

SELEÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS ISOLADAS DE SUBSTRATO DA REGIÃO DO SEMIÁRIDO BAIANO COM POTENCIAL E/OU EFEITO PROBIÓTICO

Mahysa Ferreira Costa¹; Elinalva Maciel Paulo²

1. Bolsista PIBIC/FAPESB, Graduando em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: mahysaferreiracosta@yahoo.com.br

2. Orientador, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: elinalvamaciel@yahoo.com.br

PALAVRAS-CHAVE: Bactérias láticas; semiárido; inovação tecnológica; probiótico.

INTRODUÇÃO

Os produtos probióticos são constituídos principalmente pelas bactérias ácido láticas (BAL) e pelos bifidobacterium, pois esses micro-organismos são encontrados na microbiota intestinal humana, existindo vários trabalhos que demonstram sua eficácia e sua tolerância às barreiras biológicas do indivíduo. Entre as espécies de interesses utilizadas pelas indústrias de laticínios na elaboração de iogurte, leite fermentado, queijos e diversos derivados lácteos, encontramos basicamente as espécies do gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Streptococcus*. *Streptococcus thermophilus*. (MARTIN, 2002). As exigências que um micro-organismo probiótico deve atender são: resistência ao ambiente ácido estomacal, à bile e às enzimas pancreáticas, adesão às células da mucosa intestinal, capacidade de colonização, ausências de translocação, ser um habitante normal das espécies alvo, exercer efeito antagônico sobre patógenos, capaz de exercer efeitos benéficos à saúde do hospedeiro e viabilidade populacional elevada, apresentando em torno de 10^{-6} – 10^{-8} UFC por grama do produto (ANVISA, 2002).

Diante do crescente interesse da população por alimentos saudáveis, o mercado vem estimulando o aumento da produção de alimentos funcionais, sendo, benéficos à saúde humana por estarem relacionados à presença de bactérias láticas (OLIVEIRA; SILVA, 2011). Portanto, pode-se inferir que o semiárido baiano possui uma diversidade de micro-organismos que poderá ser utilizado na elaboração de diferentes produtos biotecnológicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Micro-organismo e checagem da pureza da cultura láctica: Foram utilizados isolados não identificados de bactérias láticas provenientes de produtos vegetais e de leite pertencentes à bacterioteca do LAMASP. Bactérias estas, provenientes de substratos vegetais (tomate, uva e maçã) e do leite.

Os isolados que estavam preservados no meio LDR 20% (leite desnatado reconstituído 20%) foram ativados três dias consecutivos no caldo MRS (DE MAN; ROGOSA; SHARPE, 1960). Incubados a 35° C por 24-72h e realizado o teste preliminar para bactérias láticas (AXELSSON, 1993): o teste de catalase (mistura da colônia em uma gota de peróxido de oxigênio 3%) e coloração de Gram. Culturas que apresentaram catalase negativa e na coloração de Gram morfologia de cocos ou bacilos (culturas individuais) de coloração roxa (positiva) foram confirmadas como puras para bactérias láticas.

Identificação fenotípica (BERGEY`S, 2009): Foram realizados testes de identificação dos gêneros das linhagens de bactérias lácticas isoladas realizando os seguintes testes: produção de gás a partir da glicose, capacidade em coagular o leite a 15 e 45° C, crescimento em 4 e 8% de cloreto de sódio e redução do nitrato. Sendo todos os testes realizados em triplicata.

Teste de Antagonismo (BERGEY`S, 2009): Para avaliar a atividade antagonista foi utilizado o método de difusão em disco, sendo preparada suspensões das culturas de *Escherichia coli* e de *Salmonella* sp., equivalente a 0,5 da escala Mc Farland. Em seguida, uma alíquota de 100 µL desta suspensão foi inoculada e espalhada com um cotonete esterilizado sobre toda a superfície do Ágar Nutriente. Após este procedimento foram colocados discos sobre a superfície do meio e, em seguida, estes foram impregnados com 10µ de culturas ativas (18h) dos isolados de bactérias lácticas em confronto. As placas foram incubadas a 35°C por 24h e a leitura dos resultados foi realizada através da observação da presença de halo de inibição. Este procedimento foi realizado em triplicata.

