostrados na Tabela 1, onde pode ser observada uma diferença significativa de Nmax no crescimento de *P. pentosaceus* P107 versus *P. pentosaceus* P107 em co-cultura ($p=0,007$) e *L. monocytogenes* versus *L. monocytogenes* em co-cultura ($p=0,043$), assim como N24h ($p=0,007$ e $p=0,038$, respectivamente). Estudo realizado por Jenabian (2011), o qual utilizou *Lactobacillus acidophilus* e *L. monocytogenes*, apresentou resultados semelhantes quando comparados a este estudo, visto que a *P. pentosaceus* P107 apresentou diferença significativa em co-cultura, observando que o seu Nmax foi maior do que na mono-cultura. Já *L. monocytogenes* apresentou um menor Nmax em co-cultura quando comparado a mono-cultura.

Tabela 1. Fase de latência (λ), taxa de crescimento máximo (μ_{max}), densidade populacional máxima (Nmax) e densidade populacional final (N24h) de *Pediococcus pentosaceus* (P107) e *Listeria monocytogenes* (LM).

Micro-organismos	Cultura	λ	μ_{max}	Nmax		
				Horas	Horas ⁻¹	Log UFC/mL
P107	Mono-cultura	$0,114 \pm 0,06$	$0,228 \pm 0,11$	$8,40 \pm 0,00^*$	$8,40 \pm 0,00^{***}$	
	Co-cultura	$0,220 \pm 0,02$	$0,440 \pm 0,08$	$8,85 \pm 0,21^*$	$8,85 \pm 0,64^{***}$	
LM	Mono-cultura	$0,073 \pm 0,02$	$0,148 \pm 0,04$	$7,40 \pm 0,04^{**}$	$7,40 \pm 0,64^{****}$	
	Co-cultura	$0,031 \pm 0,01$	$0,060 \pm 0,02$	$7,11 \pm 0,13^{**}$	$7,11 \pm 0,13^{****}$	

*Dados expressos em médias e desvio padrão com valores de P de * $p=0,007$, ** $p=0,043$, *** $p=0,007$ e **** $p=0,038$

As curvas de crescimento estão apresentadas na Figura 1, onde pode-se observar diferença significativa no tempo de 6 horas ($p=0,004$) para *P. pentosaceus* P107 em co-cultura, o que demonstra um bom resultado já que esta não apresentou redução quando exposta com *L. monocytogenes*. Com relação a *L. monocytogenes* e *L. monocytogenes* em co-cultura, esta não apresentou redução de crescimento em nenhum dos tempos analisados. Quando comparada as culturas de *P. pentosaceus* P107 e *L. monocytogenes* foi observada diferença significativa nos tempos de 4 horas e 6 horas ($p<0,0001$), enquanto que essa diferença não foi observada nestes mesmos tempos quando comparado as duas mono-culturas *P. pentosaceus* P107 e *L. monocytogenes*, observando assim que a *L. monocytogenes* apresentou inibição de crescimento nesses tempos.

No estudo realizado por COSTA (2016) foi observada redução do crescimento da *L. monocytogenes* quando em co-cultura com uma cepa probiótica. Porém, no presente estudo não foi evidenciado esse mesmo resultado, observando que a *L. monocytogenes* não reduziu o seu crescimento, porém apresentou uma inibição de crescimento quando em co-cultura com *P. pentosaceus* P107.

