

ISOLAMENTO DE BACTÉRIA DE QUEIJO MINAS FRESCAL PRODUTORA DE ANTIMICROBIANO

Walter L. C. CLOSS^{1*}; Giselle A. N. COSTA¹; Karla B. GUERGOLETT¹.

walter.candido.closs@uel.br*, karla@uel.br

¹Universidade Estadual de Londrina

Resumo

Os peptídeos antimicrobianos têm ganhado destaque como biopreservantes, principalmente produzido por bactérias ácido lácticas (BAL). As matrizes lácteas são conhecidas por englobarem esses microrganismos, mas também por ocorrerem infecções e contaminações por bactérias patogênicas como *Listeria monocytogenes*. O queijo Minas Frescal é muito produzido e consumido no Brasil, além de ter um baixo custo e simplicidade tecnológica, neste sentido, o trabalho utilizou amostras de queijo Minas Frescal comprados em feiras livres e isolou BAL a procura de potenciais produtoras de bacteriocinas. Foi analisada a atividade antimicrobiana da(s) bacteriocina(s) encontrada(s) contra os seguintes microrganismos: *Salmonella entérica* sorovar Enteritidis ATCC 1306, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* Scott A, *Listeria innocua* 12612 e *Listeria ivanovii* 7842.

Palavras-chave: antagonismo, bacteriocina, produto lácteo.

Introdução

O queijo Minas Frescal é caracterizado por ser fresco e obtido pela coagulação enzimática de renina e outras enzimas em leite pasteurizado bovino, com ou sem a adição de bactérias ácido lácticas. Possui alta atividade de água, baixo percentual de sal e pH em torno de 5.1 a 5.6. Sendo produzido por grandes e pequenas indústrias (Souza; Saad, 2009; Barancelli *et al.*, 2011).

Produtos de origem láctea são matrizes que comumente englobam diversos tipos de bactérias, dentre elas as BAL. *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactocaseibacillus*, *Latilactobacillus*, *Lactococcus* e *Enterococcus* são facilmente encontrados em leite e derivados. Várias espécies desses gêneros podem produzir bacteriocinas, peptídeos ribossomicamente produzidos, que são altamente visadas como bioconservantes em alimentos, pois podem ser agentes microbiostáticos ou microbicidas contra diversos microrganismos, como *Listeria* sp. (Bromberg *et al.*, 2004; Parada *et al.*, 2007; Martin *et al.*, 2022).

Com a necessidade de proteger o alimento destes patógenos e de se utilizar compostos de origem natural a conservadores químicos, biopreservantes como as bacteriocinas são um caminho interessante a ser pesquisado. Diversos estudos relatam a eficiência dos peptídeos antimicrobianos contra patógeno e deteriorantes (Arshad; Batool, 2017; Manigandan *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2022).

Material e Métodos

Foram utilizados 10 queijos Minas Frescal comprados em feiras livres e para o isolamento foram coletadas 25 g de cada amostra, retirando-se porções de várias partes do queijo a fim de se obter uma amostragem adequada. Foram adicionados 225 mL de água peptonada 0,1% (p/v), realizando a homogeneização por dois minutos em *Stomacher* (Ethik Technology, Brasil). Foram executadas diluições seriadas até a diluição 10^{-6} . Foi semeado um volume de 1 mL de cada diluição em profundidade em ágar De Man Rogosa e Sharpe (MRS). As placas foram incubadas a 37°C por até 72 horas em jarras de anaerobiose.

Para o teste de difusão em poços, foi obtido o sobrenadante livre de células, CFS (*cell-free supernatant*) por meio do cultivo de cada colônia isolada em caldo MRS a 37°C por 24 horas. Transferiu-se o CFS para tubos de centrifuga e realizou-se a centrifugação em 8000 rpm por 15 minutos. O pH do sobrenadante foi ajustado em 6,5 com 1M de NaOH e esterilizado por filtração com membrana de 0,2 µm. Foi realizado um pré-inóculo em Ágar BHI com concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL contendo os seguintes microrganismos indicadores: *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* serovar Enteritidis ATCC 13076, *Listeria monocytogenes* Scott A, *Listeria ivanovii*, *Listeria innocua* e *Listeria monocytogenes* 4561. Poços de cerca de 6mm foram feitos e 100 µL de CFS foram adicionados. As placas foram mantidas a temperatura ambiente para a completa difusão e, posteriormente, foram incubadas a 37°C/24h (Ahn; Kim; Kim, 2017; Afrin *et al.*, 2021).

Resultado e Discussões

Foram isoladas 35 bactérias que apresentaram coloração Gram-positiva e catalase negativa. Com os isolados, foi realizado o ensaio de difusão em poços utilizando-se o CFS. Embora tenham sido avaliados mais microrganismos indicadores, na análise, apenas um isolado, identificado como 3B, demonstrou produção de peptídeo com atividade inibitória, apresentando inibição somente contra três espécies de *Listeria* (Tabela 1).

