

Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a microrganismos indicadores

[Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from artisanal and industrial "coalho" cheese against indicator microorganisms]

L.G. Guedes Neto¹, M.R. Souza^{1*}, A.C. Nunes², J.R. Nicoli², W.L.M. Santos¹

¹Escola de Veterinária da UFMG

Caixa Postal 567

30123-970 – Belo Horizonte, MG

²Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

RESUMO

Quatro cepas de *Lactobacillus* spp. e duas cepas de *Lactococcus* spp. isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial foram testadas quanto às suas atividades antimicrobianas. Observou-se atividade antagonista dessas bactérias ácido-lácticas frente a elas, a outras bactérias ácido-lácticas isoladas de queijo de coalho, aos patógenos isolados dos mesmos queijos e a cepas de patógenos de referência. Verificou-se diferença ($P < 0,05$) entre as atividades antagonistas, exceto quando as próprias bactérias ácido-lácticas foram utilizadas como reveladoras. *Lactobacillus* spp. apresentaram as atividades antagonistas mais potentes.

Palavras-chave: bactérias ácido-lácticas, queijo de coalho, atividade antagonista.

ABSTRACT

Four strains of *Lactobacillus* spp. and two strains of *Lactococcus* spp. were isolated from artisanal and industrial "coalho" cheese and tested for inhibitory activity. It was observed antagonistic activity of the lactic acid bacteria against themselves and other lactic acid bacteria and pathogens isolated from the same cheese samples, as well as against pathogenic strains from other sources. Significant difference ($P < 0.05$) was observed among the antagonistic activities, except when lactic acid bacteria were used as indicator. From the tested bacteria, *Lactobacillus* spp. showed the strongest antagonistic activity.

Keywords: lactic acid bacteria, "coalho" cheese, antagonistic activity

INTRODUÇÃO

Entre os microrganismos presentes nos diversos tipos de queijos, encontram-se as bactérias ácido-lácticas (BAL). O grupo das BAL compreende 11 gêneros de bactérias Gram positivo: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* *Vagococcus* e *Weissella* (Mogensen et al., 2003).

As BAL estão amplamente distribuídas na natureza, particularmente no leite. Elas são também habitantes dos tratos digestivo, respiratório superior e urogenital inferior dos animais (Hove et al., 1999). O grupo inclui bastonetes e cocos não esporulados, aeróbios, microaerófilos ou anaeróbios facultativos. A maioria delas é inativada a temperaturas superiores a 70°C. Bactérias lácticas que utilizam, preferencialmente, a lactose como fonte de carbono são homofermentativas ou

Recebido para publicação em 19 de abril de 2004.

Recebido para publicação, após modificações, em 19 de outubro de 2004.

(*) Autor para correspondência (corresponding author).

E-mail: lguedesneto@yahoo.com.br

heterofermentativas (Salminen e Von Wright, 1993).

Existem várias substâncias antimicrobianas que podem ser produzidas por bactérias Gram positivo, incluindo as BAL. Podem ser citadas: ácidos orgânicos (como ácido láctico), peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, diacetil, acetaldeído e substâncias antimicrobianas de natureza protéica, denominadas bacteriocinas (Naidu et al., 1999).

A ação antagonista de espécies de BAL contra microrganismos indesejáveis em alimentos tem sido descrita em vários trabalhos. Muitas BAL isoladas de leite e queijos apresentaram poder de inibição frente a patógenos e deteriorantes, como *Staphylococcus* spp., *Listeria* spp., *Salmonella* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. e bactérias do grupo coliforme (Vaughan et al., 1994; Breashers e Durre, 1999; Uraz et al., 2001; Alexandre, 2002; Caridi, 2003). Esses trabalhos mostraram a importância do uso desses microrganismos para a preservação de alimentos e para o controle de patógenos. Essa aplicação pode ser importante para o queijo de coalho. Pesquisas realizadas com esse alimento têm demonstrado a presença de microrganismos potencialmente patogênicos, como é o caso de *Staphylococcus* spp. (Sena, 2000).

