



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76
Recredenciamento pelo Decreto nº 17.228 de 25/11/2016



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENAÇÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

XXIII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS SEMANA NACIONAL DE CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA - 2019

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGÔNICA DE BACTÉRIAS LÁTICAS SOBRE DIFERENTES LINHAGENS DE *ESCHERICHIA COLI*

Nathalee Santos dos Santos¹; Elinalva Maciel Paulo²; Antônio de Oliveira Costa Neto³

1. Bolsista PROBIC/UEFS, Graduando em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: nathaleesantos@hotmail.com
2. Orientador, Departamento de Ciências biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: elinalvamaciel@yahoo.com.br
3. Participante do projeto, Departamento de Ciências biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: adocneto@yahoo.com.br

PALAVRAS-CHAVE: bactérias láticas; antagonismo; estatística.

INTRODUÇÃO

As Bactérias Ácido Láticas (BALs) são microrganismos naturalmente encontrados em vários alimentos e possuem importância no controle de microrganismos patogênicos, agindo por exclusão competitiva ou através de uma gama de substâncias, produtos do seu metabolismo, com potencial antimicrobiano, que afetam micro-organismos potencialmente patogênicos, interferindo na sua capacidade de sobrevivência (bactericida) e/ou multiplicação (bacteriostática) (TAMANINI, 2008).

A atividade antagonista de espécies de bactérias ácido láticas contra microrganismos indesejáveis permite uma importante perspectiva tecnológica de utilização desses microrganismos para a conservação de alimentos e o controle de patógenos. Essa atividade inibitória se deve à fermentação da lactose do leite em ácido lático e às outras substâncias, as quais determinam diferentes atividades bactericidas e bacteriostáticas (ALM, 1991).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo a avaliação do potencial antagonista de espécies de BALs, frente a cepas de *Escherichia coli*, através de três métodos de determinação de inibição microbiana, para averiguar, a melhor técnica de difusão dos metabólitos, que permita uma boa conduta metodológica em uma investigação acurada do antagonismo realizado pelas BALs.

MATERIAL E MÉTODOS OU METODOLOGIA (ou equivalente)

Os métodos de avaliação *in vitro* da atividade antagonista das bactérias láticas frente a cepas de *E. coli* foram: Spot on the lawn, Difusão em disco, e cultivo misto em cultura líquida (co-cultivo). As bactérias láticas utilizadas foram *Lactobacilos paracasei*, *Streptococcus faecium*, e duas cepas de *Lactobacillus plantarum* e as cepas de *E. coli* foram provenientes da bacterioteca do LAMASP, sendo estas isoladas diferentes substratos (urina de humano, fezes de bovino, água de coco e água de bebedouro de bovino). Primeiramente foi realizada a etapa de reativação das BALs no caldo MRS (DE MAN: ROGOSA: SCHARP(1960), com incubação à 37 °C por 24 horas para as bactérias láticas, sendo em seguida realizados os testes preliminares para checagem destas bactérias (coloração de Gram e teste de catalase). As cepas de *E. coli*

foram ativadas em caldo EC durante 24 horas a 45°C, e realizado os testes para confirmação em Agar Eosina Azul de Metileno (EMB).

Testes de antagonismo

O método da cultura mista (SILVA,2015), baseia-se no co-cultivo entre dois tipos diferentes de microrganismos. Neste ensaio foi inoculado 50µL da cultura ativa de cada cepa de *E.coli* em 5mL da cultura de bactérias lácticas ativadas por 48h em caldo MRS. Estas misturas (bactéria lácticas + *E. coli*) foram acondicionadas imediatamente em geladeira por 24h e após este período de exposição, foi transferida alíquota de 100µL da mistura em 10mL de caldo EC, e em seguida, foram realizadas as leituras da absorbância da concentração de células microbiana pelo espectrofotômetro UV-VIS (Quimis) no comprimento de onda de 600nm, após a incubação em 35°C por 24h, 8 dias e 15 dias.