Tabela 01 -Ensaio de Difusão em Poços

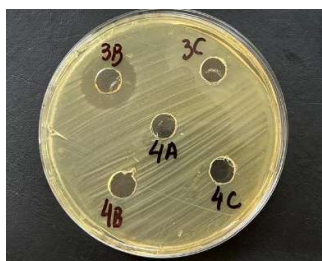
Bactérias Indicadoras	Zona de Inibição (mm)
Escherichia coli ATCC 25922	-
Salmonella entérica serovar Enteritidis ATCC 13076	-
Staphylococcus aureus ATCC 25923	-
Listeria monocytogenes Scott A	13
Listeria ivanovii 7842	16
Listeria innocua 12612	16

A *Listeria* é um microrganismo ubiqüitário encontrado em diversos lugares no meio ambiente, geralmente pode ser encontrada em produtos de origem animal, como leite e derivados, principalmente ligado à condições de mau processamento e sanitização.

Zafar e colaboradores (2022) realizaram o rastreio por bacteriocinas produzidas por *Bifidocaterium*, as quais produziram peptídeos capazes de agir contra *Listeria monocytogenes*. Já nos ensaios realizados por Ahn e colaboradores (2017), foi utilizada *Listeria innocua* ATCC 33090 e não houve inibição utilizando-se o CFS no teste de difusão em poços.

As bacteriocinas da subclasse IIa são pequenos peptídeos com atividade inibitória fortemente contra espécies de *Listeria*. Poderia se sugerir que o peptídeo encontrado seja da subclasse IIA, a partir dos resultados, já que houve apenas inibição contra as três espécies avaliadas (Mokoena, 2017).

Figura 1 - Ensaio de difusão em poços utilizando *Listeria innocua*



Conclusões

Com o ensaio de difusão em poços, foi possível verificar que apenas 1 isolado (3B) foi responsável por produzir um peptídeo com atividade antimicrobiana. Foi observada inibição contra *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* e *Listeria ivanovii*.

Referências

AFRIN, S.; HOQUE, M. A.; SARKER, A. K.; SATTER, M. A.; BHUIYAN, M. N. I. Characterization and profiling of bacteriocin-like substances produced by lactic acid bacteria from cheese samples. **Access Microbiology**. 2021.

AHN, H.; KIM, J.; KIM, W. J. Isolation and characterization of bacteriocin-producing *Pediococcus acidilactici* HW01 from malt and its potential to control beer spoilage lactic acid bacteria. **Food Control**. 2017.

ARSHAD, M. S.; BATOOL, S. A. Natural antimicrobials, their sources and food safety. **Food Additives**, 88–89. 2017.

BARANCELLI, G.V., CAMARGO, T.M., REIS, C.M.F., PORTO, E., HOFER, E., OLIVEIRA, C.A.F. Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese manufacturing plants from Northeast region of Sao Paulo, Brazil. **Journal of Food Protection**. 2011.

BROMBERG, R.; MORENO, I.; ZAGANINI, C.L.; DELBONI, R.R.; OLIVEIRA, J. Isolation of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from meat and meat products and its spectrum of inhibitory activity. **Braz. J. Microbiol.** 35, 137-144. 2004.

MANIGANDAN, V., KARTHIK, R., RAMACHANDRAN, S., & RAJAGOPAL, S. Chitosan application in food industry. In A. M. Grumezescu, & A. M. Holban (Eds.), **Biopolymers for food design**. pp. 469–491. 2018.

MARTIN, I.; RODRÍGUEZ, A.; ALÍA, A.; MARTÍNEZ, R.; C´ORDOBA, J. J. Selection and characterization of lactic acid bacteria with activity Against *Listeria Monocytogenes* from traditional RTE ripened foods. **LWT**. 2022.

MOKOENA, M.P. Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: a mini-review. **Molecules**. 2017.

PARADA, J.L.; CARON, C.R.; MEDEIROS, A.B.P.; Soccol, C.R. Bacteriocins from lactic acid bacteria: Purification, properties and use as biopreservatives. **Braz. Arch. Biol. Technol.** 2007.

SOUZA, C.H.B.; SAAD, S.M.I. Viability of *Lactobacillus acidophilus* La-5 added solely or in co-culture with a yoghurt starter culture and implications on physicochemical and related properties of Minas fresh cheese during storage. **LWT - Food Science and Technology**. 2009.

ZAFAR, M.; ALAM, S.; SABIR, M.; SABA, N.; DIN, A.U.; AHMAD, R.; KAHN, M.R.; MUHAMMAD, A.; DAYISOYLU, K.S. Isolation, characterization, bacteriocin production and biological potential of *Bifidobacteria* of ruminants. **Analytical Biochemistry**. 2022.

ZHOU, J., GU, Q., SHEN, Y., HARIDINTWALI, J. D., YANG, W., ZOU, S., et al. Enhancement of the performance of the GH75 family chitosanases by fusing a carbohydrate binding module and insights into their substrate binding mechanisms. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**. 2022.

AGRADECIMENTOS: Agradeço à Universidade Estadual de Londrina (UEL) em que se situa o programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos o qual faço parte. À Fundação Oswald Cruz (Fiocruz) pela concessão das espécies de *Listeria* e ao Conselho Nacional Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de mestrado.



Ciência, Tecnologia e Inovação para o Paraná



NIGEP

Núcleo Interdisciplinar de Gestão Pública



Laboratório de Análise de Alimentos

