
**CARACTERIZAÇÃO, CLASSIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL
PROBIÓTICO E TECNOLÓGICO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS PRODUTORAS DE
BACTERIOCINAS ISOLADAS A PARTIR DE LEITE HUMANO**

JULIANA CARUSI¹; FABIANA K. H. S. TRENTTO²; IZILDINHA MORENO³

Nº 11210

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo caracterizar e identificar bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas (BLPB) com caráter probiótico isoladas de leite humano.

Foram avaliadas as propriedades probióticas das BLPB (tolerância a baixos valores de pH e sais biliares, sensibilidade a antibióticos e capacidade de adesão). Observou-se que as BLPB mantiveram-se viáveis após exposição a pH 3,0 durante 1 hora e também após 4 horas de permanência em 0,3% de sais biliares. O mesmo não foi observado após 24 horas de exposição neste sal, verificando-se declínio da viabilidade celular em torno de 6 Log UFC/mL⁻¹ (com exceção da BLPB 9). Verificou-se, ainda, que as cepas testadas apresentaram resistência aos antibióticos Clindamicina, Tetraciclina e Gentamicina (com exceção da BLPB 7) e, finalmente, capacidade de adesão.

As BLPB foram classificadas presuntivamente como pertencentes ao gênero *Enterococcus* spp. Esta classificação deve-se aos resultados apresentados nos testes bioquímicos clássicos como crescimento a 10 e 45°C, pHs 4,4 e 9,6, e produção de CO₂ a partir da glicose, além de serem gram positivas e catalase negativas. Em seguida, as BLPB foram submetidas à caracterização com auxílio do sistema miniaturizado BBL Crystal para bactérias Gram positivas. Desta forma, 4 isolados foram classificados como pertencentes à espécie *Enterococcus avium* e 2 aos *Enterococcus durans*.

Quanto às propriedades tecnológicas, o odor dos leites inoculados com as BLPB após 30 dias de estocagem foi característico para leite fermentado. Observa-se a formação de um coágulo frágil e manutenção da viabilidade celular em torno de 7 Log UFC/mL⁻¹ e declínio do pH em torno de 0,4.

1. Bolsista CNPq: Graduação em Ciências dos Alimentos, ESALQ/USP, Campinas-SP, ✉ jcarusi@esalq.usp.br

2. Orientador: Pesquisador, TECNOLAT/ITAL, Campinas-SP

3. Colaborador: Pesquisador, TECNOLAT/ITAL, Campinas-SP

ABSTRACT

This work aimed to characterize and identify lactic acid bacterias bacteriocins producers with probiotic characteristics from human milk.

It was evaluated the BLPB capacity of bacteriocin production and the probiotics properties (pathogenic and spoilage bacterias growth inhibition, tolerance to acid pH and bile salts, antibiotics sensibility and adhesion capacity) and observed that they had viability maintained after exposition to pH 3 during 1 and after 4 hours of permanence in 0,3% of bile salts. It was verified that the strains were resistant when exposed to the antibiotics Clindamycin, Tetracycline and Gentamycin. The BLPB 7 was resistant to the antibiotics Clindamycin and Tetracycline. All the BLPB presented adhesion capacity.

The BLPB were classified previously as *Enterococcus* spp. This classification is about the results presented in the classic phenotypic tests (multiplication at 10 and 45°C, pHs 4,4 and 9,6) and production of CO₂ from glucose fermentation. Besides, they were classified as gram positive bacterias and catalase negatives. Then, the BLPB were submitted at characterization using the miniaturized system – BBL Crystal. So, 4 isolated BLPB were characterized as *Enterococcus avium* and 2 as *Enterococcus durans*.

About technological properties, the milk smell inoculated with BLPB was characteristic of fermented milk after 30 days of storage. It was observed a soft texture and cellular viability was maintained around 7 Log UFCmL⁻¹ and a decline of pH around 0,4.

INTRODUÇÃO

O leite humano é um excelente meio de cultura para a multiplicação de microrganismos dos gêneros *Staphylococci*, *Streptococci*, *Corynebacteria*, *Propionibacteria* e bactérias do ácido láctico (BAL) (MACKIE et al., 1999).

