

Atividade inibidora de bactérias lácticas, em embutidos de carne curados

Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Brazilian fermented sausage

Celso Rodrigues de Carvalho¹, Wagner Luiz Moreira dos Santos¹, Cristiano Sales Prado¹, Elvio Carlos Moreira², José Oswaldo Costa²

Resumo

A atividade antimicrobiana de 336 bactérias lácticas isoladas de linguiças artesanais de Santa Luzia, Estado de Minas Gerais, foi avaliada frente a diversos microrganismos indicadores de interesse para a indústria alimentícia. Essas bactérias foram submetidas ao teste da atividade antimicrobiana direta que identificou as produtoras de substâncias antagonistas capazes de inibir *in vitro* o desenvolvimento de duas cepas de *Staphylococcus aureus*. As 98 cepas que inibiram, por esta prova, pelo menos um desses microrganismos, receberam a denominação DTEI e foram selecionadas para o teste de inibição indireta, sob condições que neutralizassem o efeito inibidor dos ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio, contra as mesmas cepas de *S. aureus* contra algumas bactérias lácticas de diversas origens e contra uma cepa de *Listeria monocytogenes*. Os resultados demonstraram que as bactérias lácticas isoladas das linguiças artesanais de Santa Luzia, não manifestaram atividade antagonista indireta frente a qualquer das cepas de *S. aureus* utilizadas no presente trabalho. Contudo, três cepas ofereceram resultados positivos na atividade inibitória indireta frente a alguns microrganismos taxonomicamente relacionados, sugerindo terem produzido substâncias antimicrobianas no meio de cultivo. As cepas isoladas foram caracterizadas bioquimicamente e identificadas como *Lactobacillus* sp.

Palavras chave: bactérias lácticas; atividade antimicrobiana; embutidos cárneos; *Staphylococcus*

Introdução

Os alimentos de origem animal são bastante suscetíveis às contaminações bacterianas e estão sujeitos a sofrerem transformações diversas em decorrência da ação de microrganismos adulterantes. Além disso, os alimentos de origem animal podem ser responsáveis pela veiculação de diversos microrganismos patogênicos ao

homem. Por isso, surgiram vários métodos de conservação que visam principalmente o aumento do prazo de vida comercial dos alimentos e a obtenção de produtos seguros à saúde humana. Dentre esses, a fermentação, geralmente associada à secagem, é um dos métodos mais antigos que se conhece, prevenindo alterações e aumentando a estabilidade dos produtos em climas quentes, além de conferir aos alimentos características organolépticas e nutricionais desejáveis (Yamada e Beraquet, 1993; Holzapfel et al., 1995).

O processo fermentativo é exercido por um grupo de microrganismos conhecidos, genericamente, como bactérias lácticas, devido à capacidade que possuem de utilizar os carboidratos disponíveis no substrato, formando diversos ácidos orgânicos, principalmente o ácido láctico (Stamer, 1979). Além disso, sabe-se que elas produzem outras substâncias antimicrobianas (Daeschel et al., 1989; Piard e Desmazeaud, 1991, 1992), sendo as bacteriocinas consideradas as mais interessantes tecnologicamente, pois, devido à sua natureza proteica (Tagg et al., 1976; Schillinger et al., 1993; Jack et al., 1995), podem ser inativadas pelas enzimas do trato gastrointestinal, além de serem atóxicas e não possuírem propriedades imunogênicas nos animais de experimento (Bhunja et al., 1990).

As bactérias lácticas isoladas da carne, ou de seus derivados, são provavelmente as mais eficazes para assegurar a qualidade microbiológica desses produtos por estarem melhor adaptadas a esses substratos. Assim, se evidencia que o isolamento de bactérias lácticas de origem cárnea produtoras de bacteriocinas, é condição indispensável para se utilizar seu potencial como fator de segurança no controle da qualidade higiênico-sanitária da carne e derivados. O isolamento e a identificação de bactérias lácticas de embutidos que manifestem atividade antimicrobiana frente a cepas de *Staphylococcus aureus* e a avaliação da atividade inibitória dessas bactérias frente a alguns microrganismos de várias origens foram os principais objetivos deste trabalho.