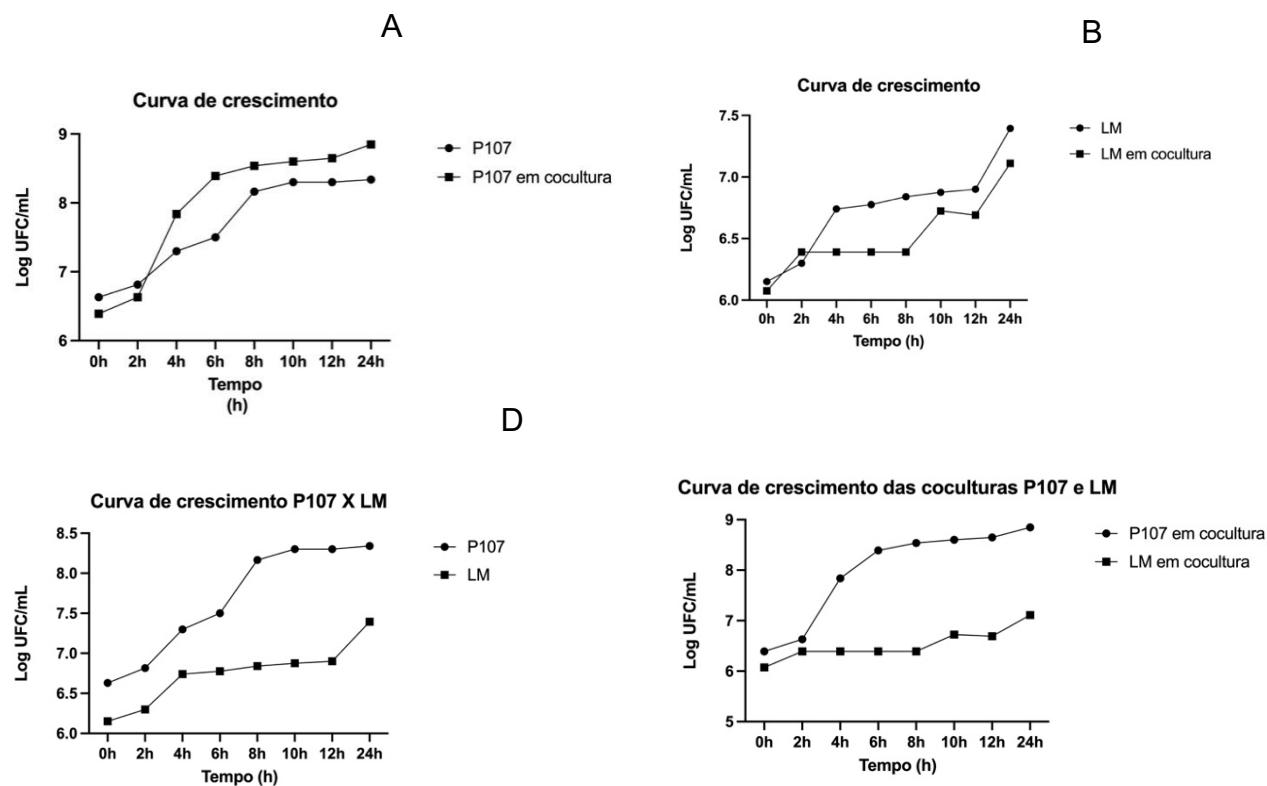


Figura 1. Curvas de crescimento de bacteriano. (A) *Pediococcus pentosaceus* (P107) mono-cultura versus *Pediococcus pentosaceus* (P107) co-cultura 1; (B) *Listeria monocytogenes* (LM) mono-cultura versus *Listeria monocytogenes* (LM) co-cultura; (C) *Pediococcus pentosaceus* (P107) em mono-cultura versus *Listeria monocytogenes* (LM) em mono-cultura e (D) *Pediococcus pentosaceus* (P107) em co-cultura versus *Listeria monocytogenes* (LM) em co-cultura 2.

4. CONCLUSÕES

Conclui-se que apesar de não haver redução significativa de *L. monocytogenes* em co-cultura quando comparado com sua mono-cultura, ainda pode ser observada uma inibição de seu crescimento, demonstrando que o *P. pentosaceus* (P107) potencializou o seu crescimento no tempo de 6 horas quando em co-cultura, resultado este que sugere algum mecanismo de ação de *P. pentosaceus* (P107) frente ao patógeno estudado. Por meio deste resultado, mais estudos devem ser realizados para avaliar a ação de *P. pentosaceus* (P107) 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.
- 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.
- 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.
- FAO / WHO. Orientações para a avaliação de probióticos na alimentação. London, 2002. 11 p.
- 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.
- 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.
- SIAMANSOURI M, MOZAFFARI S, ALIKHANI F. Bacteriocins and lactic acid bacteria. **J. Biol. Today's World.** v. 2, p. 227-234, 2013.