As BAL correspondem a um grupo heterogêneo de bactérias Gram-positivas com diferentes características morfológicas, metabólicas, fisiológicas e taxonômicas. A principal função metabólica destas bactérias é produzir ácido láctico como principal produto da fermentação de açúcares, sendo algumas cepas produtoras de bacteriocinas (proteínas biologicamente ativas que apresentam ação antimicrobiana contra determinados microrganismos patogênicos e deteriorantes) e dotadas de propriedades probióticas (culturas puras ou mistas de microrganismos vivos que quando aplicadas aos animais ou ao homem, exercem efeitos benéficos ao hospedeiro) (LERAYER et al., 2010; HAVENAAR, 1992).

As cepas probióticas devem apresentar como características fisiológicas a resistência a antibióticos, tolerância a condições ácidas e sais biliares, e como características tecnológicas a viabilidade celular no processamento e estocagem do

produto, além dos procedimentos de produção de culturas comerciais (VASILJEVIC & SHAH, 2008).

O objetivo do presente estudo foi caracterizar, classificar e verificar o potencial probiótico e tecnológico de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas (BLPB) isoladas a partir de leite humano.

MATERIAL E MÉTODOS

Os materiais utilizados foram: BLPB isoladas de leite humano, kit de identificação BBL Crystal Gram Positive (Becton Dickinson, França) e leite desnatado pasteurizado tipo A suplementado (Saxaelin et al, 1999),

Partindo-se das BLPB isoladas e purificadas, foram realizados testes para verificação do potencial probiótico (tolerância a baixos valores de pH, resistência a sais biliares, sensibilidade a antibióticos de uso clínico e capacidade de adesão).

Para avaliar a resistência à acidez e sais biliares, reativou-se a cepa da BLPB por dois cultivos sucessivos, centrifugando-a 6000rpm por 15 minutos a 4°C. A massa celular obtida foi lavada duas vezes em solução salina 0,85% e adicionada de 10 mL da mesma solução, originando uma suspensão celular (SC) de cerca de 10^9 UFCmL⁻¹.

Para o teste de resistência à acidez, 1 mL da SC foi utilizado para inocular tubos com 9 mL de caldo MRS com pH ajustado a 2,0, 3,0 e 5,0 utilizando HCl 5mol.L⁻¹ (adaptado de ERKKILÄ; PETÄJÄ, 2000). Alíquotas de 1mL das soluções de diferentes pHs inoculadas foram submetidos à diluição em água peptonada 0,1%. A viabilidade celular foi verificada nos tempo 0 e após 1 e 3 horas de incubação a 37°C. A quantidade de BAL foi determinada por plaqueamento em profundidade em MRS Ágar seguindo-se de incubação a 37°C por 48 horas.

Para avaliar a tolerância à bile, 1mL da SC foi utilizado para inocular tubos com 9 mL de caldo MRS adicionado de 0,3% de sais biliares ou não (situação controle). Os tubos controle e teste foram monitorados após 0, 2, 4 e 24 horas de incubação a 37°C. A contagem da viabilidade celular foi feita em MRS Ágar, com incubação a 37°C por 48 horas (adaptado de PENNACCHIA et al., 2004).

A susceptibilidade a antibióticos foi testada pelo método de difusão em meio sólido utilizando-se ampicilina (10 µg), clindamicina (2 µg), cloranfenicol (30 µg), doxicilina (30 µg), eritromicina (5 µg), gentamicina (10 µg) e tetraciclina (30 µg). Cultivos

das BLPB avaliados foram ajustados para o valor de 0,5 da escala McFarland, sendo semeados em placas com MRS Ágar. Em seguida, discos com cada antimicrobiano foram colocados sobre a superfície das placas de MRS. A resistência aos antibióticos foi avaliada pela medida do diâmetro em torno dos discos (mm) após 24 horas de incubação em temperatura de 37°C (HOSSEINI et al., 2009).

