CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS ISOLADAS DE RÚCULAS COMERCIALIZADAS NO MUNICÍPIO DE ITAQUI-RS

Andressa Alves [1]

Bruna Kelm Teixeira [2]

Carla Pohl Sehn [3]

Resumo:

As bactérias ácido lácticas são consideradas de grande importância para as indústrias de alimentos, podendo contribuir nas questões sensoriais do produto, como aroma e sabor. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo isolar e caracterizar bactérias ácido lácticas a partir de rúculas comercializadas no município de Itaqui-RS. Para isso, foi realizado isolamento em Ágar Man Rogosa e Sharpe, seguido da coloração de Gram e teste de catalase. Também foram avaliados a atividade antimicrobiana através do método de difusão em ágar, utilizando-se micro-organismos patogênicos Gram positivos e Gram negativos, e cepas padrão de BAL como indicadores, após foi determinada a capacidade da produção de dióxido de carbono (CO2) a partir da utilização de glicose e a estabilidade dos isolados em diferentes concentrações de NaCl (4, 6 e 10%), em pH 2,5 e pH 8,0 e à temperatura de 8 °C. Obteve-se ao final dos testes oito isolados de bactérias ácidos lácticas com morfologia de cocos Gram positivos, catalase negativo e homofermentativos. Apesar de nenhum dos isolados apresentarem atividade antimicrobiana, dois (1R7 e 1R8) destacaram-se por apresentarem estabilidade satisfatória em concentração de NaCl 4, 6 e 10%, pH 8,0 e temperatura de 8 °C por até 8 dias. Da mesma forma que, os seis isolados (1R1, 1R2, 1R3, 1R4, 1R5 e 1R6), apresentaram-se estáveis em pH 2,5 por período de dois dias. Diante disso, os isolados provenientes de rúcula demonstram potencial à pesquisas visando a aplicação em alimentos.

Palavras-chave: Isolamento, Eruca sativa, culturas iniciadoras

Modalidade de Participação: Iniciação Científica

CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS ISOLADAS DE RÚCULAS COMERCIALIZADAS NO MUNICÍPIO DE ITAQUI-RS

[1] Aluno de graduação. alvesandressa519@gmail.com. Autor principal

[2] Aluno de graduação. brunakelm.t@gmail.com. Co-autor

[3] Docente. carlasehn@unipampa.edu.br. Orientador

CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS ISOLADAS DE RÚCULAS COMERCIALIZADAS NO MUNICÍPIO DE ITAQUI-RS

1 INTRODUÇÃO

Sendo designada como "*Bacterium lactis*", a primeira cultura de bactéria ácido láctica (BAL) foi obtida por Lister em 1873, a partir de uma amostra de leite. Desde então essas bactérias passaram a ser isoladas de outros tipos de alimentos e também do trato gastrointestinal humano e animal (AXELSSON, 1998).

As BAL possuem o metabolismo estritamente fermentativo, são microrganismos Gram positivos, não patogênicos, não esporulados, anaeróbios/aerotolerantes, desprovidos de citocromos, são ácido tolerantes e apresentam reação de catalase negativa (GÓRSKA et al., 2007). Em relação à temperatura, podem ser mesófilas ou termófilas, sendo que entre 30-37 °C e 45-50 ºC, respectivamente, são consideradas temperaturas ótimas de multiplicação (CARR et al., 2002).

Diversas BAL possuem a capacidade de produzir compostos antimicrobianos como peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, ácido acético, ácido lático e bacteriocinas, as quais apresentam potencial de inibição contra alguns patógenos entéricos como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori* e rotavírus (ARGYRI et al., 2013; HOU et al., 2015). Consideradas de grande importância na indústria de alimentos, as BAL são utilizadas como culturas iniciadoras por apresentarem características importantes como a produção de ácido láctico em diferentes meios e em diferentes temperaturas, atividades de proteinase e peptidase, autólise, produção de compostos voláteis, resistência a bacteriófagos e produção de compostos inibidores (ZOTTA et al., 2009). Exemplos das propriedades desejadas dessas culturas incluem robustez durante a fabricação, crescimento rápido, alto rendimento de biomassa, rendimento de produto e propriedades organolépticas específicas (SMID; KLEEREBEZEM, 2014).

