

BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS ISOLADAS DE LEITE CRU COM ATIVIDADE
ANTAGONISTA A *Listeria monocytogenes* E *Escherichia coli*

BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS, AISLADAS DE LA LECHE CRUDA, CON
ACTIVIDAD ANTAGONISTA A *Listeria monocytogenes* Y *Escherichia coli*

LACTIC ACID BACTERIA ISOLATE OF RAW MILK WHIT ANTAGONIC TO
Listeria monocytogenes AND *Escherichia coli*.

TAMANINI, Ronaldo (Doutorando); CAVALETTI, Livia Corrêa da Silva (Mestre);
ANGELA, Henrique Lopes (residente); FAGNANI, Rafael (Mestrando); BATTAGLINI,
Ana Paula Pavão (Mestranda); MONTEIRO, Alexandre Amorim (Doutorando);
MATSUBARA, Marcelo Takeo (Mestrando); GIOMBELLI, Cristiane Jaci (Residente);
NERO, Luis Augusto (Doutor); BELOTI, Vanerli (Doutora)

RESUMO

As Bactérias Ácido Láticas (BAL) são microrganismos naturalmente encontrados em vários alimentos e possuem importância no controle de microrganismos patogênicos em alimentos, pois produzem uma série de substâncias com potencial antimicrobiano, que afetam microrganismos, como *Listeria monocytogenes*. Com o objetivo de verificar a presença de *L. monocytogenes*, enumerar as BAL, e verificar a atividade antagonista das BAL isoladas em relação a *L. monocytogenes* e *E. coli* foram coletadas amostras de leite cru de 45 propriedades leiteiras da região agreste de Pernambuco. Para detecção de *L. monocytogenes* foi utilizado o sistema VIDAS Listeria (bioMerieux). Para contagem de BAL as amostras foram diluídas em caldo MRS e semeadas em placas de PetrifilmTM AC (3M), com incubação a 30°C por 72 horas em microaerofilia. O antagonismo aos patógenos foi determinado através da metodologia *spot-on-the-lawn* modificada, utilizando a cepa *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *E. coli* ATCC 25922. Para isso foram selecionadas 671 culturas de BAL isoladas das 45 amostras. Em nenhuma amostra de leite foi detectada a presença de *L. monocytogenes*. As contagens de BAL variaram de $11,1 \times 10^4$ UFC/mL a $9,9 \times 10^6$ UFC/mL. Das culturas testadas com relação à capacidade antagonista a *L. monocytogenes*, 549 (81,8%) apresentaram atividade antagonista, sendo que 410 (61,2%) com inibição total e 139 (20,7%) com inibição parcial. Quanto a *E. coli*, 258 (38,5) culturas apresentaram atividade antagonista, sendo todas com inibição parcial. A alta frequência de BAL com capacidade antagonista a *L. monocytogenes*, pode ser responsável pela ausência deste patógeno nas amostras de leite estudadas.

Palavras chave: leite, bactérias láticas, *Listeria monocytogenes*, antagonismo

ABSTRACT

Lactic Acid Bacteria (LAB) are microorganisms naturally found in several foods that have an important role in controlling pathogenic microorganisms in food since they are able to produce numerous substances with antimicrobial antagonistic potential, that affect microorganisms such as *Listeria monocytogenes*. Aiming to verify the presence of *L. monocytogenes*, enumerate LAB, and verify the antagonistic activity of isolated LAB against

L. monocytogenes and *E. coli*, samples of raw milk were collected from 45 milk farms from Agreste region of Pernambuco. For *L. monocytogenes* detection VIDAS Listeria (bioMerieux) system. For LAB counting samples were diluted in MRS broth and distributed PetrifilmTM AC (3M) plates, incubated for 72 hours on microaerophilic conditions. Pathogens antagonism was determined through *spot-on-the-lawn* modified methodology using *L. monocytogenes* ATCC 7644 and *E. coli* ATCC 25922 strains. In order to do that 671 LAB cultures isolated from the 45 samples were selected. *L. monocytogenes* was not detected in any milk sample. LAB counting varied from $11,1 \times 10^4$ to $9,9 \times 10^6$ CFU/mL. Cultures tested for antagonistic capacity against *L. monocytogenes*, were antagonistic in 549 (81,8%) samples, from which 410 (61,2%) showed total inhibition and 139 (20,7%) partial inhibition. Concerning *E. coli*, 258 (38,5) cultures showed antagonist activity, all with partial inhibition. Elevated frequency of LAB antagonistic to *L. monocytogenes* can be responsible for the absence of this pathogen in milk samples studied.