No método de difusão em disco descrita em 1966, por Bauer e Kirby (ANVISA, 2008), foram preparadas suspensões das culturas de *E. coli*, em solução salina equivalente a 0,5 da escala Mc Farland. Em seguida, essa suspensão com as respectivas cepas de *E. coli*, foram semeadas por superfície com swab estéril, no Ágar nutriente, sendo as placas, incubadas por 35°C por 30 minutos. Após foram depositados discos de papel esterilizados (5mm de diâmetro) contendo cerca de 5µL das suspensões das bactérias lácticas (*Lactobacilos paracasei*, *Streptococcus faecium*, e duas cepas de *Lactobacillus plantarum*) ativas na placa de Petri contendo ágar nutriente. A interpretação dos resultados foi realizada após 48 h de incubação em estufa bacteriológica, a 35°C, em que foi observada a presença ou ausência do halo de inibição.

No método spot-on-the-law (SILVA, 2015) foram semeadas alíquotas de 5 µL das culturas de BALs, na superfície do ágar MRS, sendo incubadas, a 37°C por 48 horas. Após o período de incubação, as placas foram retiradas, e, na posição invertida, em cada tampa, foi colocado algodão embebido com 0,5 ml de clorofórmio para inativar as colônias. Depois de 30 minutos as placas foram levadas para a estufa a 37°C por 1 hora para evaporação do restante do clorofórmio, em seguida, em todas as placas foram adicionados 5 mL do meio Ágar nutriente semi-sólido (0,8% de agar), inoculado com a mistura de 100 µL da suspensão bacteriana de *Escherichia coli* com turbidez da escala 0,5 McFarland. Todas as placas foram novamente incubadas a 37°C por 24 horas. Após o período de incubação, foi observado se houve ou não o aparecimento de halo de inibição ao redor das culturas lácticas.

No controle negativo (ausência de crescimento de *E. coli*) foi utilizado a água destilada estéril, e no o controle positivo (presença de crescimento de *E. coli*), utilizou-se o antibiótico Ácido Nalidíxico (Naluril). Os dados foram submetidos à análise estatística, utilizando-se delineamento estatístico através da análise de Variância não paramétrica, utilizando Kruskal - Wall e quando foi detectado diferença, foi usado o teste de Dunn's post hoc. Para a comparação das médias para os dados relacionados entre os períodos analisados houve a necessidade da realização do teste de Friedman e como consequência Wilcoxon pairwise para verificar a existência das diferenças entre as médias. Para a análise estatística dos dados foi utilizado o software Past 3.x versão 3,25 (the Past of the Future).

Todos os ensaios foram realizados em triplicatas.

RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO (ou Análise e discussão dos resultados)

As bactérias (*L. plantarum* ABX 5.2, *L. paracasei* LVdg, *S. faecium* LVdp e *L. Plantarum* LVMH4) foram confirmadas pelos testes preliminares como pertencentes ao grupo das bactérias lácticas, cuja característica consiste em apresentar no teste de coloração de Gram como células arroxeadas (Gram positivas), e não serem produtoras de catalase. *S. faecium* LVdp apresentou morfologia de cocos e as demais BAL apresentaram morfologia de bacilos, o que era esperado. As amostras das diferentes cepas de *E. coli* inoculadas em caldo EC se mostram positivas; apresentando turvação do meio e produção de gás. Posteriormente as amostras que foram inoculadas em meio ágar EMB (Eosin Methylene Blue), em que apresentaram crescimento (reflexo verde metálico ou pontos enegrecidos).

No teste de Difusão de disco foi possível observar a produção de halo de inibição das culturas de BALs, sobre as diferentes cepas de *E. coli*. Neste teste, somente duas