Alguns estudos relatam o isolamento de BAL em vegetais crus, caracterizadas como produtoras de substâncias antimicrobianas (TRIAS et al., 2008; KRUGER, 2010). A importância de investigar BAL de diferentes fontes, entre elas as de origem vegetal, justifica-se em virtude das características espécie-específicas que cada isolado pode apresentar e varia dentro de uma mesma espécie microbiana (AHMADOVA et al., 2013).

A rúcula, pertencente à família *Brassicaceae*, se destaca no cenário mundial devido as suas propriedades nutricionais e fitoterapêuticas, apresentando composição química rica em vitaminas, sais minerais e fibras, além da presença de cálcio, compostos sulforados, enxofre, ferro, fósforo e potássio (EVANGELISTA, 2008; FILGUEIRA, 2008).

Diante disso, o presente estudo teve como objetivo isolar e caracterizar bactérias ácido lácticas a partir de rúculas comercializadas no município de Itaqui-RS.

2 METODOLOGIA

Foi realizado isolamento de BAL em Ágar Man Rogosa e Sharpe (MRS - TM MEDIA®), selecionadas colônias de acordo com características fenotípicas como cor, formato, brilho ou opacidade e rugosidade, posteriormente purificadas em ágar MRS pelo método de esgotamento (OPLUSTIU; ZOCCOLI, 2010) seguido da coloração de Gram e teste de catalase**.** A partir disso, os isolados foram avaliados quanto à atividade antimicrobiana através do método de difusão em ágar (BISCOLA et al., 2013), com adaptações, utilizando-se micro-organismos patogênicos Gram positivos e Gram negativos, e cepas padrão de BAL como indicadores. Os micro-organismos Gram positivos e Gram negativos foram cultivados

em Caldo de Brain Heart Infusion (BHI - HiMedia®), enquanto as cepas padrão de BAL foram cultivadas em Caldo de Man Rogosa & Sharpe (MRS - HiMedia®), todos foram submetidos à condição de aerobiose à 36 °C por 24 horas. Também foi avaliado o perfil fermentativo dos isolados, determinando a capacidade de produção de CO_2 a partir da utilização de glicose (PROQUÍMIOS®). Por fim, foram avaliados quanto à estabilidade em diferentes concentrações de NaCl (4, 6 e 10%), em pH 2,5 e pH 8,0, e à temperatura de 8 °C, pelo período de 8 dias (DROSINOS et al., 2005).

3 RESULTADOS e DISCUSSÃO

A rúcula, além de ser uma hortaliça rica em nutrientes demonstrou-se uma possível fonte para isolamento de BAL, obtendo-se o isolamento de 8 colônias com características típicas, tais como tamanho pequeno, cor branca e superfície e borda lisas, os quais apresentaram morfologia de cocos Gram positivos, catalase negativos e homofermentativos. Os isolados foram identificados como 1R1, 1R2, 1R3, 1R4, 1R5, 1R6, 1R7 e 1R8.

Ponce et al. (2008) isolaram duas cepas de BAL a partir de amostras de espinafre, sendo *Lactococcus lactis* e *Enterococcus canis* e duas cepas de amostras de acelga, *Enterococcus hirae* e *Enterococcus faecium*. Enquanto, Trias et al. (2008) isolaram 496 cepas de BAL a partir de vegetais orgânicos, saladas prontas para consumo, frutas frescas e sementes, e entre os isolados caracterizados estavam cepas de *Lactococcus lactis* e *Enterococcus mundtii.* Estes estudos, bem como os resultados obtidos no presente trabalho, apontam uma maior prevalência de BAL em formato de cocos, como as pertencentes aos gêneros *Lactococcus* e *Enterococcus* em isolados de origem vegetal.