Tolerância às condições gástricas (Resistência a condições ácidas) (MEIRA et al, 2010): A resistência do isolado sob condição ácida foi avaliada em caldo MRS (pH 6,5) e caldo MRS ajustado a pH 3,0 com HCl concentrado. Os tubos contendo o meio de cultivo com pH diferentes foram deixadas durante 3h na temperatura ambiente e, em seguida, foram semeados pelo método "pour plate", incubados a 35°C/48h, sendo observado o crescimento das placas. Todos os testes foram realizados em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As bactérias lácticas pertencentes à bacterioteca do Lamasp foram identificadas com morfologia bacilar, às isoladas de substratos vegetais (uva, maçã e tomate), e morfologia de cocos a bactéria isolada do leite. Todas as bactérias apresentaram-se como gram positivas, e no teste de catalase, resultado negativo. A partir da leitura dos testes preliminares com 48h de inoculado, as bactérias lácticas apresentaram resultado negativo para o teste de produção de gás, sendo caracterizadas como homofermentativas, pela ausência de produção de gás. No teste de halotolerância a 8% (45°C) as bactérias apresentaram pouco crescimento, contudo, a 4% (15°C) nenhuma das bactérias avaliadas apresentaram crescimento. Na concentração de 6% (35°C) todas as bactérias apresentaram um bom crescimento. Neste teste de halotolerância, a 45°C e 15°C, as bactérias por se encontraram em situação de estresse, com temperatura diferente do seu ótimo e em um meio concentrado de sal (NaCl), acabou dificultando ou até mesmo impedindo o crescimento de tais bactérias sob tais condições. Diante do resultado obtido, podemos classificar as bactérias lácticas isoladas, do leite e de vegetais, como termodúricas. Para o teste de lactofermentação a 45°C todas as bactérias coagularam o meio, sem soro, na temperatura de 15°C as bactérias do tomate e do leite não obtiveram nenhum crescimento, a uva e a bactéria da maçã apresentaram pouco crescimento, com coágulo não firme. Na temperatura de 35°C todas as bactérias apresentaram formação de coágulo e pouco ou nenhum soro.

Como resultado no teste do nitrato, todas as bactérias láticas apresentaram resultado negativo, não alterando a coloração do meio quando acrescido dos reagentes alfa-naftol e ácido sulfanílico.

No teste de antagonismo as bactérias láticas em questão não formaram halo de inibição contra as bactérias patogênicas *E. coli* e *Salmonella sp.* Quanto ao teste de tolerância às condições gástricas, as bactérias láticas apresentaram crescimento quando submetidas ao meio acidificado, pH 3,0, durante 3 horas. Sendo assim, provavelmente conseguirão resistir às condições gástricas durante o período de digestão do nosso organismo. Todos os testes foram realizados em triplicata.

As bactérias láticas avaliadas não conseguiram inibir os patógenos intestinais, porém não são consideradas inviáveis para utilização de benefícios do hospedeiro, sendo capazes de ocasionar melhoras no sistema imunológico, já que resistem as condições fisiológicas normais do hospedeiro. No entanto, são necessários mais pesquisas e testes com as bactérias.

Tabela: Testes e resultados

Bactérias Láticas	Halotolerância			Produção de gás
	4%	6%	8%	
Uva	Não houve crescimento	Bom crescimento	Pouco crescimento	Negativo
Maçã	Não houve crescimento	Bom crescimento	Pouco crescimento	Negativo
Tomate	Não houve crescimento	Bom crescimento	Pouco crescimento	Negativo
Leite	Não houve crescimento	Bom crescimento	Pouco crescimento	Negativo

Bactérias Láticas	Lactofermentação		
	15°C	35°C	45°C
Uva	Coágulo não firme	Coágulo firme e sem soro	Coágulo firme e sem soro
Maçã	Coágulo não firme	Coágulo firme e sem soro	Coágulo firme e sem soro
Tomate	Não houve crescimento	Coágulo firme e sem soro	Coágulo não firme

Leite	Não houve crescimento	Coágulo firme e sem soro	Coágulo firme e sem soro
--------------	-----------------------	--------------------------	--------------------------

Bactérias Láticas	Teste de Antagonismo		Teste das condições gástricas	
	E. coli	Salmonela sp.	pH 6,5	pH 3,0
Uva				
Maçã	Nenhuma apresentou halo de inibição	Nenhuma apresentou halo de inibição	Apresentaram ótimo crescimento	Cresceram
Tomate				
Leite				

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A benéfica influência dos probióticos diante da microbiota gastrointestinal inclui fatores como efeitos antagônicos, competição e efeitos imunológicos, resultando em um aumento da resistência contra patógenos. Sendo assim, utilizar culturas probióticas propicia a multiplicação de bactérias benéficas, em detrimento à proliferação de bactérias potencialmente prejudiciais, reforçando os mecanismos naturais de defesa do hospedeiro. No entanto, as cepas testadas não atenderam ao critério efeito antagônico sobre os patógenos intestinais, mas não inviabilizaram a sua utilização para outros benefícios do hospedeiro, a exemplo da reposição da microbiota intestinal ou a estimulação do sistema imunológico, uma vez que toleraram as condições fisiológicas normalmente existentes no hospedeiro.

REFERÊNCIAS

- AXELSSON, L. 1993. **Lactic acid bacteria: classification and physiology**. In: SALMINEN, S. VON WRIGHT, A. Lactic acid bacteria. New York: Marcel Dekker, p.1 -63.
- BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY. The Firmicutes, vol. 3, 2009.
- DE MAN, J.C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M.E. **A medium for cultivation of lactobacilli**. *J. Appl. Bacteriol.*, 23,130-135, 1960.
- Informe Técnico ANVISA nº 1, de 15 de janeiro de 2002. Assunto: Definição de categorias de alimentos de acordo com o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde.
- MEIRA, S. M. M. **Identificação e resistência a barreiras biológicas de bactérias lácticas isoladas de leite e queijo de ovelha**. 2010
- OLIVEIRA, C. P. e SILVA, J. A. **LEITE FERMENTADO PROBIÓTICO E SUAS IMPLICAÇÕES NA SAÚDE**. Revista Verde (Mossoró – RN – Brasil) v.6, n.3, p. 25 -31 julho / setembro de 2011.