Material e Métodos

No período de março e abril de 1995, foram adquiridas aleatoriamente no Mercado Central da cidade de Belo Horizonte, Estado de Minas Gerais (MG), sete amostras de linguiça caseira provenientes de Santa Luzia, MG, que foram transportadas para o Laboratório de Bactérias Lácticas do DTIPOA, da Escola de Veterinária da UFMG, onde foram processadas.

Foram colhidos 20 g da porção central da amostra e homogeneizados com 180 ml de meio de enriquecimento composto por água peptonada a 1% com 0,85% de NaCl. Em seguida, o homogeneizado foi incubado em estufa a 35°C/4 h. A seguir, foram obtidas diluições subseqüentes até as concentrações de 10⁻⁶. De cada uma das diluições, tomaram-se alíquotas de 100 µl que foram semeadas em sistema de dupla camada de MRS-ágar 1,5% e incubadas a 35°C por 48 h. Após este período, as unidades formadoras de colônias (UFCs) foram recolhidas de acordo com o método aleatório descrito por Ordoñez (1979). Estas UFCs foram pinçadas com palitos de madeira e semeadas, através do método de picadura, em placas de MRS-ágar 1,5%, e incubadas por 12 h a 35°C.

A Tabela 1 menciona os microrganismos utilizados como indicadores para as provas de atividade antimicrobiana das bactérias lácticas das linguiças artesanais de Santa Luzia, assim como a origem dos mesmos. Os microrganismos foram conservados liofilizados em leite desnatado a 10% e, após a sua recuperação, congelados a -20°C em caldo nutritivo com 15% de glicerol.

Tabela 1 - Microrganismos indicadores utilizados nos testes de atividade antimicrobiana das cepas de bactérias lácticas isoladas das linguiças artesanais de Santa Luzia, MG

Microrganismo indicador	Origem
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Staphylococcus aureus</i>	FRI 184
<i>Lactobacillus curvatus</i>	CPB 2739
<i>Lactobacillus plantarum</i>	CPB 1193
<i>Lactobacillus reuteri</i>	CPB 20016
<i>Lactobacillus sake</i>	CPB 2714
<i>Leuconostoc cremoris</i>	CPB 1275
<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A	FVM

ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, MD, EUA; CPB: Collection Project Bridge, Comunidade Econômica Européia; FRI: Food Research Institute, Madison, WI, EUA; FVM: Facultad Veterinaria de Madrid

A partir dos estoques de congelados, se tomavam alíquotas de 100 µl de cada cultura dos microrganismos, inoculando-os em tubos de ensaio com 10 ml de caldo BHI ou MRS que eram incubados a temperaturas de 32/37°C durante 12 h de acordo com a cepa utilizada. Esse

procedimento recebeu a denominação de cultivo iniciador dos microrganismos indicadores.

Desses tubos, foram pipetados 100 µl e transferidos para um tubo contendo 5 ml de caldo BHI. Desse, pipetou-se 1 ml que foi transferido para outro tubo, contendo também 5 ml de caldo BHI. Em seguida, 750 µl do volume desse último tubo foram pipetados e transferidos para um tubo contendo 15 ml de BHI-ágar 0,87%. O seu conteúdo foi vertido cuidadosamente em uma placa de MRS-ágar contendo as UFCs de bactérias lácticas. As placas foram conduzidas à estufa por 24 a 48 h. Após esse prazo, as placas foram observadas e aquelas UFCs de bactérias lácticas que promoveram algum tipo de inibição foram recuperadas. Essas UFCs foram submetidas a um cultivo iniciador e congeladas com 15% de glicerol. As cepas foram identificadas com a denominação DTEI seguida da numeração correspondente.