Key words: milk, lactic bacteria, *Listeria monocytogenes*, antagonism

INTRODUÇÃO

A microbiota dos alimentos é composta por diferentes microrganismos, próprios de cada alimento, somados aos incluídos nas etapas de produção, armazenamento e processamento. Em cada alimento, portanto, dependendo de suas características de produção, contaminação e natureza, ocorre uma série de interações que determinam a microbiota presente nesse produto. O leite devido a sua composição constitui um excelente meio de cultura para multiplicação de microrganismos. O leite cru pode representar uma importante fonte de transmissão das Doenças de Origem Alimentar, pois pode carrear vários patógenos como *Listeria monocytogenes* (CHAMBERS, 2002). Em 2005 cerca de 50% de toda a produção leiteira no Brasil não passou por nenhum tipo de inspeção (IBGE, 2008), e teve como provável destino o comércio informal, mesmo sendo proibido desde 1952 (BRASIL, 1952). O risco torna-se maior devido a usual produção de diversos tipos de derivados com leite cru, como queijos, cuja produção não emprega nenhum tratamento térmico como a pasteurização e conserva os eventuais patógenos presentes na matéria prima.

De modo geral o leite produzido no Brasil é obtido em condições higiênico-sanitárias deficientes, predominando altas contagens de microrganismos aeróbios mesófilos, psicrotróficos, coliformes e presença de patógenos.

Em algumas pesquisas a qualidade microbiológica ruim tem sido associada à baixa incidência de patógenos. Entretanto, quando se verifica uma melhoria da qualidade microbiológica a incidência de patógenos tende a ser maior (GUERRA et al., 2001; JAY, 1995). Isso pode ser explicado principalmente devido à presença natural de uma microbiota com grande potencial inibitório no leite com altas contagens. Provavelmente as Bactérias Ácido Lácticas (BAL), naturalmente presentes no leite, são responsáveis por essa inibição. As BAL são produtoras de uma variedade de compostos antimicrobianos, incluindo: ácidos, diacetil, peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, álcool, aldeído e bacteriocina. Todos esses compostos podem prejudicar o desenvolvimento de bactérias deterioradoras e patogênicas presentes nos alimentos (HUGAS, 1998),

O presente trabalho teve como objetivo pesquisar *L. monocytogenes*, quantificar as BAL no leite cru e identificar a presença de BAL com atividade antagonista à *L. monocytogenes* e *E. coli*, em amostras colhidas em propriedades leiteiras do Agreste de Pernambuco.

MATERIAL E MÉTODOS

Com o auxílio da Secretaria de Produção Rural e Reforma Agrária de Pernambuco (SPRRA) e da Cooperativa dos Produtores de Leite e Derivados de Pernambuco (COOPROL) foram selecionadas 45 propriedades que representassem as características de produção predominantes da região Agreste do Estado de Pernambuco.

Para a realização do experimento foram coletadas amostras de leite cru de 45 propriedades leiteiras. As amostras foram coletadas de latões, através da realização de *pool*, e de resfriadores, em *bags* estéreis (Nasco[®], Estados Unidos), que foram mantidas em temperatura de refrigeração e encaminhadas ao Laboratório de Experimentação e Análises de Alimentos (LEAAL) da Universidade Federal de Pernambuco para a realização das análises.

Para detecção de *L. monocytogenes* foi utilizado o sistema VIDAS Listeria (bioMerieux[®], França) e para a enumeração de BAL as amostras foram diluídas em caldo MRS e semeados em placas de Petrifilm[™] AC (3M do Brasil), com incubação a 30°C por 72 horas em microaerofilia (NERO, 2006).

O antagonismo a *L. monocytogenes* e *E. coli* foi realizado no Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal da Universidade Estadual de Londrina através da metodologia *spot-on-the-lawn* modificada (LEWUS; MONTIVILLE, 1991), utilizando as cepa *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *E. coli* ATCC 25922. Para isso foram selecionadas 671 colônias de BAL isoladas das 45 amostras. Cada cultura de BAL recuperada foi semeada pontualmente em quatro placas contendo PCA (Acumedia[®], Estados Unidos). Foram semeadas oito culturas por placa e incubadas a 30°C por 48 horas. Duas placas se destinaram à avaliação de atividade antagonista com relação à *L. monocytogenes* e duas para *E. coli*. Após o crescimento as placas receberam aproximadamente 7 mL de uma sobrecamada contendo o patógeno na concentração aproximada de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (escala 0,5 de Mc Farland). Para a formação da sobrecamada foi retirado 0,1 ml de cada cultura do patógeno em TSB-YE e adicionado ao TSA semi-sólido, preparado com metade da proporção indicada pelo fabricante e adicionado como sobrecamada às placas contendo as cepas de BAL. Após solidificação da sobrecamada, as placas foram incubadas a 30°C para *L. monocytogenes* e 35°C para *E. coli* por 48h. Considerou-se antagonistas as colônias em torno das quais se formou um halo translúcido, provocado pela inibição de crescimento do patógeno semeado na sobre-camada. Halos bem definidos foram classificados como inibição total e halos difusos, foram classificados como inibição parcial (NERO, 2005)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em nenhuma amostra de leite foi detectada a presença de *L. monocytogenes*. As contagens de BAL variaram de 11.000 a 9.900.000 UFC/mL com média de 1.492.178 UFC/mL (Tabela 1).

