

## CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E IDENTIFICAÇÃO DE GENES CODIFICADORES DE BACTERIOCINAS E FATORES DE VIRULÊNCIA

**Palavras-Chave:** BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS; BACTERIOCINAS; BIOPRESERVAÇÃO

**Autores(as):** Giovanna Victória Silveira; Jaqueline Milagres de Almeida; Nathália Cristina Cirone Silva.

### INTRODUÇÃO:

Garantir a segurança microbiológica dos alimentos é um desafio para a indústria alimentícia, visto que mesmo com a existência de inúmeros métodos de preservação ainda se tem elevados índices de doenças vinculadas ao consumo de alimentos. