

ATIVIDADE ANTAGONISTA DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS ISOLADAS DE LEITE *IN NATURA* E QUEIJOS ARTESANAIS FRENTE A *E. coli*, *S. aureus*, *S. typhimurium* E *L. monocytogenes*

**FUNCK, Graçiele Daiana¹; HERMANNNS, Gislaine¹; VICENZI, Raul¹;
RICHARDS, Neila¹; SILVA, Wladimir Padilha da²; FIORENTINI, Angela Maria²**

¹ Universidade Federal de Pelotas – gracifunck@yahoo.com.br;

¹ Universidade Regional do Noroeste do Estado do RS – gislaine@unijui.edu.br;

¹ Universidade Regional do Noroeste do Estado do RS – vicenzi@unijui.edu.br;

¹ Universidade Federal de Santa Maria – neilarichards@uol.com.br

² Universidade Federal de Pelotas – silvawp@ufpel.edu.br;

² Universidade Federal de Pelotas – angefiore@gmail.com.

1. INTRODUÇÃO

O estado do Rio Grande do Sul (RS) é atualmente o segundo maior produtor de leite do Brasil, com uma produção anual superior a 2,9 bilhões de litros, o que representa 11,3% da produção nacional (EMBRAPA, 2010). A produção de leite neste estado vem crescendo em escala e produtividade nos últimos anos, principalmente nas bacias leiteiras ligadas às cooperativas, responsáveis pela maioria da captação. As regiões¹ com maior destaque na produção leiteira no Estado são: **Noroeste Colonial** com 11,3%, **Produção** com 11%, **Fronteira Noroeste** com 9,4% e **Serra** com 8,1% (IBGE, 2010).

No Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul é produzido um queijo artesanal, popularmente denominado queijo colonial, cujo conhecimento das suas técnicas de fabricação tem sido transferido verbalmente ao longo das gerações. Por ser fabricado, na grande maioria dos casos, com leite cru e sem a adição de um inóculo inicial, possui uma diversificada população microbiana indesejada, proveniente do próprio leite e também das condições higiênico-sanitárias às quais é submetido. Este produto caracteriza-se como um perigo aos consumidores, já que além de micro-organismos deteriorantes pode servir de veículo para micro-organismos patogênicos, como *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus coagulase positiva* e *Salmonella* sp. (SANTANA et al., 2008).

Além dos micro-organismos indesejáveis, estão presentes as bactérias ácido-láticas (BALs). Essas bactérias são inerentes da matéria-prima leite, e desempenham um papel primordial no processo de fermentação do mesmo, além de produzir substâncias capazes de combater patógenos contaminantes naturalmente, sendo sua utilização um dos métodos mais antigos de preservação.

Esta capacidade de combate a patógenos é conhecida como atividade antagonista das BALs. Ela ocorre devido ao crescimento competitivo com outros micro-organismos, potencializado pelos efeitos inibitórios dos seus metabólitos. O principal é o ácido lático, além de peróxido de hidrogênio, CO₂, diacetil e as bacteriocinas (NAIDU et al., 1999).

A existência de um paradoxo muito grande leva a crer que as bactérias lácticas nativas são responsáveis pelo antagonismo a patógenos. . Isto sugere que a microbiota natural interfere no desenvolvimento de patógenos (ORTOLANI, 2009). Neste sentido, o desenvolvimento e otimização de BAL ou de seus metabólitos antimicrobianos para aplicação como inibidores “naturais” direcionada

¹ Classificação dos Conselhos Regionais de Desenvolvimento – COREDES – RS.

à biopreservação de alimentos tem o objetivo de controlar bactérias indesejáveis, sejam elas deteriorantes ou patogênicas. Este aspecto pretende atender aos anseios do consumidor, exigente por produtos sem adição de conservantes químicos, minimamente processados e com elevada vida útil.

A população microbiana de cada produto lácteo varia de acordo com a região geográfica onde este é produzido, podendo se atribuir variações em razão do leite utilizado, do clima predominante e dos métodos empregados no processamento. O presente estudo possibilitará conhecer os níveis das populações de BALs de interesse, com atividade antagonista frente *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhimurium* para futura utilização destas como culturas iniciadoras na produção de queijos tipo colônia.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa faz parte de um projeto financiado pela Secretaria de Ciência e Tecnologia do Estado do RS, que está sendo realizado junto a produtores rurais, da região Fronteira Noroeste do estado do RS. Foram inicialmente, selecionados dez pequenos produtores de queijo artesanal, de sete municípios da região. Estes foram indicados pela EMATER, por se tratarem de queijos feitos com leite cru e sem adição de inóculo inicial. Os experimentos estão sendo realizados junto aos Laboratórios de Microbiologia e Físico-química da UNIJUÍ – Universidade Regional do Noroeste do Estado do RS, campus Santa Rosa.

De cada propriedade foram coletadas: 01 amostra de leite *in natura* e dois queijos, com 01 dia de fabricação. Um dos queijos foi analisado imediatamente, caracterizando o Tempo 01 (T1). O outro queijo foi maturado, por sete dias, sob refrigeração, caracterizando o Tempo 07 (T7).

Destas amostras, as bactérias isoladas em ágar DE MAN, ROGOSA e SHARPE (MRS), foram analisadas quanto à forma, coloração de Gram e catalase. Os isolados caracterizados como cocos ou bacilos, Gram positivos e catalase negativa foram mantidas em ágar MRS e submetidas posteriormente, ao teste em gota (“spot”) segundo JACOBSEN et al. (1999) para determinação de atividade antagônica frente à *E. coli* (ATCC 8739), *Staphylococcus aureus* (ATCC 1901), *Salmonella typhimurium* (ATCC 13076) e *Listeria monocytogenes* (ATCC 7466), 27 cepas de BALs.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na tabela 1 se pode observar que 59,26% dos isolados de bactérias ácido-láticas apresentaram atividade antagônica contra *E. coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhimurium* e 55,56% contra *Listeria monocytogenes*. Dos isolados que apresentaram atividade antagônica contra *E. coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhimurium*, 6,25% são provenientes do leite “in natura”, 56,25% dos queijos T1 e 37,5% dos queijos T7. Ainda, dos isolados que promoveram antagonismo contra *Listeria monocytogenes*, 60% são oriundos dos queijos T1 e 40% dos queijos T7.