cepas de *E. coli* (proveniente de humano e de água de bebedouro de bovino) foram inibidas por cepas de BALs, sendo que *E. coli* proveniente de humano foi inibida por todas as cepas de BALs, formando os seguintes halos de inibição: *Lactobacillus plantarum* ABX 5.2 (3,0mm); *Lactobacillus paracasei* LVdg (9,2 mm); *Streptococcus faecium* LVdp (2,8 mm) e *Lactobacillus plantarum* LVMH4 (3,0 mm). A *E. coli* proveniente de água de bebedouro de bovino só foi inibida pelos *Lactobacillus paracasei* LVdg (2,5 mm) e *Lactobacillus plantarum* LVMH4 (3,7 mm). No teste controle com o antibiótico Ácido – nalidíxico 30µg, (20mm), houve inibição intermediária. Através do delineamento estatístico para a média entre os valores para *E. coli* proveniente da urina de humano e *E. coli* proveniente de água de bebedouro para bovinos não indicou diferenças significativas ($p>0,05$) para as análises com as médias dos halos para os testes de Kruskal-wall e não houve diferenças entre as médias dos halos para Dunn's post hoc. Para *E. coli* proveniente de fezes de bovino e de água de coco não houve diferenças significativas entre as médias ($p<0,05$) para os testes de Kruskal-wall e para o teste de Dunn's post hoc. Estes resultados foram semelhantes aos de Sé (2016), que ao confrontar in vitro bactérias lácticas com sorotipos de *E. coli* patogênicas isoladas de efluentes residenciais observou a formação de discreto halo de inibição de 2mm para *Lactobacillus plantarum*.

No Método de cultivo Misto observou-se que o número de células de *E. coli* apresentou aumento de crescimento até o último período analisado (15 dias) para todas as cepas, na leitura pelo espectrofotômetro. Este mesmo resultado de não inibição das BALs lácticas sobre cepas de *E. coli* foi encontrado por Silva (2015). Sendo que a *E. coli* proveniente da Água de coco apresentou menor crescimento em relação aos resultados obtidos para as outras cepas de *E. coli* testadas, inferindo que houve um certo tipo de inibição. Portanto, apesar das culturas de BALs ficarem em maior contato com as células das *E. coli*, o que iria proporcionar a penetração dos metabolitos nas células destas bactérias, ainda assim, não conseguiram impedir totalmente o seu crescimento.

Para a análise de dados independentes com a *E. coli* proveniente de urina de humanos na análise de Kruskal-Wallis antes de 24 horas e 15 dias de incubação houveram diferenças significativas ($p<0,05$), logo para ambos o teste de Dunn's apresentaram diferenças significativas entre *L. Plantarum* LVMH4 e *L. Plantarum* ABX 5.2, e entre *L. Plantarum* ABX 5.2 e *L. Paracasei* LVdg. Com 24 horas e 8 dias de incubação resultaram-se em ($p>0,05$), logo não houve diferença significativa entre as medianas das amostras, assim como para o teste de Dunn's. Na análise com a *E. coli* proveniente das fezes de bovinos antes de 24h e em 15 dias os dados estatísticos resultaram em diferenças significativas para as médias analisadas ($p<0,05$), e para o teste de Dunn's para 24 horas houve diferenças entre o *L. Plantarum* ABX 5.2 e *S. faecium* LVdp, assim como *L. Plantarum* ABX 5.2 e *L. Paracasei* LVdg, e com 15 dias entre *S. faecium* LVdp e *L. Plantarum* LVMH4, e para *S. faecium* LVdp e *L. Plantarum* ABX 5.2. A análise para a *E. coli* proveniente da água de bebedouro para bovinos antes de 24h e 15 dias a análise das concentrações médias apresentaram diferenças significativas ($p<0,05$), e para Dunn's em 24 horas houveram diferenças entre *L. Plantarum* ABX 5.2. e *L. Paracasei* LVdg, e em 15 dias houveram diferenças entre *L. Paracasei* LVdg e *S. faecium* LVdp, e entre *L. Plantarum* ABX 5.2. e *L. Paracasei* LVdg. Para a *E. coli* proveniente da água de coco antes de 24h e 8 dias existiram diferenças significativas ($p<0,05$) para dos dados analisados, assim para Dunn's em que 24 horas houveram diferenças entre *L. Plantarum* ABX 5.2 e *L. Plantarum* LVMH4, e entre *L. Paracasei* LVdg e *L. Plantarum* LVMH4, e para o teste de Dunn's em 8 dias para *L. Paracasei* LVdg e *S. faecium* LVdp, e entre *L. Paracasei* LVdg e *Lactobacillus Plantarum* ABX 5.2. Após 24 horas e 15 dias não houveram diferenças significativas ($p>0,05$) entre as médias das concentrações analisadas e para o teste de Dunn's.