A capacidade de adesão foi verificada de acordo com Hosseini *et al.* (2009) utilizando-se chapas de aço inoxidável (2,cm x 0,8cm x 0,5mm) tratadas com acetona, solução detergente, lavadas em água corrente e destilada. As placas secas foram autoclavadas a 121°C por 15 minutos. 0,5ml da cultura overnight das BLPB foi transferido para 4,5 ml de caldo MRS e uma placa de aço inoxidável. Após 24 horas de incubação a 37°C a placa foi assepticamente retirada, lavada com água peptonada estéril 1% durante 5 minutos e colocada em 5ml de água peptonada 1%, a fim de remover as bactérias pouco aderidas. As placas foram lavadas com 10 ml de água peptonada 1% estéril, colocadas dentro de um tubo de vidro contendo 6 ml de água peptonada 1% estéril e agitadas em vortex durante 3 minutos para criar uma SC de BAL aderidas à superfície da chapa. O número de células desta suspensão foi determinado em MRS Ágar após incubação por 24 horas de incubação. Os resultados foram comparados com a quantidade inicial de células e expressos como a porcentagem de células aderidas para cada cultura.

Os testes presuntivos para identificação das BLPB foram feitos em meio caldo glicose extrato de levedura suplementado com indicador púrpura de bromocresol (0,2g/L). Aliquotas de 0,5 mL da suspensão celular foram inoculadas nos tubos contendo 5mL de meio e incubadas a 10 e 45°C por 48 horas. Da mesma forma, tubos contendo 6,5% de NaCl e com pH ajustado para 4,4 e 9,6 foram incubados a 35°C por 48 horas. O crescimento das culturas foi observado pela alteração da coloração do meio de cultivo (adaptado de MORENO, 2003).

A verificação da produção de CO₂ a partir da fermentação da glicose foi feita em meio semi-sólido de Gibson de acordo com Harrigan (1998). A produção de CO₂ foi indicada pela ruptura do ágar selo e pela presença de bolhas no meio adicionado de 0,5mL da suspensão celular após incubação a 35°C/14dias.

Para identificação das BLPB, as culturas foram submetidas ao sistema BBL Crystal Gram Positive (Becton Dickinson, França). As culturas foram semeadas por esgotamento em MRS Agar e incubadas por 24 horas a 37°C, sendo as colônias transferidas para o tubo com fluido de inóculo até atingir a concentração final de 0,5 na

escala de McFaland. A suspensão foi vertida na base do sistema, a qual foi fechada com a tampa contendo os substratos. Os painéis foram incubados a 37°C/ 24 horas. A leitura dos resultados foi feita de acordo com as indicações do fabricante e a identificação com um programa de software acompanhante do BBL Crystal.

Para determinação do potencial tecnológico, utilizou-se o método descrito por Saxelin *et al.* (1999). As linhagens de BLPB em fase exponencial de crescimento foram centrifugadas a 7.500 x g por 10 minutos a 4°C, seguido de descarte do sobrenadante e lavagem das células sedimentadas (CS). As CS foram suspensas em volume menor que o original (para concentração das células bacterianas) e utilizadas para inocular leite contendo 1,5% de gordura tratado a 95°C por 5 minutos. Amostras de leite suplementadas com promotores de crescimento (2% de glicose e 0,038% de extrato de levedura) foram inoculadas (concentração inicial ao redor de 10^7) e incubadas a 37°C/ 24 horas, seguido de estocagem a 4°C. Semanalmente, avaliou-se a viabilidade celular e pH para determinar a vida útil do produto, além das características visuais e odoríferas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para os testes de resistência à acidez e sais biliares partiu-se de culturas ativas das BLPB 1, 2, 5, 7, 9 e 10. Verificou-se que as BLPB 1, 2, 5, 7, 9 e 10 não resistem à exposição em pH 2,0, mas resistem ao pH 3,0 durante 1 hora de exposição, sendo a sobrevivência inviabilizada após 3 horas de permanência neste pH. Quanto à verificação da tolerância aos sais biliares, as BLPB de número 1, 2, 5, 7, e 10 mantiveram-se viáveis após 4 horas de permanência em sais biliares na concentração de 0,3%, sendo que após 24 horas de exposição a esta concentração de sais biliares ainda apresentou-se viável, contudo com decréscimo abrupto de sua viabilidade celular com decréscimo de 6 a 7 ciclos logarítmicos. A BLPB 9 diferencia-se das demais pelo fato de permanecer viável durante 4 horas de exposição a sais biliares, mas apresentar-se inviável após 24 horas de exposição a concentração de 0,3% de sais biliares.