Tabela 1: Distribuição das amostras de leite cru, provenientes da região agreste de Pernambuco, de acordo com os resultados de contagens bactérias ácido lácticas.

Faixa de Contagem em UFC/mL	n (%)
< 1000	0 (0,0)
1.000 + 10.000	0 (0,0)
10.000 + 100.000	13 (28,9)
100.000 + 1.000.000	13 (28,9)
= 1.000.000	19 (42,2)
Total	45 (100,0)

A Tabela 2 mostra os resultados dos testes de antagonismo realizados com as culturas de BAL isoladas das amostras de leite cru em relação à *L. monocytogenes* e *E. coli*.

Tabela 2: Frequência de Bactérias Ácido Láticas com antagonismo total, parcial e não antagonistas a *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* isoladas de 45 amostras de leite cru provenientes da região agreste de Pernambuco.

	Atividade antagonista em relação a			
	<i>Listeria monocytogenes</i>		<i>Escherichia coli</i>	
	n	%	n	%
Culturas antagonistas	549	81,8	258	38,5
Total	410	61,1	0	0
Parcial	139	20,7	258	38,5
Culturas não antagonistas	122	18,2	413	61,5
Total	671	100	671	100

Considerando à atividade antagonista em relação a *L. monocytogenes*, 549 (81,8%) culturas apresentaram esta atividade, sendo que 410 (61,1%) apresentaram inibição total e 139 (20,7%) inibição parcial. Considerando o antagonismo a *E. coli*, 258 (38,5) culturas apresentaram antagonismo, sendo todas com inibição parcial. Observou-se que a frequência e intensidade do antagonismo das BAL foi maior em relação à *L. monocytogenes* do que à *E. coli*.

Considerando o antagonismo para os dois patógenos 186 (27,7%) culturas apresentaram antagonismo contra ambos, 363 (54,1%) somente contra *L. monocytogenes*, 72 (10,7%) apenas para *E. coli* e 50 (7,5%) colônias não apresentaram antagonismo para ambos.

Vários estudos também comprovam a atividade inibitória das BAL presentes em queijos em relação a *L. monocytogenes*, sendo escassos este tipo de estudo em leite.

Nero et al. (2005) encontraram uma menor frequência de culturas isoladas de leite cru com atividade antagonista em relação a *L. monocytogenes*. Os pesquisadores isolaram 360 culturas de 15 amostras de leite cru, coletadas na recepção de um laticínio, e 91 (25,5%) apresentaram antagonismo, sendo que 11 (3,1%) foram classificadas como inibição total e 80 (22,2%) classificadas como inibição parcial.

CONCLUSÕES

A alta frequência de BAL com capacidade antagonista a *L. monocytogenes* pode ser responsável pela ausência deste patógeno nas amostras de leite estudadas.

As BAL presentes naturalmente no leite cru auxiliam na segurança microbiológica do produto.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 30.691, de 29 de maio 1952. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Rio de Janeiro, 7 jun. 1952, p.10.785.

CHAMBERS, J. V. The microbiology of raw milk. In: ROBINSON, R.K. **Dairy microbiology Handbook: The microbiology of milk and milk products**. 3. ed. New York: John Wiley and Sons, 2002. p.39-90

GUERRA, M. M.; MCLAUCHLIN, J.; BERNARDO, F. A. *Listeria* in ready-to-eat and unprocessed foods produced in Portugal. **Food Microbiology**, London, v. 18,n.4, p.423-429, ago. 2001.

HUGAS, M. Bacteriogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. **Meat Science.**, Barking, v.49, s.1, p.S139-S150, 1998.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 10 jan. 2008.

JAY, J. M. Foods with low numbers of microorganisms may not be the safest foods OR, why did human listeriosis and hemorrhagic colitis become foodborne diseases? **Dairy Food and Environmental Sanitation**, Ames, v.15, n.11, p.674-677, 1995.

LEWUS, C. B.; MONTVILLE, T. J. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.13, n.2, p.145-150, jun. 1991.

NERO, L. A. ***Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. em leite cru produzido em quatro regiões leiteiras no Brasil: ocorrência e fatores que interferem na sua detecção**. 2005. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

NERO, L. A.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; ORTOLANI, M. B. T.; TAMANINI, R.; FRANCO, B. D. G. M. Comparison of petrifilm aerobic count plates and de Man–Rogosa–Sharpe agar for enumeration of lactic acid bacteria. **Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology**, Trumbull, v.14, n.3, p.249-257, set. 2006