Para a análise de dados relacionados houve diferença significativa para todas as concentrações referentes a *E. coli* proveniente da urina de humanos, para a *E. coli* proveniente das fezes de bovinos, para *E. coli* proveniente da água de bebedouro de bovinos e para *E. coli* proveniente da água de coco, e as BALs independentes até o último período analisado (15 dias). A análise por Friedman test obteve ($p<0,05$), mas os testes posteriores como o de Wilcoxon pairwise não detectaram diferenças.

No método Spot-on-the-lawn não houve inibição das BALs testadas com nenhuma das cepas de *E. coli*. No controle positivo observou-se a inibição intermediária para as bactérias

analisadas para *E. coli* proveniente de bovino (17, 5mm de diâmetro), *E. coli* proveniente de urina de humanos (19,5 mm), *E. coli* proveniente de água de bebedouro para bovinos (20,0 mm) e *E. coli* proveniente de água de coco (19,0mm). No delineamento estatístico ao analisar a média entre os valores resultou-se em ($p < 0,05$) com isso não houve diferenças significativas para as análises das BALs em comparação aos patógenos analisados. Estes resultados corroboraram com Sawitzki et al. (2009) que ao testarem linhagens de *Lactobacillus plantarum* isoladas de linguiças artesanais fermentadas e verificaram que das cepas analisadas nenhuma inibiu a *E. coli* ATCC 25922.

CONSIDERAÇÕES FINAIS (ou Conclusão)

Neste trabalho, através dos resultados obtidos, é possível inferir que dentre os três testes de antagonismo testados, a técnica da difusão em disco apresentou melhor resultado, pois foi demonstrado efeito inibitório de algumas cepas de bactérias lácticas frente a algumas cepas de *Escherichia coli*, não sendo observado este resultado no método de cultivo misto em cultura líquida e nem no método Spot-on-the-lawn.

REFERÊNCIAS

- ALM, L. The therapeutic effects of various cultures: an overview. In: ROBINSON, R. K. Therapeutic properties of fermented milks. London: Elsevier, 1991. p.45-64. ALEXANDRE, D. P.; SILVA, M. R.; SOUZA, M. R.; Anais IV SIMPAC - Volume 4 - n. 1 - Viçosa-MG - jan. - dez. 2012 - p. 81-86 Atividade antagonista de bactérias lácticas ... 85 Revista Científica Univiçosa - Volume 3 - n. 1 - Viçosa-MG - jan. - dez. 2013 - p. 81-86 SANTOS, W. L. M. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo de minas artesanal do Serro (MG) frente a microrganismos indicadores. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.54, n.4, 2002.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Interpretação de dados microbiológicos. Métodos para o TSA - Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos. Disco-difusão. AT Mracional, 2008.
- DE MAN, J.C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M.E. A medium for cultivation of lactobacilli. J. Appl. Bacteriol., 23,130-135, 1960.
- SÉ, G.A.A. **Determinação da atividade antagonista de bactérias lácticas frente às linhagens de *Escherichia coli* isoladas de dejetos residenciais.** (Trabalho de Iniciação Científica) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia, 2016. Disponível em: <file:///C:/Users/User/Downloads/3056-12564-1-PB%20(9).pdf> Acesso em: 01.a gos.2019.
- SAWITZKI, M. C.; FIORENTINI, A. M.; BERTOL, T. M.; SANT'ANNA, E. S. *Lactobacillus plantarum* strains isolated from naturally fermented sausages and their technological properties for application as starter cultures. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 29, n. 2, p. 340-345, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-20612009000200016&script=sci_arttext>. Acesso em: 11 ago. 2019.
- SILVA, J. R. Avaliação de métodos "in vitro" para detecção de bactérias lácticas com potencial de atividade antagonista frente à enteropatógenos. 2015. 27p. (Monografia- Trabalho de conclusão de curso)- Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia, 2015.
- TAMANINI, R. Bactérias ácido lácticas com atividade antagonista a *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* em leite cru produzido no estado de Pernambuco. Dissertação (Pós graduação em Ciência animal) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, p.61. 2008.