

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE BACTÉRIAS LÁCTICAS ISOLADAS DE LEITE CRU DE BÚFALA

FREITAS, Lais Santos¹ ; BACK, Isabel Maria²; JANTZEN, Márcia Monks²; MOTTA, Amanda de Souza¹.

¹ Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Faculdade de Veterinária, UFPel, Pelotas/RS, Brasil, ² Química de Alimentos, FAT, UFPel, Pelotas/RS, Brasil.
laissdefreitas@hotmail.com

1 INTRODUÇÃO

O leite de búfala e seus produtos derivados vêm assegurando mais espaço no mercado, devido às características muito próprias que despertam o interesse do público consumidor. Parte das propriedades organolépticas destes produtos podem ser atribuídas a microbiota láctica presente, responsável pela produção de uma diversidade de metabólitos (BUZI, 2009). Em relação às propriedades sensoriais, as bactérias lácticas (BAL) apresentam potencial na conferência destas características. As BAL são produtoras de uma variedade de compostos, incluindo: ácidos orgânicos, diacetil, peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, álcool, aldeído e bacteriocinas. Alguns destes compostos podem afetar o desenvolvimento de outros microrganismos como bactérias deteriorantes e patogênicas presentes nos alimentos (HUGAS, 1998).

As BAL são bactérias Gram-positivas, não esporuladas, cujo principal produto da fermentação é o ácido láctico. Elas compreendem vários gêneros bacterianos como os *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Bifidobacterium*. Dentre estes gêneros especialmente os *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus* têm sido utilizados como culturas “starters” para a fermentação de alimentos e bebidas devido as suas contribuições para com as características sensoriais destes produtos, promovendo da mesma forma estabilidade microbiológica aos mesmos (DE VUYST AND VANDAMME, 1994).

A produção de substâncias antimicrobianas vem sendo explorada nestas bactérias, associando a capacidade de biopreservação, ao potencial como culturas fermentadoras de alimentos. O potencial antagonico promotor de biopreservação deve-se a produção de: enzimas bacteriolíticas, subprodutos de via metabólica, como a produção de ácidos orgânicos e bacteriocinas (PEREIRA, 2007). As bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos sintetizados ribossomicamente e que apresentam atividade antimicrobiana contra uma ampla gama de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Nisina e pediocina são as bacteriocinas de bactérias lácticas mais estudadas (BENECH et al., 2002). A redução no conteúdo de patógenos, tal como *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* tem sido associada à produção de substâncias antimicrobianas como as bacteriocinas (MORGAN et al, 2001).

Com isso, o interesse deste trabalho está na pesquisa e na identificação de BAL isoladas de leite cru de búfala, produtoras de compostos antimicrobianos do tipo-bacteriocina. Outras substâncias podem estar sendo produzidas e a presença das culturas lácticas em alimentos passa a contribuir para a estabilidade microbiológica dos produtos.

2 METODOLOGIA

2.1 MICRORGANISMOS E MEIOS DE CULTIVO

As BAL isoladas foram mantidas em meios específicos como Ágar MRS e Ágar M17. Outras culturas de microrganismos foram empregadas neste trabalho para avaliação das propriedades de antagonismo das BAL bem como para avaliar o espectro de atividade antimicrobiana destas culturas. *Corynebacterium fimi* NCTC 7547 é descrito como sendo uma linhagem sensível a todas as bacteriocinas já testadas e foi utilizada nos testes de atividade. As demais culturas foram mantidas em Ágar TSB ou BHI em refrigeração e renovadas periodicamente.

2.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO PRELIMINAR DAS BACTÉRIAS LÁCTICAS ISOLADAS DE LEITE CRU DE BÚFALA.

O leite cru de búfala foi obtido do Laticínio Dabúfala (Cassino-RS). Amostras de 10 mL do leite cru foram homogeneizadas em 90mL de água peptonada 0,1%, obtendo-se a primeira diluição das amostras. Foram feitas as demais diluições das amostras em água peptonada 0,1% e o isolamento de lactobacilos foi feito em meio de cultura Ágar MRS em aerobiose e anaerobiose usando Anaerobac, a 30°C por 48-72h. Para o isolamento das bactérias lácticas em forma de cocos foi empregado o meio Ágar M17, com o mesmo procedimento. Colônias características foram selecionadas ao acaso e purificadas no mesmo meio em caldo e estocados a -20°C em caldo MRS e caldo M17 contendo 25% (v/v) de glicerol. Todos os isolados passaram por uma caracterização preliminar constituindo-se de reação de coloração de Gram, prova da catalase e perfil de homofermentação e heterofermentação de açúcares.

2.3 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS BACTÉRIAS LÁCTICAS ISOLADAS PELO TESTE DA SOBRECAMADA

Em placas de Ágar MRS e M17 foi feita a semeadura em forma de picada de cada cultura de BAL a ser analisada. As placas foram incubadas a 30°C por 24h. Após o crescimento, foi vertido Ágar BHI semi-sólido (0,6% agar) previamente inoculado com *C.fimi* NCTC 7547 e aguardou-se a solidificação. As placas foram invertidas e incubadas a 37°C e foi observada a formação de halos. Este teste foi realizado em triplicata.

