



## **ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTAGONISTA DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS ISOLADAS DE LEITE ORGÂNICO CRU**

**JAQUELINE DE OLIVEIRA<sup>1\*</sup>, EDUARDO LEONARSKI<sup>1</sup>, NAIANE MIRIAM  
MALHERBI, VANESSA LUIZA CUNHA<sup>1</sup>, CÁTIA TAVARES PASSOS<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus Laranjeiras do Sul*, acadêmico(a) do curso de Engenharia de Alimentos

<sup>2</sup>Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus Laranjeiras do Sul*, docente do curso de Engenharia de Alimentos e do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

\*Autor para correspondência: Jaqueline de Oliveira (jaquelineoliveira1995@hotmail.com)

### **1 Introdução**

Bactérias ácido láticas (BAL) são consideradas boas para biopreservação de alimentos lácteos fermentados (DELAVERNE et al., 2012). Apesar de muitas BAL serem reconhecidas como seguras (GRAS) para a produção de alimentos, há algumas que são patogênicas, responsáveis por causar doenças infecciosas em seres humanos e por espalhar genes de resistência a antibióticos (JANS et al., 2012, DELAVENNE et al., 2012). As BAL correspondem de 20-30 % do total de bactérias presentes no leite cru Delavenne et al. (2012), sendo essa variação, como também a diversidade dessas espécies, dependentes da estação do ano, das condições de produção, da origem do animal e do tipo de manejo (ERCOLINI et al., 2009, Delavenne et al., 2012).

As BAL são produtoras de ácido lático e outros ácidos orgânicos que atuam como preservantes naturais, promotores de *flavors* e também podem ter ação probiótica (ADNAN, TAN, 2007). Proporcionam outras características desejáveis que proporcionam a produção de alimentos com características regionais únicas. Ainda há a possibilidade de antagonismo para



bactérias patógenas, sendo que alguns gêneros de BAL (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*), além de serem utilizados nos processos tecnológicos de fermentação, apresentam esta característica que é muito importante dentro da indústria de alimentos (MATTOS, 2008; MCMULLEN, STILES, 1996).

## 2 Objetivo

Isolar e identificar BAL de leite orgânico cru coletado em Laranjeiras do Sul e Rio Bonito do Iguaçu no estado do Paraná, e posteriormente, realizar a avaliação da capacidade antagonista destas cepas.

## 3 Metodologia

O isolamento das BAL foi realizado a partir de leite orgânico cru, do município de Laranjeiras do Sul e Rio Bonito do Iguaçu, Paraná/Brasil, utilizando 4 amostras no inverno de 2015 e 4 amostras no verão de 2016, coletadas nos mesmos locais, inoculando diluições seriadas das amostras em ágar M17 aerobiamente a 30°C e anaerobiamente a 45°C/3 dias, em ágar KEA a 37°C/2 dias, em ágar Rogosa a 30 e 45°C/5 dias, ambas em anaerobiose. Foram realizados contagem e isolamento das culturas com morfologia visual diferente em placas contendo o mesmo ágar, pela técnica de esgotamento em superfície e para as anaeróbias, por purificação em caldo BHI, adicionado de óleo mineral estéril e posteriormente plaqueada por técnica de *pour plate*, em ágar Rogosa, e incubadas sob as mesmas condições de crescimento e armazenadas em placa máster de ágar M17, sob refrigeração a 4°C e congelamento a -80°C (FRANCIOSI et al., 2009). O gênero dos isolados foi identificado por testes de coloração de Gram, catalase, motilidade, crescimento a 10°C, 15°C e 45°C, crescimento em concentração de 6,5% de NaCl, consumo de glicose, redução do corante azul de metileno e crescimento em pH 9,6, utilizando o esquema de diferenciação de BAL sugerido por Carr, Chill e Maida, 2002.

Para determinação da atividade antagonista foi utilizada a metodologia proposta por Schilliger e Luke (1989) e Martins et al. (2010), utilizando como padrão as cepas patogênicas: *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enteritidis*. O tamanho dos dos halos de inibição foi medido com auxílio de um paquímetro digital.



#### 4 Resultados e Discussão

Foi possível isolar 380 cepas com características visuais diferentes, sendo 166 isoladas no inverno e 214 no verão, selecionadas como BAL apenas as Gram positivas, catalase negativas, sem motilidade reduzindo para 90 isolados. Destas 82 foram identificadas até o momento, sendo 36 no inverno: 3 *Lactococcus* spp., 2 *Streptococcus* spp., 3 *Streptobacterium* spp. e o restante *Enterococcus* spp. e 46 no verão, sendo 1 *Streptobacterium* spp. e 1 *Thermobacterium* spp. e o restante *Enterococcus* spp. Destas, 17 foram isoladas do ágar MRS, incubado à 30 °C, 13 do ágar MRS, incubado à 45°C, 10 do ágar KEA, 12 do ágar M17 aeróbio e 38 do ágar M17 anaeróbio.

Apenas a cepa *Enterococcus* BAL142, isolada no período de inverno, apresentou atividade antagonista para um dos isolados testados (*Escherichia coli*), representando 1,2% do total. Este resultado está de acordo com o encontrado por Ramírez et al (2005), pois de 330 BAL isoladas de 33 amostras diferentes de queijo, apenas 1 apresentou capacidade antagonista contra *E. Coli* (0,3%) e encontrou 1,21% com atividade antagonista para *Staphylococcus aureus* e 2,12% para *Shigella Flexneri*.

#### 5 Conclusão

Pode-se concluir que das 90 BAL isoladas foi possível identificar 82 até o momento, sendo que apenas uma (*Enterococcus* BAL142) apresentou capacidade antagonista para *E. coli*. Portanto, após a identificação, se for considerada GRAS (Geralmente Reconhecido como Seguro), esta BAL poderá ser utilizada em outros estudos.

Palavras-chave: *Escherichia coli*; *Enterococcus*; *Streptococcus*; *Thermobacterium*; *Streptobacterium*



## Referências

- CARR, F.J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The acid lactic bacteria: A literature survey. *Critical reviews in microbiology*, v. 28, n.4, p. 281-370, 2002.
- DELAVEENNE, E.; MOUNIER, J.; DENIEL, F.; BARBIER, G.; LE BLAY, G. Biodiversity of antifungal lactic acid acteria isolated from raw milk samples from cow, ewe and goat over oneyear period. **International Journal of Food Microbiology**, 155, p. 185-190, 2012.
- ERCOLINI, Danilo; et al. Molecular identification of mesophilic and psychrotropic bacteria from raw cow's milk. **Food Microbiology**, v. 26, p. 228-231, 2009.
- FRANCIOSI, E.; SETTANNI, L.; CAVAZZA, A.; POZNANSKI, E. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cow's milk. **International Dairy Journal**, 19, p. 3-11, 2009.
- JANS, C.; BUGNARD, J.; NJAGE, P.M.K.; LACROIX, C.; MEILE, L. Latic acid bacteria divesity of African raw and fermented camel milk products reveals a highly competitive, potentially healththreatening predominant microflora. **LWT-Food Science and Technology**, 47, p. 371-379, 2012.