

Área: Ciência de Alimentos

ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS DE QUEIJOS ARTESANAIS E ANTAGONISMO FRENTE A *Staphylococcus aureus*

Fábio José Mattei¹, Flávia Liége Schütz Voloski², Daniel Borges Sávio², Mauricéia Greici de Oliveira¹, Tatiane Kuka Valente Gandra¹, Ângela Maria Fiorentini¹,
Wladimir Padilha da Silva¹

¹ Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

² Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Departamento de Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

*E-mail: fbmattei2003@yahoo.com.br

RESUMO – A produção artesanal de queijos é uma atividade que perdura, mesmo frente aos processos industriais. Estes queijos, mesmo sem a adição de culturas iniciadoras, podem conter bactérias ácido lácticas (BAL), as quais podem produzir alterações desejáveis em características sensoriais e possuir antagonismo frente a micro-organismos patogênicos. Este trabalho objetivou o isolamento de BAL de queijos artesanais e a verificação de antagonismo frente a *Staphylococcus aureus*. Foram adquiridas 4 amostras de queijos de produção artesanal em feiras locais, a partir dos quais foi realizada o isolamento de BAL. De cada amostra foram selecionadas 5 colônias e caracterizadas quanto à morfologia e prova da catalase, para a identificação presuntiva como BAL. As colônias que apresentaram características típicas de BAL foram submetidas ao teste de antagonismo frente a *Staphylococcus aureus* através do método “Spot-on-the-lawn”. Apenas dois isolados não foram classificados como BAL, totalizando 18 isolados característicos (90%). Destes, apenas um não apresentou antagonismo, enquanto os 17 restantes apresentaram halos de inibição variando entre 12 e 35 mm, caracterizando um antagonismo médio/alto. Com isso, pode-se inferir que BAL isoladas de queijos artesanais apresentam potencial para uso como culturas iniciadoras, podendo contribuir com uma maior uniformidade das características sensoriais, além de garantirem a saúde do consumidor através da inibição de patógenos de origem alimentar associados a estes produtos.

Palavras-chave: *Spot-on-the-lawn*, Bactérias ácido lácticas, Antagonismo, Bactérias patogênicas.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, apesar da intensa modernização dos processos de produção de alimentos, as práticas tradicionais de fabricação de produtos artesanais ainda perduram.

No Estado do Rio Grande do Sul, a produção artesanal de queijos ainda é elevada. A preferência por este tipo de produto é justificada pelos consumidores por possuir melhores características sensoriais, como sabor e aroma, quando comparados com outros queijos produzidos industrialmente. Segundo Funck et al. (2011), os processos necessários à produção de queijos artesanais são transferidos verbalmente de geração para geração e não são padronizados, porém todos utilizam leite cru como matéria-prima, o qual possui uma microbiota variada, que inclui bactérias ácido lácticas (BAL) responsáveis pela fermentação espontânea do produto (ALEXANDRE et al., 2002).

As BAL contribuem com o desenvolvimento de características sensoriais desejáveis nos produtos, devido à atividade proteolítica e lipolítica, bem como com a conservação do valor nutritivo da matéria-prima (MAGRO et al., 2000). Outra característica importante dessas bactérias é a atividade antagonista, pela produção de ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, diacetil, metabólitos de oxigênio, entre outros (JUVEN; SCHYED; LINDNER, 1992), frente a micro-organismos patogênicos e deteriorantes, como *Staphylococcus* spp., *Listeria* spp., *Salmonella* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. e bactérias do grupo coliforme (ALEXANDRE et al., 2002).

Para detectar e quantificar a atividade antimicrobiana existem diversas técnicas. Dentre as pesquisadas encontram-se ensaio de difusão em poços (LEWUS; KAISER; MONTVILLE, 1991), ensaio de difusão em disco (PULUSANI et al., 1979) e o método “spot on the lawn” (LEWUS; KAISER; MONTVILLE, 1991), entre outros. Algumas dessas técnicas são baseadas na diluição do agente microbiano em caldo, enquanto a maioria se baseia na difusão destes agentes em culturas semeadas em ágar sólido ou semi-sólido, com inibição de crescimento de organismos sensíveis.