O presente trabalho teve como objetivo testar as atividades antagonistas “in vitro” de BAL isoladas de queijo de coalho artesanal e industrial frente aos microrganismos desejáveis e indesejáveis.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas quatro espécies de *Lactobacillus* spp. (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. fermentum* e *L. rhamnosus*), duas espécies de *Lactococcus* spp. (*L. lactis* e *L. raffinolactis*), duas cepas de *Streptococcus thermophilus* (*S. thermophilus* AB1MRS e *S. thermophilus* BL1MRS), três cepas de *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis* AQ2MRS, *E. faecalis* CM4MRS e *E. faecalis* LV1MRS), uma cepa de *Weissella confusa*, três espécies de *Staphylococcus* spp. (*S. aureus*, *S. cohnii* e *S. intermedius*) e uma cepa de *Escherichia coli* (*E. coli* CM2M17). Esses

microrganismos foram isolados de seis amostras de queijo de coalho, sendo quatro amostras de queijo artesanal e duas de queijo industrial. Duas amostras de queijo artesanal foram coletadas nas próprias unidades produtoras no estado de Pernambuco e as outras duas, coletadas no comércio varejista de Recife. As duas amostras de queijo industrial foram coletadas nas unidades produtoras do estado de Pernambuco. As BAL foram isoladas em ágar MRS em câmara anaeróbica¹ (atmosfera de 80% de N₂, 10% de H₂ e 5% de CO₂) e ágar M17 sob aerobiose (IDF, 1983), sendo posteriormente identificadas pelo sequenciamento da região intergênica 16S-23S do DNA ribossomal (rDNA) (Tannock et al., 1999). Para a realização do sequenciamento, o DNA total dos microrganismos foi extraído e submetido a uma reação de polimerização em cadeia (PCR) para amplificação da região intergênica 16S-23S rDNA. O produto da PCR, 16S-23S rDNA, foi então sequenciado em máquina MegaBACE DNA Analysis Systems², em combinação com o sistema de sequenciamento automatizado MegaBACE 100. Os resultados dessa análise (seqüência de pares de base dos DNAs) foram comparados com as seqüências existentes no banco de dados de DNA, utilizando o algoritmo BLAST (Altschul et al., 1990), para confirmação das espécies de BAL, isoladas dos queijos de coalho. *E. coli* foi isolada do meio M17, sob aerobiose, e identificada com a mesma metodologia proposta para as BAL. *Staphylococcus* spp. foram isolados e identificados pelo perfil bioquímico de acordo com técnica proposta por Carmo et al. (2002).

Para a realização dos testes de antagonismo, as quatro espécies de *Lactobacillus* spp. e as duas espécies de *Lactococcus* spp. foram definidas como as culturas produtoras, ou seja, aquelas a serem testadas quanto à capacidade antagonista frente a outros microrganismos, denominados de culturas reveladoras. Foram utilizadas como culturas reveladoras as espécies de *Lactobacillus* spp. e *Lactococcus* spp., utilizadas como produtoras, as cepas de *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecalis*, *Weissella confusa*, *E. coli*, *Staphylococcus* spp. e cepas de patógenos de referência (*Bacillus cereus*; *Staphylococcus aureus* ATCC29213; *Salmonella enterica* sorovar typhimurium ATCC12228;

¹ Forma Scientific Company – Marietta, OH, EUA

² Amersham Biosciences – Salt Lake City, UT, EUA

Yersinia enterocolitica; *Listeria monocytogenes* ATCC15313; *Salmonella enterica* sorovar typhi ATCC14028; *Shigella flexneri*; *Pseudomonas aeruginosa* e *E. coli* ATCC25723), gentilmente cedidas pelo professor Jacques Robert Nicoli, do Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Para o cultivo das BAL, foram utilizados caldos MRS e M17, incubando-se a 37°C, durante 24 horas, sob anaerobiose e aerobiose, respectivamente. As cepas de patógenos de referência, *Staphylococcus* spp. e *E. coli* CM2M17 foram incubadas em caldo *brain-heart infusion* (BHI), a 37°C, durante 24 horas, sob aerobiose. Após o crescimento dos *Lactobacillus* spp. e *Lactococcus* spp., 5µl de cada cultivo de microrganismo foram colocados sobre a superfície de uma placa de Petri, contendo ágar MRS ou ágar M17, e incubados, respectivamente, sob anaerobiose ou aerobiose a 37°C, durante 48 horas. Após esse período, as placas foram retiradas da câmara de anaerobiose, colocando-se nas suas tampas 1ml de clorofórmio, deixando-o agir por 30 minutos em temperatura ambiente para eliminar os microrganismos e permanecer apenas as substâncias inibidoras. A seguir, foram colocados 3,5ml de ágar semi-sólido, contendo as bactérias reveladoras (BAL, *Staphylococcus* spp., *E. coli* CM2M17 e cepas patogênicas de referência), recém-cultivadas em caldos MRS, M17 e BHI. As placas contendo as cepas reveladoras foram incubadas a 37°C, durante 24 horas, sob aerobiose ou anaerobiose, dependendo da característica de cultivo da amostra reveladora. A simples presença de um halo de inibição, independente do diâmetro, é indicativo do antagonismo. O teste de antagonismo e a leitura dos halos de inibição foram feitos de acordo com metodologia proposta por Tagg et al. (1976). A medida do halo foi feita com paquímetro digital³.