Os isolados não apresentaram atividade antimicrobiana contra os micro-organismos patogênicos *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43895, *Proteus mirabilis* CCBH17721, *Enterobacter cloacae* CCBH18002, *Klebsiella pneumonae* CCBH6603 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e também contra cepas padrão de BAL *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Lactobacillus delbruekii* ATCC 3744, *Lactobacillus fermentum* ATCC 9338, *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, *Lactobacillus rhamnosus* CG e *Latobacillus sakei* subesp. *sakei* ATCC 15521.

Não apresentando atividade antimicrobiana contra as cepas padrão de BAL torna possível o uso destes isolados em combinação à diferentes bactérias ácido láticas e iniciadoras, a fim de garantir um produto com as características tecnológicas desejáveis, com potencial nutricional e benéfico à saúde (CANDY et al., 2008).

Quanto a estabilidade dos isolados a diferentes condições, ao longo dos 8 dias avaliados, os isolados 1R7 e 1R8 demonstraram estabilidade satisfatória em concentração de NaCl 4, 6 e 10%, pH 8,0 e temperatura de 8 °C. A estabilidade a estas condições demonstram o potencial de aplicação e utilização destes isolados em produtos com alta concentração salina, como cárneos fermentados, ou produtos lácteos, que são armazenados em temperaturas que variam de 2 °C a 10 °C (FERREIRA, 2001). A estabilidade ao pH 8 denota a capacidade de sobrevivência ao intestino delgado, o qual possui um pH alcalino (pH 8,0 - 9,0) (BARBERI et al., 2015).

Além disso, os isolados 1R1, 1R2, 1R3, 1R4, 1R5 e 1R6 demonstraram-se estáveis por dois dias em pH 2,5, correspondente ao pH do estômago. Resultado interessante quando comparado ao tempo médio de permanência dos alimentos no estômago (3 horas) quando expostos à acidez estomacal (MAHAN e ESCOTT-STUMP, 2002), bem inferior ao tempo máximo de dois dias (48h) suportado pelos isolados.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Além de ser uma hortaliça rica em micronutrientes, a rúcula demonstrou-se uma possível fonte para isolamento de bactérias ácido lácticas, na qual foi possível caracterizar oito isolados com morfologia de cocos Gram positivos, catalase negativos. Nenhum isolado apresentou atividade antimicrobiana e todos foram classificados como homofermentativos. Apesar de nenhum dos isolados apresentarem atividade antimicrobiana, dois (1R7 e 1R8) destacaram-se por apresentarem estabilidade satisfatória em concentração de NaCl 4, 6 e 10%, pH 8,0 e temperatura de 8 °C por até 8 dias. Da mesma forma que, os seis isolados (1R1, 1R2, 1R3, 1R4, 1R5 e 1R6), apresentaram-se estáveis em pH 2,5 por período de dois dias. Diante disso, os isolados provenientes de rúcula demonstram potencial à pesquisas visando a aplicação em alimentos.

REFERÊNCIAS

AHMADOVA, A.; TODOROV, D. S.; HADJI-SFAXI, I.; CHOISET Y. et al. Antimicrobial and antifungal activities of Lactobacillus curvatus strain isolated from homemade Azerbaijani cheese. **Anaerobe**, v. 20, p. 42-49, 2013.

ARGYRI, A. A.; ZOUMPOPOULOU, G.; KARATZAS, K.A.; TSAKALIDOU, E.; NYCHAS, G.J.; PANAGOU, E.Z.; TASSOU, C.C. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. **Food Microbiology**, v.33, p. 282–291, 2013.

AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: Classification and physiology In S. SALMINEN, A. Von Wright. Inc. **Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects**, New York: Marcel Dekker, 1998, p.01-72.