Staphylococcus aureus é um micro-organismo amplamente pesquisado em alimentos, pois sua presença está associada a práticas de higiene e manipulação inadequadas, podendo causar intoxicação alimentar pela produção de enterotoxina (PINTO; GUIMARÃES, 2001).

Dentro deste contexto, o objetivo do presente estudo foi isolar bactérias lácticas (BAL) de amostras de queijos artesanais comercializados na cidade de Pelotas – RS, e testar sua atividade antagonista frente a *Staphylococcus aureus*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Quatro amostras de queijos produzidos artesanalmente e comercializados em feiras livres da cidade de Pelotas – RS foram adquiridas entre os anos de 2011 e 2012 (duas em cada ano). As amostras foram acondicionadas sob refrigeração e encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas (DCTA/FAEM/UFPel).

Para o isolamento de bactérias ácido lácticas nas amostras de queijo, foi seguido o protocolo proposto por Silva et al. (2010), onde 25 g de cada amostra foi homogeneizada com 225 mL de água peptonada (diluição 10^{-1}), tendo sido preparadas diluições decimais seriadas até 10^{-5} . De cada diluição foram retiradas alíquotas de 0,1 mL e espalhadas sobre a superfície de placas de Petri contendo ágar De Man Rogosa Sharpe (MRS), as quais

foram incubadas em anaerobiose a 37°C por 48 horas. Após este período de incubação, foram selecionadas, da maior diluição (10^{-5}) de cada amostra, 5 colônias morfológicamente distintas, sendo cada uma destas inoculada separadamente em tubos de ensaio contendo 5 mL de caldo MRS, e, posteriormente, incubadas a 37°C por 24 horas. Após a incubação, de cada tubo de ensaio foram retiradas alíquotas e inoculadas, separadamente, pela técnica de esgotamento, sobre a superfície de placas de Petri contendo agar MRS, a fim de garantir a purificação das colônias. As placas foram incubadas em anaerobiose a 37°C por 48 horas. As colônias isoladas obtidas pela técnica de esgotamento foram espalhadas, separadamente, sobre a superfície de tubos de ensaio contendo ágar MRS inclinado, os quais foram incubados a 37°C por 24 horas. As colônias crescidas sobre o ágar MRS inclinado foram utilizadas para a realização dos testes de coloração de Gram, catalase e determinação das características morfológicas. As cepas identificadas como Gram positivas e que apresentaram ausência da enzima catalase foram avaliadas quanto à atividade antagonista frente ao micro-organismo indicador *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Para isso, através do método “Spot-on-the-lawn” (LEWUS; KAISER; MONTVILLE, 1991) alíquotas de 2 µL de cada cepa foram inoculadas em placas de Petri contendo agar MRS, seguidas de incubação a 37°C por 24h. Decorrido este período, as placas com crescimento em gota receberam uma sobrecamada de, aproximadamente, 10 mL de caldo BHI acrescido de 0,8% de ágar-ágar e inoculado com 10^6 UFC/mL do micro-organismo indicador *S. aureus* ATCC 6538, e foram incubadas em aerobiose a 37°C por 24 horas. A medida dos halos de inibição (em mm) foi realizada com o auxílio de um paquímetro após o período de incubação.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cinco cepas foram selecionadas de cada amostra (totalizando 20 cepas), tendo sido identificadas como A ou B àquelas isoladas no ano de 2011, e C ou D àquelas isoladas em 2012, e analisadas quanto à morfologia, através do método de coloração de Gram, e à ação da enzima catalase na decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio. Com exceção dos isolados A3 e A5, todas as cepas foram caracterizadas como Gram positivas e catalase negativas, sendo classificadas presuntivamente como pertencentes ao grupo das bactérias lácticas e testadas quanto à ação antagonista frente ao micro-organismo indicador *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

A tabela 1 apresenta a morfologia e as características das colônias das cepas de bactérias ácido lácticas isoladas de queijos artesanais nos anos de 2011 e 2012, bem como os halos de inibição (em mm) encontrados no teste de antagonismo.