Os resultados foram submetidos à análise estatística descritiva e não paramétrica. A comparação entre as médias dos tratamentos foi feita pelo teste Kruskal-Wallis, utilizando o programa SAEG 7.0 (Sistema..., 1995).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As culturas reveladoras *L. fermentum*, *S. thermophilus* BL1MRS e *L. acidophilus* não foram inibidas por nenhuma cultura produtora de substância(s) antagonista(s). Essa característica seria desejável para a sobrevivência desses microrganismos em ambientes que apresentam microbiota diversificada e complexa, como é o caso dos queijos.

Não houve diferença ($P>0,05$) entre as atividades antagonistas das culturas produtoras frente às BAL reveladoras (Tab. 1).

Para a seleção de BAL, isoladas com a finalidade de compor culturas que poderiam melhorar a qualidade sanitária de queijo de coalho, o ideal seria que elas não interferissem na atividade de outras BAL desejáveis. Embora tenha ocorrido antagonismo entre as BAL testadas, e, portanto, interferência na sua atividade, não houve diferença significativa entre médias e nos níveis de interferência. Dessa forma, qualquer uma das culturas de *Lactobacillus* spp. e *Lactococcus* spp. poderia ser utilizada com a finalidade de melhorar a qualidade sanitária do produto.

Todos os *Lactobacillus* spp. testados foram capazes de inibir as cepas de *Staphylococcus* spp. e *E. coli* CM2M17 isoladas das mesmas amostras de queijo de coalho (Tab. 2). *L. raffinolactis* não apresentou nenhum tipo de antagonismo frente a esses indicadores. Portanto, *Lactobacillus* spp. apresentaram melhor potencial de inibição do que *Lactococcus* spp., quando testados frente a esses patógenos. Isto foi confirmado pela avaliação das atividades antagonistas de *L. casei* e *L. rhamnosus*, superiores ($P<0,05$) às de *L. lactis* e *L. raffinolactis*. Os resultados mostram melhor potencial de utilização desses *Lactobacillus* spp. para melhorar a qualidade do queijo de coalho, em relação ao controle do desenvolvimento de bactérias indesejáveis nele isoladas. Isto é relevante, pois *Staphylococcus* é o principal patógeno encontrado nesse alimento (Sena, 2000).

³ Mitutoyo Digimatic Caliper, Mitutoyo Sul Americana Ltda – Suzano, SP, Brasil

Tabela 1. Atividade antagonista (diâmetro dos halos de inibição em mm) de *Lactobacillus* spp. e *Lactococcus* spp. isolados de queijo de coalho frente a essas culturas e a outras culturas de bactérias ácido-láticas isoladas dos mesmos queijos

Reveladora	Produtora					
	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactococcus raffinolactis</i>
<i>Streptococcus thermophilus</i> ABI MRS	30,75	33,73	51,70	16,65	19,72	0
<i>Lactobacillus casei</i>	-	0	19,14	0	0	0
<i>Lactobacillus fermentum</i>	0	-	0	0	0	0
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	22,58	17,07	-	0	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i> AQ2MRS	9,77	0	13,95	53,72	0	0
<i>Streptococcus thermophilus</i> BL1MRS	0	0	0	0	0	0
<i>Weissella confusa</i>	24,05	0	33,22	0	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i> CM4MRS	41,92	33,00	37,17	27,87	21,00	0
<i>Enterococcus faecalis</i> LV1MRS	33,08	38,62	39,07	17,78	17,49	27,98
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	0	0	0	-	0	0
<i>Lactococcus raffinolactis</i>	25,10	23,20	22,27	28,50	18,72	0
<i>Lactococcus lactis</i>	0	0	0	21,40	-	23,31
Média ^a	15,60	12,13	18,04	13,82	6,41	5,03

^a Não houve diferença entre as médias (P<0,05).

