

POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO MICRORGANISMO PROBIÓTICO *Lactobacillus acidophilus* SOBRE A BACTÉRIA *Escherichia coli*

**Cassiane Bolzan dos Passos, Franciele Sandri da Silva, Éllen Francine Rodrigues,
Luciane Maria Colla***

Laboratório de Fermentações, Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade de Passo Fundo

Laboratório de Bacteriologia, Curso de Farmácia, Universidade de Passo Fundo

**Email: lmcolla@upf.br*

RESUMO

Os probióticos são microrganismos vivos que, administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro. O inadequado emprego de antimicrobianos conferiu resistência aos microrganismos patogênicos, tornando necessária a descoberta de novas alternativas de compostos antimicrobianos. Existem inúmeros relatos de que diversas espécies do gênero *Lactobacillus* são produtoras de substâncias antimicrobianas. Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antimicrobiano de extratos obtidos a partir do microrganismo probiótico *Lactobacillus acidophilus* via fermentação submersa sobre a bactéria *Escherichia coli*. Os meios de cultivo foram armazenados a 35-37°C, e a atividade antimicrobiana dos mesmos foi determinada para o tempo zero, 24 h, 48 h, 72 h e 96 h, sendo que a mesma foi feita em duplicata. Além disso, foi realizada a determinação do pH e da acidez dos meios de cultivo. Demonstrou-se que o *Lactobacillus acidophilus* possui atividade antimicrobiana contra a *Escherichia coli*.

Palavras-chave: antimicrobianos, *E. coli*, *L. acidophilus*

1 INTRODUÇÃO

Os probióticos são microrganismos vivos que, administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro. A influência benéfica dos probióticos sobre a microbiota intestinal humana inclui fatores como efeitos antagônicos, competição e efeitos imunológicos, resultando em um aumento da resistência contra patógenos. A bactéria pertencente ao gênero *Lactobacillus* é frequentemente empregada como suplemento

probiótico para alimentos, uma vez que tem sido isolada de todas as porções do trato gastrointestinal do humano saudável (SAAD, 2006).

O inadequado emprego de antimicrobianos sob forma medicamentosa e a adição de antibióticos nas rações de animais, conferiu resistência aos microrganismos patogênicos, tornando necessária à descoberta de novas alternativas de compostos antimicrobianos (TRABULSI e ALTERTHUM, 2004).

Os lactobacilos representam um grupo de bactérias ácido-láticas com capacidade de crescimento em qualquer habitat que contenha açúcares fermentáveis, produtos hidrolisados de proteínas, vitaminas, fatores de crescimento e baixa disponibilidade de oxigênio. Além disso, por serem bons produtores de ácido lático, e em algumas vezes, produtores de substâncias antimicrobianas, tendem a dominar numericamente e limitar ou impedir o desenvolvimento de microrganismos patogênicos (Rodríguez et al., 2007). Vários autores relatam que diversas espécies do gênero *Lactobacillus*, são produtoras de substâncias antimicrobianas (RACCACHI, MCGRATH, DAFTARIAN, 1989; EL-ZINEY et al., 1999; PEREIRA e GÓMEZ, 2007).

Objetivou-se avaliar o potencial antimicrobiano de extratos obtidos a partir do microrganismo probiótico *Lactobacillus acidophilus* via fermentação submersa sobre a bactéria *Escherichia coli*.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Material e Métodos

2.1.2 Microrganismos

O microrganismo probiótico utilizado foi uma cultura comercial liofilizada de *Lactobacillus acidophilus*, obtida do Laboratório de Fermentações do curso de Engenharia de Alimentos da UPF (Universidade de Passo Fundo), cedida pela empresa Globalfood. O microrganismo patogênico utilizado nos testes de atividade antimicrobiana foi a *Escherichia coli* ATCC 25922, obtida do banco de cepas do Laboratório de Microbiologia do curso de Farmácia da UPF.

2.1.3 Produção de compostos com atividade antimicrobiana

A ativação da cultura probiótica foi realizada conforme metodologia descrita por Pereira e Gómez (2007), com algumas modificações. A cultura probiótica foi mantida a -18°C em sua forma liofilizada. Para sua ativação, a cultura probiótica liofilizada foi inoculada em 100 mL de leite desnatado estéril. Após 24 h, o cultivo obtido foi utilizado para a inoculação de 5 erlenmeyers contendo cada um, 90 mL de meio MRS (Man Rogosa & Sharpe) estéril. Adicionou-se 10 mL de inóculo em cada erlenmeyer, e os cultivos foram incubados a 37°C , em aerobiose, sendo que nos tempos zero, 24 h, 48 h, 72 h e 96 h, os cultivos foram retirados da estufa e armazenados em refrigerador a 5°C a fim de paralisar o processo fermentativo. Os meios foram centrifugados durante 20 min a 3000 rpm. O sobrenadante obtido foi utilizado nos experimentos de inibição.

2.1.4 Teste de atividade antimicrobiana

A ativação do microrganismo patogênico indicador (*Escherichia coli*), foi realizada conforme metodologia decria por Pereira e Gómez (2007), com algumas adaptações, bem como o teste de atividade antimicrobiana. O microrganismo patogênico indicador (*Escherichia coli*), foi colocado em um tubo de ensaio contendo caldo tioglicolato, e levado à incubação em estufa a 35°C - 37°C , por 24 h. Decorrido o período de incubação, foi feita a semeadura em placas de ágar Mac Conkey, com auxílio de alça de platina e levado à incubação em estufa a 35°C - 37°C por 24 h.