Tabela 1 – Características das colônias e morfologia das cepas de bactérias ácido lácticas isoladas de queijos artesanais nos anos de 2011 e 2012 e halos de inibição (mm) do teste de antagonismo.

Ano do isolamento	Código do isolado	Características das colônias	Morfologia dos micro-organismos	Halos de inibição (mm)
2011	A1	Branças, redondas, lisas e grandes	Bacilos	30
	A2	Branças, redondas, lisas e grandes	Bacilos	33
	A4	Branças, redondas, lisas e pequenas	Cocos	S/C*
	B1	Branças, redondas, lisas e grandes	Coco-bacilos	27
	B2	Branças, redondas, lisas e grandes	Bacilos	31
	B3	Branças, redondas, lisas e grandes	Bacilos	24
	B4	Branças, redondas, lisas e pequenas	Bacilos	27
	B5	Branças, redondas, lisas e pequenas	Bacilos	35
2012	C1	Branças, redondas, lisas e grandes	Cocos	12
	C2	Branças, redondas, lisas e grandes	Coco-bacilos	13
	C3	Branças, redondas, lisas e grandes	Cocos	22
	C4	Branças, redondas, lisas e grandes	Cocos	15
	C5	Branças, redondas, lisas e grandes	Cocos	20
	D1	Branças, redondas, lisas e grandes	Cocos	25
	D2	Branças, redondas, lisas e grandes	Cocos	17
	D3	Branças, redondas, lisas e grandes	Cocos	15
	D4	Branças, redondas, lisas e grandes	Cocos	17
	D5	Branças, redondas, lisas e grandes	Cocos	15

*S/C: Sem crescimento

Todas as cepas apresentaram colônias características típicas do grupo das bactérias lácticas (brancas, redondas, lisas e grandes), algumas diferindo apenas em relação ao tamanho, como os isolados A4, B4 e B5, cujas colônias apresentaram tamanho inferior às demais.

Quanto à morfologia das colônias, verificou-se uma diferença expressiva entre as amostras das diferentes coletas, com predominância de bacilos (75%) entre os isolados com potencial antagônico na primeira coleta (2011), e predominância de cocos (90%) na segunda coleta (2012).

De acordo com De Vuyst e Vandamme (1994), existem 12 gêneros de BAL considerados válidos: *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Bifidubacterium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* e *Vagococcus*. Destes gêneros, cinco são comumente encontrados em queijos: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus* (BERESFORD et al., 2001; FOX et al., 2000). Observando as morfologias encontradas nos isolados, pode-se inferir a presença do gênero *Lactobacillus* e de pelo menos um dos gêneros cujos micro-organismos apresentam forma de cocos.

Com relação ao teste de antagonismo, com exceção da cepa A4, todas as demais apresentaram formação de halo durante o teste (média dos halos de inibição = 22,2 mm), indicando potencial ação antagonista frente ao micro-organismo indicador *Staphylococcus aureus*.

Sip et al. (2012) testaram a ação antagonista de 800 cepas de bactérias lácticas isoladas a partir de queijo *golka* frente a *Listeria monocytogenes*, e encontraram 284 isolados ativos contra este micro-organismo. Destes, 83% apresentaram zonas de inibição variando entre 10 e 22 mm, o que, segundo os autores, é considerado um antagonismo médio/alto.

Com o objetivo de caracterizar a microbiota de queijo minas frescal, Ortolani (2009) observou altas frequências de amostras contendo BAL com atividade antagonista frente a *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, não tendo sido encontrada, porém, atividade antagonista frente a *S. Typhimurium*. De acordo com o estudo, 11% das amostras apresentaram atividade antagonista frente a *L. monocytogenes* e 2% contra *S. aureus*, sugerindo uma maior ação inibitória de BAL sobre patógenos Gram-positivos.