Tabela 2. Atividade antagonista (diâmetro dos halos de inibição em mm) de *Lactobacillus* spp. e *Lactococcus* spp. isolados de queijo de coalho frente a *Staphylococcus* spp. e *Escherichia coli* isolados dos mesmos queijos

Reveladora	Produtora					
	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactococcus raffinolactis</i>
<i>Escherichia coli</i> CM2M17	36,62	29,27	34,70	27,23	0	0
<i>Staphylococcus cohnii</i>	33,82	27,14	40,31	28,90	0	0
<i>Staphylococcus intermedius</i>	43,38	29,07	37,41	30,11	19,41	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	46,64	43,51	45,99	31,86	23,42	0
Média	40,11 ^a	32,24 ^{ab}	39,60 ^a	29,52 ^{ab}	10,70 ^{bc}	0 ^c

Médias seguidas por letras distintas na linha indicam diferenças entre si (P<0,05).

Os resultados das inibições de patógenos de referência pelos microrganismos produtores testados (Tab. 3) demonstraram variação com relação aos diâmetros dos halos de inibição. A única cultura que deixou de inibir algum tipo de bactéria reveladora foi *L. raffinolactis*, que não atuou frente a *S. enterica* sorovar typhimurium,

L. monocytogenes e *E. coli*. Houve diferença significativa entre as atividades antagonistas pesquisadas. *L. casei*, *L. fermentum* e *L. rhamnosus* apresentaram halos de inibição maiores contra as bactérias de referência testadas (P<0,05).

Atividade antimicrobiana de bactérias...

Tabela 3. Atividade antagonista (diâmetro dos halos de inibição em mm) de *Lactobacillus* spp. e *Lactococcus* spp. isolados de queijo de coalho frente a patógenos de referência

Reveladora	Produtora					
	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactococcus raffinolactis</i>
<i>Bacillus cereus</i>	87,25	90,00	90,00	71,64	36,84	32,54
<i>Staphylococcus aureus</i>	51,88	49,54	52,61	33,17	20,16	16,61
<i>Salmonella enterica</i> sorovar typhimurium	45,30	43,40	47,24	30,88	22,93	0
<i>Yersinia enterocolitica</i>	35,33	37,39	46,50	33,73	25,09	43,28
<i>Listeria monocytogenes</i>	35,03	47,07	44,80	39,14	22,81	0
<i>Salmonella enterica</i> sorovar typhi	44,98	41,89	39,87	32,61	26,07	24,09
<i>Shigella flexneri</i>	79,20	84,18	86,22	90,00	63,60	53,62
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	89,12	81,92	86,12	34,65	74,60	41,79
<i>Escherichia coli</i>	54,62	41,17	69,77	28,04	54,87	0
Média	58,07 ^a	57,39 ^a	62,57 ^a	43,76 ^{ab}	38,55 ^{ab}	23,54 ^b

Médias seguidas por letras distintas na linha indicam diferenças entre si (P<0,05)

Considerando todos os tipos de inibição, a análise revelou que a cultura de *L. rhamnosus* foi a que apresentou maior média de halos de inibição frente às BAL (Tab. 1) e frente aos patógenos de referência (Tab. 3), enquanto a cultura de *L. casei* apresentou maior média do halo de inibição frente aos patógenos isolados dos queijos (Tab. 2). *L. raffinolactis* mostrou ser a de menor média de halos de inibição (Tab. 1, 2 e 3). *L. casei* e *L. rhamnosus* foram as espécies que apresentaram as maiores médias dos halos de inibição frente aos patógenos utilizados como reveladores, demonstrando o seu potencial benéfico para melhorar a qualidade sanitária de queijo de coalho.

Resultados semelhantes aos deste trabalho foram anteriormente encontrados por outros autores que também demonstraram atividade antagonista de *Lactobacillus* spp. isolados de queijo artesanal frente a patógenos. Vaughan et al. (1994) verificaram inibição de *S. aureus*, *Listeria innocua* e *Pseudomonas fragi*, e Alexandre et al. (2002) detectaram atividade antagonista contra *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *L. innocua* e *S. enterica* sorovar typhimurium. Do mesmo modo, Breashers e Durre (1999) observaram ação antagonista contra *Salmonella* spp. e *E. coli* O157:H7. Uraz et al. (2001) detectaram inibição frente ao *Bacillus cereus*, e Caridi (2003), antagonismo frente à *E. coli*. Essas observações indicaram interessante perspectiva tecnológica de utilização dessas culturas de BAL para o controle de patógenos, principalmente em queijo artesanal.

