

Área: Ciência de Alimentos

ATIVIDADE ANTAGONÍSTICA *IN VITRO* DE *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* SOBRE MICRORGANISMOS DE IMPORTÂNCIA EM ALIMENTOS

Juan Marcel Frighetto*, Raquel Righi da Silva, Neila Silvia Pereira dos Santos Richards, Cristiano Ragagnin de Menezes, Luiz Gustavo de Pellegrini

Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria.

*E-mail: juanfrighetto@hotmail.com

RESUMO

Os recentes avanços e o conhecimento da atividade biossintética de probióticos e sua ação antagonista sobre microrganismos patogênicos têm gerado uma nova dimensão da importância de alimentos probióticos em nutrição humana e saúde. Estudos *in vitro* demonstraram que determinadas cepas de *Bifidobacterium* são capazes de inibir o crescimento de patógenos. O objetivo deste trabalho foi determinar a atividade antagonista *in vitro* de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* sobre microrganismos de importância em alimentos, fornecendo subsídios para a continuação de estudos relacionados à funcionalidade de probióticos em alimentos. A capacidade de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bi-07 em inibir o crescimento de *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Proteus mirabilis* ATCC 25933, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e *Staphylococcus aureus* IAL 1606 foi avaliada através do método *spot-on-the-lawn*. A cultura de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* apresentou atividade antagonista sobre o crescimento dos microrganismos utilizados como indicadores, que apresentaram diâmetros de inibição entre 24,5 e 36,00 mm. Este fato pode estar relacionado à produção de ácido acético e/ou láctico em quantidades determinantes para a inibição do crescimento destes microrganismos. Os resultados obtidos ampliam as vantagens da utilização industrial de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* em alimentos, e possibilitam a continuação de estudos relacionados visando à pesquisa de substâncias antagonistas produzidas por *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* e à susceptibilidade de microrganismos patogênicos e deteriorantes à estas substâncias.

Palavras-chave: probiótico, antagonismo bacteriano, toxinfecção alimentar.

1 INTRODUÇÃO

Há décadas, os antibióticos vêm sendo utilizados para prevenção e tratamento de infecções bacterianas e, rotineiramente, para melhorar as taxas de crescimento e aumentar a eficiência alimentar em animais (SORUM & SUNDE, 2001). Estes fatos, associados ao uso inadequado e freqüente de antibióticos, têm favorecido um aumento na incidência da resistência de patógenos microbianos aos antibióticos (LEVY, 1984). Logo, pesquisas buscando alternativas ao uso de antibióticos, como a administração de probióticos, levam a promissores meios para o controle de doenças infecciosas (ROLFE, 2000).

Probióticos são definidos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro. (FAO/WHO, 2001).

Os recentes avanços e o conhecimento da atividade biossintética de probióticos e sua ação antagônica sobre microrganismos patogênicos têm gerado uma nova dimensão da importância de alimentos probióticos em nutrição humana e saúde (KAILASAPATHY & CHIN, 2000).

O consumo oral de probióticos em humanos tem sido associado à prevenção, atenuação, ou mesmo cura de doenças intestinais diversas, tais como, intolerância à lactose (O'SULLIVAN, 2001), diarreias virais e bacterianas (ELMER et al., 1996), diarreias associada a antibióticos, efeitos adversos da radioterapia abdominal, constipação, inflamações intestinais e alergias alimentares (KAILASAPATHY & CHIN, 2000). Além disso, os probióticos têm sido propostos para o tratamento de infecções do sistema urinário (REID, 1999).

Os mecanismos de interferência de probióticos envolvem competição nutricional, competição por sítios de ligação e produção de substâncias antagonísticas (DE MARTINIS et al., 2002). Em relação à produção de substâncias antagonísticas, os ácidos orgânicos, por exemplo, são fator primário na conservação dos produtos lácteos. Entretanto, a produção de diacetil, dióxido de carbono, peróxido, etanol, bacteriocinas, entre outras substâncias, também pode exercer ação inibitória sobre diferentes grupos de microrganismos (HELANDER et al., 1997).

Estudos *in vitro* demonstraram que determinadas cepas de *Bifidobacterium* exercem atividade antagônica contra patógenos (BERNET et al., 1993; GIBSON & WANG, 1994).

O objetivo deste trabalho foi determinar a atividade antagonística *in vitro* de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* sobre microrganismos de importância em alimentos, fornecendo subsídios para a continuação de estudos relacionados à funcionalidade de probióticos em alimentos.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 MATERIAL E MÉTODOS

A capacidade de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bi-07 (Danisco®, Niebüll, Germany) em inibir o crescimento de determinados microrganismos de importância em alimentos foi avaliada *in vitro*, em duplicata, através do método *spot-on-the-lawn*, adaptado de Lewus & Montville (1991). Como microrganismos indicadores, foram utilizados *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Proteus mirabilis* ATCC 25933, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e *Staphylococcus aureus* IAL 1606.