Os extratos centrifugados obtidos a partir do cultivo com o *Lactobacillus acidophillus* foram adicionados em discos de papel filtro de 5 mm estéreis. Cada disco foi impregnado com 5 μL do extrato contendo a substância antimicrobiana, sendo o procedimento de impregnação repetido 5 vezes, realizando-se a secagem dos discos a 50°C entre cada procedimento. Os discos foram mantidos a temperatura ambiente até sua utilização. Os discos foram colocados na superfície do ágar Muller Hinton contendo a *Escherichia coli*, que foi previamente semeada através de swab. A semeadura do microrganismo patogênico indicador, foi feita através da utilização de solução salina estéril, inoculada com as colônias de *Escherichia coli*, utilizando como comparativo um tubo contendo a concentração de 0,5 na escala de Mac Farlan. As placas foram incubadas em estufa a 35°C - 37°C , sendo que as leituras das mesmas

foram feitas no tempo de 24 h e 48 h após a incubação. O teste de atividade antimicrobiana foi feito em duplicata para cada tempo de fermentação.

2.1.5 Determinação do pH e acidez

As determinações de pH e acidez durante o processo fermentativo foram realizadas conforme AOAC (1995).

2.2 Resultados e Discussão

O *Lactobacillus acidophilus* apresentou atividade antimicrobiana contra a *Escherichia coli*, o que pode ser observado pela formação dos halos de inibição mostrados na Figura 1.

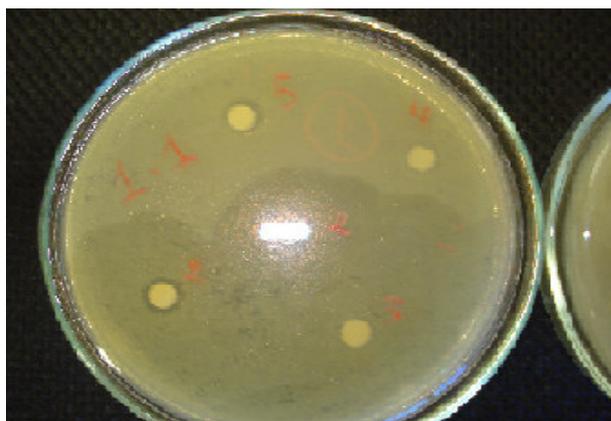


Figura 1 Halos de inibição frente a *E. coli* para os extratos obtidos da fermentação láctica com o *L. acidophilus*, no tempo de 24 h

Foram realizadas leituras dos halos nos tempos 24 h e 48 h, após a aplicação dos discos, sendo que os halos de inibição obtidos foram de $0,69 \pm 0,10$ cm e $0,63 \pm 0,06$ cm, respectivamente, devido ao maior crescimento do microrganismo patogênico em 48 h de incubação. No estudo realizado por Chioda et al. (2007), foram obtidos halos de 12 a 15 mm de diâmetro. Segundo os autores a inibição do crescimento e atividade bactericida de *L. acidophilus* sobre *E.coli* ocorreu devido à produção de ácido láctico e à redução do pH (CHIODA et.al., 2007).

O percentual de ácido lático produzido pelo *Lactobacillus acidophilus* foi maior no tempo de 24 h (0,36%) e o pH do caldo de fermentação foi de 3,52. Os halos de inibição obtidos neste tempo devem-se a atividade antimicrobiana do ácido lático.

Estudos apontam que existem várias substâncias antimicrobianas que podem ser produzidas pelo grupo das bactérias ácido-láticas, como ácidos orgânicos (como o ácido lático), peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, diacetil, acetaldeído e bacteriocinas (NETO et al., 2005).

Sobre este aspecto, alguns ácidos, principalmente o ácido lático e acético, têm sido utilizados como conservantes de alimentos, juntamente com um pH mais baixo, para inibir o crescimento de microrganismos contaminantes e patogênicos (PEREIRA e GÓMEZ, 2007). Além desta aplicação em produtos lácteos, sugere-se que os compostos antimicrobianos produzidos pelo *Lactobacillus acidophilus*, poderiam ser utilizados em produtos sanitizantes. Lopes (1998) relata, a inibição de *Escherichia coli* ATCC 11229 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, com eficiência bactericida de 99,999% em 30 segundos, utilizando um produto preparado à base de ácido lático, sendo que neste caso, o mesmo foi utilizado na concentração de 94,76 mM, com um surfactante (sódio capril lactato) a 1,25 mM (PEREIRA e GÓMEZ, 2007).

Estes produtos sanitizantes, seriam formulações que teriam a capacidade de reduzir o número de microrganismos, porém não seriam prejudiciais aos seres humanos, sendo que uma das aplicações dos mesmos seria na assepsia das bancadas de indústrias de alimentos, bem como na assepsia das mãos, evitando dessa forma inúmeros casos de dermatites de contato, induzidas pela utilização do álcool 70%.

3 CONCLUSÃO

O *Lactobacillus acidophilus* produz compostos com atividade antimicrobiana frente a *Escherichia coli*, indicando uma possível aplicação destes compostos frente a microrganismos na indústria de alimentos, visto serem compostos de baixa toxicidade ao ser humano em comparação com os sanitizantes atualmente utilizados.

REFERÊNCIAS

AOAC (1995). **Official Methods of Analysis, 16th Edition**. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA, ISBN 0-935584-54-4.

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

NETO, L.G.G., et al.. Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-láticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a microrganismos indicadores. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 2, p.245-250, 2005.

PEREIRA, V. G.; GÓMEZ, R. J. H. C.. Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus acidophilus*, contra microrganismos patogênicos veiculados por alimentos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 2, p.229-240, 2007.

RODRÍGUEZ, J. A. M. et al.. Obtención de cepas de *Lactobacillus*.: Caracterización in-vitro como potenciales probióticas. **Revista Científica (Maracaibo)**, v. 17, n. 2, p.178-185, 2007.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p.1-16, 2006.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (coord.). **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu. 2004. 718 p.