Obtiveram-se halos de inibição de diâmetros entre 18,24 mm e 49,72 mm para *E. coli*, 22,21 mm e 43,94 mm para *Staphylococcus aureus*, 18,82 mm e 49,09 mm para *Salmonella typhimurium* e 23,39 mm e 41,57 mm para *Listeria monocytogenes*. As cepas com maiores diâmetros de halos de inibição foram Y5

para *E. coli*, O4 para *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhimurium* e E4 para *Listeria monocytogenes*.

CHIODA et al. (2007) analisou cepas de *Lactobacillus acidophilus* e confirmou através de zonas de inibição a atividade antagônica destes contra *Escherichia coli*. De MARTINIS et al. (2001) isolou linhagens de BALs de produtos cárneos e observou zonas de inibição de onze isolados contra *Listeria monocytogenes*. NETO et al. (2005) isolou Lactobacilos de queijo coalho e verificou que todos isolados foram capazes de inibir *Staphylococcus sp.* e *E. coli*. SANTOS et al. (2003), usaram 58 cepas de *Lactobacillus* de espécies diferentes e as testaram contra diversos micro-organismos para verificar sua atividade antimicrobiana, utilizando o método do “spot-test”. Os autores verificaram que 75% dos *Lactobacillus* mostraram atividade antimicrobiana contra *E. coli*, 50% contra *Listeria monocytogenes* e 81% contra *S. typhimurium*.

O presente trabalho não avaliou a natureza das substâncias antagonistas produzidas pelas culturas produtoras, porém as atividades inibitórias verificadas justificam-se pela produção de substâncias inibidoras que teriam se difundido pelo ágar e impedido o crescimento das culturas reveladoras. Entre elas, podem ser citadas: ácidos orgânicos (como ácido láctico), peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, diacetil, acetaldeído e substâncias antimicrobianas de natureza protéica, denominadas bacteriocinas (NAIDU et al., 1999).

Tabela 1 – Atividade antagônica de cepas de bactérias ácido-láticas isoladas de leite e queijos da região Fronteira Noroeste do estado do RS frente a *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* e *Listeria monocytogenes*.

Cepas isoladas	<i>E. coli</i> (ATCC 8739)	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 1901)	<i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC 13076)	<i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC 7466)
A5	+	+	+	+
AC2	-	-	-	-
AC4	+	+	+	+
BA1	-	-	-	-
BA2	-	-	-	-
BC2	-	-	-	-
C1	-	-	-	-
C4	+	+	+	+
E4	+	+	+	+
F4	+	+	+	+
I4	-	-	-	-
L5	-	-	-	-
M4	-	-	-	-
O1	-	-	-	-
O4	+	+	+	-
P2	+	+	+	+
P4	-	-	-	-
R1	+	+	+	+
R2	+	+	+	+
R3	+	+	+	-
R4	+	+	+	+
S4	+	+	+	+
U3	+	+	+	+
U4	+	+	+	+
U5	+	+	+	+
Y1	-	-	-	-
Y5	+	+	+	+

(-) Inexistência de atividade antagônica; (+) Existência de atividade antagônica.

4. CONCLUSÕES

As bactérias ácido-láticas isoladas dos leites e queijos artesanais da região Fronteira Noroeste que promoveram atividade antagônica frente aos patógenos testados, após identificadas e caracterizadas, poderão ser utilizadas como culturas iniciadoras para a produção de queijos coloniais visando melhorar a qualidade sanitária do produto.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHIODA, T. P. et al. Inibição do crescimento de *Escherichia coli* isolada de Queijo “Minas Frescal” por *Lactobacillus acidophilus*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n.2, p. 583-585, mar./abr., 2007.

EMBRAPA, 2010. Empresa Brasileira de Agropecuária. Estatísticas do leite. Acessado em julho 2010. Disponível em: <<http://www.cnpqg.embrapa.br/>>.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. 2010. Acessado em julho 2010. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/>>.

JACOBSEN, C. et al. Screening of probiotic activities of forty seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, p. 4949–4956, 1999.

MARTINIS, E. C.P. et al. Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum packaged brazilian meat and meat products. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 32-37, 2001.

NAIDU, A.S. et al. Probiotic spectra of lactic acid bacteria. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 38, p.13-126, 1999.

NETO, G. G. L. et al. Atividade antimicrobiana de bactérias ácido láticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente à micro-organismos indicadores. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.57, supl. 2, p. 245-250, 2005.

ORTOLANI, M. B. T. **Bactérias ácido-láticas autóctones de leite cru e queijo minas frescal: Isolamento de culturas bactericínogênicas, caracterização da atividade antagonista e identificação molecular**. 2009. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

SANTANA, R. F. et al. Qualidade microbiológica de queijo-coalho comercializado em Aracaju, SE. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.60, n.6, p.1517-1522, 2008.

SANTOS, F. L.; FERREIRA, C. L. F.; COSTA, N. M. B. Modulação da colesterolemia por meio de prebióticos e probióticos. In: **SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE PRÉ E PROBIÓTICOS**, 1., 2003, Viçosa. Prebióticos e probióticos: Atualização e Prospecção. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2003. p. 61,78.