Resumidamente, uma gota de 2 µL de cultura *overnight* de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* em caldo de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) foi depositada sobre a superfície de ágar MRS, de forma a obter uma concentração celular central, em placas de Petri 90 x 15 mm. Após incubação em anaerobiose a 35-37 °C por 24 horas, cada placa foi adicionada de uma sobrecamada de 8 mL de ágar infusão cérebro coração com 0,7% de ágar (*soft* BHI) contendo 800 µL de cultura indicadora em fase estacionária, submetida à três diluições seriadas. As placas foram incubadas a 35-37 °C por 48 horas e o diâmetro das zonas de inibição foi mensurado.

2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos através do método *spot-on-the-lawn* encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Diâmetros de inibição médios obtidos por *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* frente à microrganismos de importância em alimentos.

| Microrganismo indicador | Diâmetro de inibição (mm) |
|--|---------------------------|
| <i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090 | 36,00 |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048 | 28,50 |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 | 28,00 |
| <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933 | 29,00 |
| <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028 | 24,50 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> IAL 1606 | 30,00 |

Quanto suas características metabólicas, as espécies do gênero *Bifidobacterium* diferenciam-se das espécies de bactérias lácticas por não possuírem enzima aldolase, utilizada por bactérias homofermentativas, e apresentarem uma reduzida atividade de fosfofrutocinase (DE ROISSART & LUQUET, 1994). Dentre os metabólitos produzidos por *Bifidobacterium*, estão o ácido acético e o ácido láctico, que em quantidades suficientes, podem inibir o crescimento de microrganismos sensíveis à redução de pH (GOTTSCHALK, 1986).

Em estudos prévios sobre a sensibilidade bacteriana à redução de pH, o ácido clorídrico apresentou menor efeito inibitório, em mesmo pH, comparado à ação de ácido acético sobre espécies de *Salmonella* e à ação de ácido láctico sobre *E. coli* entero-hemorrágica (FRANCO & LANDGRAF, 2002; GLASS et al., 1992).

Pesquisas sobre a susceptibilidade de espécies de *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Proteus* à substâncias antimicrobianas ocorrem em menor frequência. No entanto, estes microrganismos são comumente associados à deterioração de alimentos. Os gêneros *Citrobacter* e *Enterobacter*, pertencentes aos grupo coliformes, também são importantes indicadores de qualidade e segurança alimentar (FRANCO & LANDGRAF, 2002).

3 CONCLUSÃO

A cultura de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bi-07 apresentou atividade antagonística sobre o crescimento dos microrganismos utilizados como indicadores neste trabalho.

Os resultados obtidos ampliam as vantagens da utilização industrial de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* em alimentos, e possibilitam a continuação de estudos relacionados visando à pesquisa de substâncias antagonísticas produzidas por *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* e à susceptibilidade de microrganismos patogênicos e deteriorantes à estas substâncias.

REFERÊNCIAS

- DE MARTINIS, E. C. P.; ALVES, V. F.; FRANCO, B. D. G. M. Bioconservação de alimentos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, v. 29, p. 114-119, 2002.
- DE ROISSART, H. & LUQUET, F. M. *Bactéries Lactiques*. vol. 1. Uriage, France: Lorica, 1994.
- ELMER, G. W.; SURAWICZ, C. M.; MCFARLAND, L. V. Biotherapeutic agents: A neglected modality for the treatment and prevention of selected intestinal and vaginal infections. *J Am Med Assoc*, v. 275, p. 870-876, 1996.
- FAO/WHO. *Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria*. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report, 2001.
- FRANCO, B. D. G. M. & LANDGRAF, M. *Microbiologia dos Alimentos*. Porto Alegre: Atheneu, 2002.
- GIBSON, G. R. & WANG, W. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *J Appl Bacteriol*, v. 77 p. 412-420, 1994.
- GLASS, K. A.; LOEFFELHOLZ, J. M.; FORD, J. P; et al. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 as affected by pH or sodium chloride and in fermented dry sausage. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 58, p. 2513-2516, 1992.
- GOTTSCHALK, G. *Bacterial metabolism*. 2nd ed. New York: Springer, 1986.
- HELANDER, I. M.; VON WRIGHT, A.; MATTILA-SANDHOLM, T. M. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against gram-negative. *Trends in Food Science and Technology*, v. 8, p. 146-150, 1997.
- KAILASAPATHY, K. & CHIN, J. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Immunol Cell Biol*, 78, p. 80-88, 2000.

LEVY, S. B. Playing antibiotic pool: time to tally the score. *New Engl J Med*, v. 311, p. 663-665, 1984.

LEWUS, C. B. & MONTVILLE, T. J. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *J. Microbiol. Methods*, v. 13, p. 145-150, 1991.

REID, G. The scientific basis for Probiotic strains of *Lactobacillus*. *Appl Environ Microbiol* v. 65, p. 3763-3766, 1999.

ROLFE, R. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *J Nutr*, v. 13, p. 396-402, 2000.

O'SULLIVAN, G. C. Probiotics. *Brit J Surg*, v. 88, p. 161-162, 2001.

SORUM, H. & SUNDE, M. Resistance to antibiotics in the normal flora of animals. *Vet Res*, v. 32, p. 227-241, 2001.