Segundo Bernadeuau (2001), para que uma bactéria seja probiótica deve resistir pelo tempo de 90 minutos em pH 3,0, simulando a passagem pelo estômago. Em relação à resistência aos sais biliares, as BLPB sobrevivem à concentração média existente de bile no trato gastrointestinal humano, relacionando-se com a capacidade de certas espécies em reduzir o efeito desse detergente pela produção de enzimas que hidrolisam sais biliares (ERKKILÄ, PETÄJÄ, 2000).

A análise da resistência a antibióticos foi feita de acordo com a tabela NCCLS, 2003, podendo-se concluir que as BLPB 1, 2, 5, 9 e 10 são resistentes aos antibióticos Clindamicina, Eritromicina e Gentamicina, sendo a BLPB 7 resistente apenas aos antibióticos Clindamicina e Eritromicina.

O teste de adesão permitiu verificar que as BLPB foram capazes de aderir-se a uma superfície visto que a quantidade de células retidas foi, em média, de 27% em relação à concentração inicial. A capacidade de adesão às células do epitélio intestinal e de crescimento na presença de carboidratos prebióticos são importantes características para a seleção de cepas com potencial probiótico (PENNACCHIA et al, 2004).

Para auxílio na identificação das BLPB foram feitos testes de Gram e catalase. Todas as BLPB apresentaram-se como gram positivas e catalase negativas. A figura 1 apresenta a morfologia analisada em microscópio Zeiss (objetiva 100x e ocular 10x).



Figura 1: Cocobacilos gram positivos provenientes da BLPB 1

Os testes fenotípicos e bioquímicos permitiram classificar as BLPB isoladas como pertencentes ao grupo *Enterococcus*, segundo Harrigan (1998). Estas espécies foram avaliadas como tolerantes a pH 4,4 e 9,6 e capazes de se multiplicar nas temperaturas de 10 e 45°C, além de serem capazes de produzir CO₂ a partir da glicose.

Segundo Harrigan (1998), os *Enterococcus* são microrganismos gram positivos em forma de cocos ou cocos ovóides, catalase negativos. Em relação à divisão celular, observa-se células isoladas, em pares e em cadeias curtas ou longas.

Ainda em relação aos testes fenotípicos e bioquímicos, não foi observado crescimento das BLPB em presença de 6,5% de NaCl. Segundo Harrigan (1998), o grupo *Enterococcus* apresenta capacidade de multiplicação nesta concentração de sal, contudo, de acordo com Devriese et al.(1993), espécies como *Enterococcus avium*, *Enterococcus cecorum* e *Enterococcus columbae* não crescem a 6,5% de NaCl, bem

como as espécies recentemente isoladas de *Enterococcus asini* (VAUX et al, 1998) e *Enterococcus italicus* (FORTINA et al, 2004).

Ao submeter as BLPB ao sistema miniaturizado de identificação – BBL Crystal para microrganismos Gram positivos, verificou-se que as BLPB 2 e 7 foram classificadas como pertencentes à espécie *Enterococcus durans* com probabilidade de 99,99%. Já as BLPB 1, 5, 9 e 10 foram classificadas como *Enterococcus avium* com 80,54% de probabilidade.

Quanto à capacidade tecnológica, as cepas em questão mantiveram sua viabilidade celular durante 30 dias de armazenamento a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ com variação média do pH de 0,4 em relação ao valor inicial, conforme a tabela 1. Quanto às características sensoriais, o odor exalado foi de leite fermentado unido à formação de um coágulo frágil.