Para se avaliar a atividade inibidora indireta foram obtidos sobrenadantes livres de células das cepas selecionadas. Para isto, pipetaram-se 50 µl do conteúdo dos tubos de congelamento, transferindo-os para tubos com 10 ml de caldo MRS, incubados a 35°C/12 h. O conteúdo dos tubos foi centrifugado a 10.000 r.p.m ou 12.317 x g, durante 10 min., a temperatura de 0°C (Santos, 1993). O pH dos sobrenadantes foi medido e ajustado gotejando-se uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1N até que atingisse a faixa de 6,2 a 6,8. A microfiltração desses sobrenadantes foi realizada por meio de membranas filtrantes GS em éster de celulose com 0,22 µm de poro e 25 mm de diâmetro, adaptadas a suportes plásticos próprios. Esse filtrado constituía o sobrenadante livre de células não concentrado, denominado "s". Quinze ml deste filtrado foram transferidos para uma placa de Petri, congelados e posteriormente liofilizados. Os 5 ml restantes foram mantidos em frasco de penicilina e armazenados a temperatura de -20°C. Para se obter os sobrenadantes concentrados (Sc), o "s" liofilizado foi ressuscitado em uma solução tampão-fosfato, 4 mM, de pH 7,0, obtendo-se um Sc 20 vezes em relação ao original ("s"). Os Sc foram armazenados em frascos de penicilina e congelados e estocados no freezer (-20°C).

A partir do cultivo iniciador dos indicadores, 100 µl foram transferidos para um tubo contendo 5 ml de caldo BHI ou MRS. Desse tubo pipetou-se 1 ml que foi vertido para outro tubo contendo 5 ml de caldo BHI e desse foram passados 1,5 ml para um tubo contendo 30 ml de BHI-ágar 0,8% ou MRS-ágar 0,8%, vertidos para placas descartáveis (90 x 15mm), incubadas em estufa de cultura a 37°C/1h. Após este prazo, foram feitos furos no mesmo, utilizando-se canudos plásticos para refrigerante com 6 mm de diâmetro. Em cada furo no ágar, foram adicionados 50 µl dos Sc das cepas a serem testadas. As placas foram levadas à geladeira, onde permaneceram por 2h e incubadas sob condições ideais para o crescimento das cepas indicadoras durante 24 a 48 h. Os halos de inibição foram observados e mensurados em mm (Santos, 1993).

Uma vez realizados todos os testes de difusão em ágar,

seis cepas de bactérias lácticas isoladas foram escolhidas e testadas frente a outras bactérias lácticas e uma cepa de *Listeria monocytogenes* para avaliação do espectro de ação. As cepas de bactérias lácticas escolhidas (DTEI 094, DTEI 095 e DTEI 096) foram identificadas até gênero, pelo método de identificação rápida para lactobacilos descrito por Schillinger e Lücke (1987). Foram realizadas as seguintes provas: produção de gás, catalase, coloração de Gram, morfologia e crescimento a 15°C.

Resultdos e Discussão

Das FCs crescidas no MRS-ágar, 48 foram repicadas, para cada amostra de linguiça, seguindo o método aleatório descrito por Ordoñez (1979), totalizando 336 UFCs. Todas estas bactérias foram examinadas para prova de Gram e atividade de catalase e classificadas como pertencentes ao grupo das bactérias lácticas. As bactérias lácticas isoladas das amostras apresentaram contagem global média variando entre 10^7 e 10^8 UFCs/g. Este resultado foi bastante semelhante aos obtidos por outros pesquisadores que, após três ou quatro dias de fermentação, observaram uma contagem de 10^8 UFCs/g que se manteve constante no período de maturação dos embutidos (Metaxopoulos et al., 1981; Samelis et al., 1994).

Conforme se pode observar na Tabela 2, 98 cepas das bactérias lácticas isoladas, apresentaram atividade antagonista direta frente a pelo menos uma das cepas de *S. aureus*, o que representa 29,2% das bactérias lácticas isoladas. Esses resultados não foram idênticos para as duas cepas usadas como indicadoras, o que significa que microrganismos distintos reagem diferentemente às substâncias produzidas pelas bactérias lácticas liberadas no meio extracelular (Schillinger & Lücke, 1989; Daeschel et al., 1990). Dessa forma, o *S. aureus* ATCC 25923 mostrou-se menos resistente às bactérias lácticas selecionadas, uma vez que 58 UFCs (17,3%) foram capazes de inibir o seu desenvolvimento no BHI-ágar, o que se observou através da formação de halos de inibição de crescimento ao redor das UFCs. Por outro lado, o *S. aureus* FRI 184 demonstrou resistência maior, de modo que somente 40 das 336 UFCs (11,9%) foram capazes de inibi-lo.