BARBERI, C.; CAMPANA, S.; DE PASQUALE, C.; RABBANI, K. M.; FERLAZZO, G.; BONACCORSI, I. T cell polarizing properties of probiotic bacteria. **Immunology letters**, v.168, n.2, p.337-342, 2015. doi: 10.1016/j.imlet.2015.11.005

BISCOLA, V.; TODOROV, S.D.; CAPUANO, V.S.; ABRIOUEL,H.; FRANCO, B.D. Isolation and characterization of a nisin-like bacteriocin produced by a *Lactococcus lactis* strain isolated from charqui, a Brazilian fermented, salted and dried meat product. **Meat Science**, v.93, n.3, p.607–613, 2013.doi: 10.1016/j.meatsci.2012.11.021

CANDY, D.C.A.; HEAT, S.J.; LEWIS, J.D.N.; THOMAS, L.V. Probiotics for theyoungandthenotsoyoung. **International Journal of Dairy Technology**, v.61, p.215–221, 2008. doi: https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2008.00419.x

CARR, F.J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: a literature survey. **Critical Reviews in Microbiology**, v.28, n.4, p. 281-370, 2002. doi:http://dx.doi.org/10.1080/1040-840291046759

DROSINOS, E.H.; MATARAGAS, M.; XIRAPHI, N.; MOSCHONAS, G.; GAITIS, F.; METAXOPOULOS, J. Characterization of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage. **Meat Science**, v. 69, p.307-317, 2005.

EVANGELISTA, J. Tecnologia de alimentos. 2. ed. São Paulo: **Atheneu**, 2008. p. 27.

FERREIRA, C. L. **Produtos Lácteos e Fermentados** (aspectos bioquímicos e tecnológicos). Viçosa: UFV, 2001. 112 p.

FILGUEIRA, F. A. R. Novo Manual de Olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 3. ed. **Viçosa**: UFV, 2008.FURTADO, D.N. **Isolamento de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas e sua aplicação no controle de *Listeria***

monocytogenes **em queijo frescal de leite de cabra** [Disserteção]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2010.

GÓRSKA, S.; GRYCKO, P.; RYBKA, J.; GAMIAN, A. Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: structure and biosynthesis. **Postepy Higieny Medycyny Doswiadczalnej**, v.4 n.61, p. 805-18, 2007.

HOU, C.; ZENG, X.; YANG, F.; LIU, H.; QIAO, S. Study and use of the probiotic Lactobacillus reuteri in pigs: a review. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, p. 6-1, 2013.

KRUGER, M. F. Caracterização da bacteriocina produzida por Lactococcus lactis subsp. lactis MK02R isolado de rúcula (Euruca sativa Mill.) e avaliação do seu potencial probiótico utilizando o modelo dinâmico TIM-1. 2010. Tese (Doutorado em Bromatologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010. doi:10.11606/T.9.2010.tde-28082013-164445. Acesso em: 4 set.2017.

MAHAN, K. L.; ESCOTT-STUMP, S. **Krause**: alimentos, nutrição & dietoterapia. 10 ed. São Paulo: Roca, 2002.

OPLUSTIL, C.P.; ZOCCOLI, C.M. Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica, 3.ed. São Paulo: **Sarvier**, 2010.

PONCE, A.G.; MOREIRA, M.R.; ROURA, S.I. Preliminary characterization of bacteriocin-like substances from lactic acid bacteria isolated from organic leafy vegetables. LWT – **Food Science and Technology**, v.41, n.3, p.432-441, 2008. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2007.03.021

SMID, E. J.; KLEEREBEZEM, M. Production of aroma compounds in lactic fermentations. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 5, p. 313-326, feb.2014.

TRIAS, R.; BAÑERAS, L.; MONTESINOS, E.; BADOSA, E. Lactic acid bacteria from fresh fruit and vegetables as biocontrol agents of phytopathogenic bacteria and fungi. **International Microbiology**, v.11, n.4, p. 231-36, 2008. doi: 10.2436/20.1501.01.66

ZOTTA, T.; PARENTE, E.; RICCIARDI, A. Viability staining and detection of metabolic activity of sourdough lactic acid bacteria under stress conditions. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 6, p. 1119-1124, 2009.