2.4 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO TIPO BACTERIOCINA

Estão sendo realizados testes para avaliar a natureza das substâncias que estão sendo produzidas uma vez que procuramos substâncias de natureza protéica, as bacteriocinas. Para o teste de atividade antimicrobiana será empregado o método de difusão em Agar com discos (MOTTA e BRANDELLI, 2002).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ISOLAMENTO DAS BAL DE LEITE CRU DE BÚFALA

Duas amostras de leite cru de búfala foram semeadas utilizando dois meios: Agar MRS e M17. O primeiro isolamento das BAL (L1) foi realizado em meio de cultura Ágar MRS, incubado a 30°C em aerobiose (A) e anaerobiose (AN). Enquanto que o segundo isolamento (L2) procedeu-se da mesma forma, porém no meio de cultura Ágar M17. No primeiro isolamento (L1) houve o crescimento de 31 colônias características de BAL, em anaerobiose, dentre as quais apenas uma apresentou as características preliminares de bactéria láctica. Em aerobiose, das 19 BAL isoladas, 8 bactérias apresentaram as respectivas características de bactérias lácticas: coco ou bacilo Gram-positivo e catalase negativa.

No segundo isolamento (L2), realizado em agar M17, houve o isolamento de 30 BAL em anaerobiose, dentre as quais 6 apresentaram as características preliminares de BAL. Em aerobiose, das 20 BAL isoladas não houve a identificação de culturas com as características desejadas.

3.2 IDENTIFICAÇÃO PRELIMINAR DAS BAL

Para a seleção das BAL com as características desejadas, realizou-se uma pré-seleção baseada na morfologia das colônias das bactérias. Posteriormente foi realizada a prova de coloração de Gram e o teste de catalase. Das 50 bactérias isoladas em L1, 9 BAL apresentaram as características de coco ou bacilo Gram-positivo e catalase negativa. Já das 50 bactérias isoladas em L2, 6 apresentaram as características desejadas.

3.3 TESTE DA SOBRECAMADA

No primeiro isolamento realizado, 4 das 9 bactérias selecionadas apresentaram a formação de um halo, o qual representa a produção de substâncias antagônicas com potencial de inibição da bactéria testada (*C. fimi*). Já no segundo isolamento realizado, 6 bactérias foram selecionadas pela identificação preliminar das BAL, sendo que 3 apresentaram a formação do halo. Mais testes da sobrecamada serão realizados para que haja a confirmação dos resultados. Porém com estes resultados tem-se uma idéia do potencial antagônico sem que possa ser atribuída a natureza da atividade antimicrobiana. A produção de ácidos orgânicos é provável, porém a inibição da cultura indicadora *C. fimi*, a qual é sensível a todas as bacteriocinas já testadas pode indicar a produção de outro metabólito, como as bacteriocinas.

3.4 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO TIPO BACTERIOCINA.

Este projeto está em fase de início e a avaliação da atividade antimicrobiana do tipo-bacteriocina encontra-se em processo, onde bactérias patogênicas e deteriorantes estão sendo testadas considerando a importância das mesmas na qualidade e inocuidade dos alimentos.

4 CONCLUSÕES

As culturas típicas de bactérias lácticas isoladas até o momento foram testadas com o intuito de avaliar o potencial da inibição de uma cultura indicadora. Baseado nos resultados observou-se a produção de atividade antimicrobiana contra a cultura de *C.fimi* NCTC 7547 indicando, por este teste qualitativo, a presença de compostos de natureza antimicrobiana, secretados pelas BAL. Poucos trabalhos têm sido observados, explorando a microbiota láctica de leite de búfala, o que desperta também o interesse desta pesquisa. Mais testes também estão sendo realizados para a identificação das BAL isoladas.

5 AGRADECIMENTOS

Agradecemos à empresa Dabúfala pelo fornecimento do leite cru de búfala. Ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica – CNPq pela bolsa de iniciação científica.

6 REFERÊNCIAS

BENECH, R.O., KHEADR, E.E., LRIDI, R., LACROIX, C., FLISS, I. **Inhibition of *Listeria innocua* in cheddar cheese by Addition of nisin Z in Liposomes or by *in situ* production in mixed culture.** Applied and Environmental Microbiology, 68, 8, 3683-3690, 2002.

BUZI, K.A., PINTO, J.P.A.N., RAMOS, P.R.R., BIONDI, G.F. **Análise microbiológica e caracterização eletroforética do queijo mussarela elaborado a partir de leite de búfala.** Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 29(1): 7-11, jan.-mar. 2009

DE VUYST, L., VANDAMME, E.J. **Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and applications.** Edited by Luc de Vuyst and Eric J. Vandamme. ISBN I-8586 I-032-X, 1994, 539p.

HUGAS, M. **Bacteriogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products.** Meat Science., Barking, v.49, s.1, p.S139-S150, 1998.

MORGAN, S.M., GALVIN, M., ROSS, R.P., HILL, C. **Evaluation of a spray-dried lacticin 3147 powder for the control of *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* in a range of food systems.** Letters in Applied Microbiology, 33, 387-391, 2001.

MOTTA, A.S., BRANDELLI, A. **Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*.** Journal of Applied Microbiology, Inglaterra, v. 92, p.63-71, 2002.

PEREIRA, V.G; GÓMEZ, R.J.H.C. **Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus acidophilus*, contra microrganismos patogênicos veiculados por alimentos.** CIÊNCIAS DE ALIMENTOS. Vol. 28, No 2. 229– 241. 2007.