Tabela 2 - Atividade inibitória direta das bactérias lácticas isoladas das linguiças artesanais de Santa Luzia frente às cepas indicadoras de *Staphylococcus aureus*

Cepa indicadora	Número de UFCs	Percentual
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	58	17,3%
<i>S. aureus</i> FRI 184	40	11,9%
Nenhuma atividade	238	70,8%
Total	336	100%

Nenhuma cepa indicadora de *S. aureus* foi inibida pelos sobrenadantes livres de células das 98 cepas de bactérias lácticas isoladas que deram resultados positivos no teste de inibição direta, ou seja, os resultados da atividade

de inibitória indireta frente a esse microrganismo foram todos negativos.

As cepas DTEI 094, DTEI 095 e DTEI 096 foram positivas frente ao *Leuconostoc cremoris* CPB 1275 e ao *Lactobacillus sake* CPB 2714, microrganismos taxonomicamente relacionados, conforme mostra a Tabela 3. Os halos de inibição produzidos pelas cepas DTEI 094, 095 e 096 tinham diâmetros aproximados de 17 mm. Posteriormente, foram submetidas a provas de identificação do gênero bacteriano, tendo sido classificadas como *Lactobacillus*.

Durante a obtenção dos sobrenadantes livres de células utilizados nos testes de inibição indireta, isto é, testes que tentam detectar a presença de substâncias semelhantes a bacteriocinas produzidas pelas bactérias lácticas, algumas medidas são tomadas para se eliminar a possibilidade de que a inibição das cepas indicadoras tenha sido devida a outras substâncias. Dessa forma, o ajustamento do pH desses sobrenadantes, com solução de NaOH 1N, para uma faixa de 6,2 a 6,8, objetiva impedir a ação antagonista dos ácidos orgânicos (Piard e Desmazeaud, 1991; Schillinger et al., 1993; Holzapfel et al., 1995), enquanto o processo de liofilização, ao retirar os metabólitos do oxigênio e o peróxido de hidrogênio, descarta a possibilidade de a inibição ter sido provocada por essas substâncias. Do mesmo modo, como os sobrenadantes tornaram-se isentos de células, após a microfiltração, a inibição não poderia ocorrer por competição direta.

Esses resultados sugerem que a inibição do *S. aureus* pelas bactérias lácticas, durante os testes de inibição direta, ocorreu sobretudo pela produção de ácidos orgânicos, formados durante a fermentação dos carboidratos presentes no meio e pela formação de peróxido de hidrogênio, podendo estar associados ao processo de competição pelos nutrientes, uma vez que, por terem sido eliminados, tais fatores não puderam exercer sua atividade antagonista. Vários trabalhos têm indicado que os ácidos orgânicos são realmente o principal fator inibidor das bactérias lácticas, ao instalarem um ambiente de elevada acidez no meio (Daeschel, 1989; Piard e Desmazeaud, 1991, 1992; González-Fandos et al., 1994; Holzapfel et al., 1995). As demais substâncias produzidas por elas como, por exemplo, as bacteriocinas, embora tenham grande capacidade antagonista, geralmente são produzidas em menores quantidades.

Não se pode afirmar que estes exemplares não produziram substâncias antagonistas semelhantes a bacteriocinas, uma vez que foram capazes de inibir indiretamente outras bactérias lácticas. No entanto, estas substâncias não possuem atividade antimicrobiana frente às cepas de *S. aureus* testadas no presente trabalho. Estes resultados indicam que os estafilococos possuem condições favoráveis para o seu crescimento e desenvolvimento nas linguiças artesanais de Santa Luzia, pois a microbiota presente neste embutido foi incapaz de liberar substância antimicrobiana extracelular no meio de cultura.