As bactérias lácticas responsáveis pela fermentação de inúmeros produtos alimentícios podem ser capazes de inibir ou reduzir a contaminação por micro-organismos deteriorantes e patogênicos. Isto se deve à produção de ácidos e vários outros agentes antimicrobianos, como diacetil, dióxido de carbono, peróxido, etanol e bacteriocinas (HELANDER et al., 1997).

4 CONCLUSÃO

Foi possível isolar bactérias lácticas das amostras de queijos artesanais, e estas apresentaram expressiva atividade antagonista frente a *S. aureus*. Com isso, pode-se inferir que BAL isoladas de queijos artesanais apresentam potencial para uso como culturas iniciadoras, podendo contribuir com uma maior uniformidade das características sensoriais, além de garantirem a saúde do consumidor através da inibição de patógenos de origem alimentar associados a estes produtos.

5 REFERÊNCIAS

- ALEXANDRE, D. P.; SILVA, M. R.; SOUZA, M. R.; SANTOS, W. L. M.. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo-de-minas artesanal do Serro (MG) frente a microrganismos indicadores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n. 4, p. 424-428, 2002.
- BERESFORD, T. P.; FITZSIMONS, N. A.; BRENNAN, N. L.; COGAN, T. M. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 4-7, p. 259-274, 2001.
- CASTELLANO, P.; BELFIORE, C.; FADDA, S.; VIGNOLO, G. A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. **Meat Science**, v. 79, p. 483-499, 2008.
- DE VUYST, L.; VANDAMME, E. J. Bacteriocins of lactic acid bacteria. **Microbiology, Genetics and Application**, p. 1-12, 1994.

- FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; McSWEENEY, P. L. H. Fundamentals of cheese science. **Gaithersburg: Aspen Publishers**, Cap. 5. p. 54-97, 2000.
- 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, n. 5, p. 146-150, 1997.
- FUNCK, G. D.; HERMANN, G.; VICENZI, R.; RICHARDS, N.; SILVA, W. P.; FIORENTINI, A. M.; 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*. In: XIII ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO. Pelotas, 2011.
- JUVEN, B.J.; SCHVED F.; LINDNER, P. Antagonistic compounds produced by a chicken intestinal strain of *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Food Protection**, v.55, p. 157-161, 1992.
- LEWIS, C. B.; KAISER, A.; MONTVILLE, T. J. Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. **Applied Environmental Microbiology**, v. 57(6), p. 1683-1688, 1991.
- MAGRO, M. L. M.; CORBACHO, J. M. M.; SORRIBES, C. H.. Las bacteriocinas de las bacterias lácticas 1: Definición, clasificación, caracterización y métodos de detección. **Alimentaria**, v.37, p.59-66, 2000.
- NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BARROS, M. A. F.; ORTOLANI, M. B. T.; BELOTI, V.; FRANCO, B. D. G. M. *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in Raw Milk Produced in Brazil: Occurrence and Interference of Indigenous Microbiota in their Isolation and Development. **Zoonoses Public Health**, v. 55, p. 299-305, 2008.
- ORTOLANI, M. B. T. Bactérias ácido láticas autóctones de leite cru e queijo minas frescal: Isolamento de culturas bacteriocinogênicas, caracterização da atividade antagonista e identificação molecular. Dissertação (Magister Scientiae) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.
- PINTO, A. L.; GUIMARÃES, J. A. A. Microbiologia de queijo tipo minas frescal produzido artesanalmente. **Ciência Rural**, v. 31, p. 1063-1067, 2001.
- PULUSANI, S. R.; RAO, D. R.; SUNKI, G. R. Antimicrobial activity of lactic cultures: partial purification and characterization of antimicrobial compound(s) produced by *Streptococcus thermophilus*. **Journal of Food Science**, v. 44, p. 575-578, 1979.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 4 ed. São Paulo: Varela, 2010. 296p.
- SIP, A.; WIECKOWICZ, M.; OLEJNIK-SCHMIDT, A.; GRAJEK, W. Anti-*Listeria* activity of lactic acid bacteria isolated from golka, a regional cheese produced in Poland. **Food Control**, v. 26, p. 117-124, 2012.