Tabela 1. Viabilidade da BLPB em leite durante 30 dias de armazenamento a 4°C

| BLPB | Contagem inicial Log UFC mL ⁻¹ | 7 dias | 14 dias | 21 dias | 28 dias |
|------|--|--------|---------|---------|---------|
| 1 | 8,23 | 8,17 | 7,43 | 7,30 | 7,28 |
| 2 | 8,28 | 8,20 | 7,54 | 7,44 | 7,39 |
| 5 | 8,20 | 8,20 | 7,38 | 7,27 | 7,25 |
| 7 | 8,23 | 8,14 | 6,30 | 7,25 | 7,20 |
| 9 | 8,28 | 8,23 | 7,27 | 7,17 | 7,17 |
| 10 | 8,23 | 8,20 | 7,17 | 7,17 | 7,14 |

CONCLUSÃO

O leite humano é fonte de BLPB com potencial probiótico.

As BLPB testadas apresentaram ação antagonica frente a microrganismos deteriorantes e patogênicos; resistiram a pH 3,0; mantiveram-se viáveis a sais biliares na concentração de 0,3% e aderência, em média, de 27% em relação às células iniciais à superfície aderida. Finalmente, as BLPB foram classificadas como pertencentes ao gênero *Enterococcus*.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ-PIBIC pela bolsa concedida e ao TECNOLAT-ITAL pela oportunidade de estágio.

REFERÊNCIAS

BERNADEAU, M.; VERNOUX, J.P.; GUEGUEN, M. **Probiotic properties of two *Lactobacillus* strains in vitro**. In: REDONDO, N. C. Avaliação *in vitro* de características probióticas do *Enterococcus faecium* CRL 183 e do *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416. ARARAQUARA; Tese de mestrado, 2008. 109p.

DEVRIESE, L. A.; POT, B.; COLLINS, M.D. **Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups.** Journal of Applied Bacteriology, v. 75, p. 422-425, 1986.

ERKKILÄ, S.; PETÄJÄ, E. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. Meat Science, v. 55, p. 297-300, 2000.

FORTINA, M. G.; RICCI, G.; MORA, D.; MANACHINI, P.L. Molecular analysis of artisanal Italian cheeses reveals *Enterococcus italicus* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 54: 1717-1721, 2004.

HARRIGAN, W.F. Laboratory methods in food and dairy microbiology, 3rd San Diego, Academic Press, 1998, 532p.

HOSSEINI, S. V.; ARLINDO, S.; BÖHME, C.; FERNÁNDEZ, No; CALO-MATA, P.; BARROS-VELÁZQUEZ, J. Molecular and probiotic characterization of bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* strains isolated from nonfermented animal foods. **Journal of Applied Microbiology**: 1-12, 2009.

LERAYER ALS. Melhoramento genético de bactérias lácticas. In: **Recursos Genéticos e Melhoramento-Microrganismos**, Embrapa 263-322, 2002.

MACKIE, R. I.; SGHIR, A.; GASKINS, H. R. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 69, n. 5, p. 1035S-1045S, 1999.

MORENO, I. **Efeito da autólise de culturas lácticas na proteólise do queijo prato.** 2003, 180p. Dissertação (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

NCCLS. Performance Standards for antimicrobial disc susceptibility tests; Approved standard – Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

PENNACCHIA, C.; ERCOLINI, D.; BLAIOTTA, G.; MAURIELLO, G.; VILLANI, F. Selection of Lactobacillus strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. Meat Science, v. 67, p. 309-317, 2004.

SAXAELIN, M.; GRENOV, B.; SVENSSON, U.; FONDÉN, R.; RENIERO, R.; MATTILA-SANDHOLM, T. The technology of probiotics. Trends in Food Science & Technology v.10, p. 387-392, 1999.

VAUX. A.; LAGUERRE, G.; DIVIÈS, D.; PRÉVOST, H. *Enterococcus asini* sp. nov. isolated from the caecum of donkeys (*Equus asinus*). **International Journal Systematic Bacteriology**, v. 48p. 383-387. 1998.