Tabela 3 - Atividade antimicrobiana indireta das bactérias lácticas selecionadas frente a microrganismos indicadores diversos

Microrganismo indicador	DTEI 094	DTEI 095	DTEI 096	DTEI 097	DTEI 098	DTEI 099
<i>Lactobacillus curvatus</i> CPB 2739	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> CPB 1193	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus reuteri</i> CPB 20016	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus sake</i> CPB 2714	+	+	+	-	-	-
<i>Leuconostoc cremoris</i> CPB 1275	+	+	+	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> FRI 184	-	-	-	-	-	-

Abstract

Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Brazilian fermented sausage

The antimicrobial activity of 336 lactic acid bacteria isolated from dry fermented sausages was evaluated against several microorganisms. Ninety-eight strains showed direct antagonistic activities against *Staphylococcus aureus* at the primary tests, probably based on previous production of organic acids, hydrogen peroxid and oxygen metabolites or by competition. These microorganisms were checked by the well agar diffusion assay for their antagonistic activity against the same indicators and against other closely related bacteria. The inhibitory compound on one concentrated culture supernatant showed antagonistic effect against *S. aureus* or *Listeria monocytogenes*. Two strains of other lactic acid bacteria were inhibited by the supernatants cell-free from three selected strains. It appears that the lactobacilli are more sensitive than the staphylococci. It also appears that the inhibitory spectra of the lactobacilli are varying significantly. All selected isolates with antagonistic activities were found to be *Lactobacillus* spp. The detection of lactic acid bacteria with inhibitory properties from fermented sausages could be of interest in future applications in a meat system in order to control food spoilage and food-borne pathogenic bacteria such as *S. aureus*. Further experiments and attempts to obtain antimicrobial substances from lactic cultures producers should be carried out to achieve safer final products.

Key words: lactic acid bacteria; antimicrobial activity; fermented sausage

Referências bibliográficas

- Bhunia AK, Johnson MC, Ray B et al. 1990. Antigenic property of pediocin AcH produced by *Pediococcus acidilactici* H. *J Appl Bacteriol* 69: 211-215.
- Daeschel MA 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technology* 43(1): 164-166.
- Daeschel MA, Mckenney MC, McDonald LC 1990. Bacteriocidal activity of *Lactobacillus plantarum* C-11. *Food Microbiol* 7(2): 91-98.
- González-Fandos E, Otero A, Sierra M et al. 1994. Effect of three commercial starters on growth of *Staphylococcus aureus* and enterotoxins (A-D) and thermonuclease production in broth. *Intern J Food Microbiol* 24(1/2): 321-327.
- Holzappel WH, Geisen R, Schillinger U 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *Inter J Food Microbiol* 24(3): 343-362.
- Jack RW, Tagg JR, Ray B 1995. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiol Rev* 59(2): 171-200.
- Metaxopoulos J, Genigeorgis G, Fanelli MJ, Franti C, Cosma E 1981. Effect of starter cultures and chemical acidulation on staphylococcal growth in salami under commercial manufacturing conditions. *Appl Environ Microbiol* 42: 863-871.
- Ordoñez JA 1979. Random number sampling method for estimation of lactic acid bacteria. *J Appl Bacteriol* 46: 351-353.
- Piard JC, Desmazeaud M 1991. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Le Lait* 71(5): 525-541.
- Piard JC, Desmazeaud M 1992. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2. Bacteriocins and other antibacterial substances. *Le Lait* 72(2): 113-142.
- Samelis J, Stavropoulos S, Kakouri A et al. 1994. Quantification and characterization of microbial populations associated with naturally fermented greek dry salami. *Food Microbiol* 11(6): 447-460.
- Santos WLM 1993. *Aislamiento y caracterización parcial de una bacteriocina producida por Pediococcus sp. 347, de origem cárnico*. Dissertação de Doutorado. Universidade Complutense de Madrid, Madrid, 294 pp.
- Schillinger U, Lücke F-K 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl Environ Microbiol* 55(8): 1901-1906.
- Schillinger U, Lücke F-K 1987. Identification of lactobacilli from meat and meat products. *Food Microbiol* 4: 199-208.
- Schillinger U, Stiles ME, Holzappel WH 1993. Bacteriocin production by *Carnobacterium piscicola* LV 61. *Intern J Food Microbiol* 20(3): 131-147.
- Stamer JR 1979. The lactic acid bacteria: microbes of diversity. *Food Technol* 33(1): 60-65.
- Tagg JR, Dajani AS, Wannamaker LW 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol Rev* 40(3): 722-756.
- Yamada EA, Beraquet NJ 1993. Embutido fermentado cozido. *Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos/ITAL* 23(1): 19-27.