O presente trabalho não avaliou a natureza das substâncias antagonistas produzidas pelas

culturas produtoras, porém as atividades inibitórias verificadas justificam-se pela produção de substâncias inibidoras que teriam se difundido pelo ágar e impedido o crescimento das culturas reveladoras. Entre elas, podem ser citadas: ácidos orgânicos (como ácido láctico), peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, diacetil, acetaldeído e substâncias antimicrobianas de natureza protéica, denominadas bacteriocinas (Naidu et al., 1999).

CONCLUSÃO

Entre as espécies de BAL testadas, *Lactobacillus* spp. tem melhor perspectiva de utilização na fabricação de queijo de coalho, visando melhorar a qualidade sanitária do produto, pois apresenta melhor atividade antagonista frente a microrganismos patogênicos de relevância nesse alimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDRE, D.P.; SILVA, M.R.; SOUZA, M.R. et al. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo-de-minas artesanal do Serro (MG) frente a microrganismos indicadores. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.54, p.424-428, 2002.

BRASHEARS, M.M.; DURRE, W.A. Antagonistic action of *Lactobacillus lactis* toward *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 during growth and refrigerated storage. *J. Food Protec.*, v.62, p.1336-1340, 1999.

- CARIDI, A. Ripening and seasonal changes in microbial groups and in physicochemical properties of the ewes' cheese Pecorino del Poro. *Int. Dairy J.*, v.13, p.191-200, 2003.
- CARMO, L.S.; SOUZA DIAS, R.; LINARDI, V.R. et al. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. *Food Microbiol.*, v.19, p.9-14, 2002.
- HOVE, H.; NORGAARD, H.; MORTENSEN, P. B. Lactic acid bacteria and the human gastrointestinal tract. *Europ. J. Clin. Nutr.*, n.53, p.339-350, 1999.
- INTERNATIONAL Dairy Federation. Yogurt: enumerations of characteristic microorganisms count technique at 37°C. *Bull. Int. Dairy Fed.*, n. 117, p. 1-4, 1983.
- MOGENSEN, G.; SALMINEN, S.; O'BRIEN, J. et al. Food microorganisms - health benefits, safety evaluation and strains with documented history of use in foods. *Bull. Int. Dairy Fed.*, n.377, p.4-9, 2003.
- NAIDU, A.S.; BIDLACK, W.R.; CLEMENS, R.A. Probiotic spectra of lactic acid bacteria. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, v. 38, p.13-126, 1999.
- SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A. *Lactic acid bacteria*. New York: Marcel Dekker, 1993. 442p.
- SENA, M.J. *Perfil epidemiológico, resistência a antibióticos e aos conservantes nisina e sistema lactoperoxidase de Staphylococcus sp. isolados de queijos coalho comercializados em Recife - PE*. 2000. 75f. Tese (Doutorado) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- SISTEMA de análises estatísticas e genéticas – SAEG. Viçosa: UFV, 1995.
- TAGG, J.R.; DAJAMI, A.S.; WANNAMAKER, L.W. Bacteriocin of Gram positive bacteria. *Bacteriol. Rev.*, v.40, p.722-756, 1976.
- TANNOCK, G.W.; TILSALA TIMISJARVI, A.; RODTONG, S. et al. Identification of *Lactobacillus* isolates from the gastro-intestinal tract, silage and yoghurt by the 16S-23S rDNA gene intergenic spacer region sequence comparisons. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.65, p.4264-4267, 1999.
- URAZ, G.; SIMSEK, H.; MARAS, Y. The inhibitory effects of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus helveticus* on *Bacillus* species isolated from raw milk in various salt concentrations. *Int. J. Dairy Technol.*, v.54, p.146-150, 2001.
- VAUGHAN, E.E.; CAPLICE, E.; LOONEY, R. Isolation from food sources, of lactic acid bacteria that produced antimicrobials. *J. Appl. Bacteriol.*, v.76, p.118-123, 1994.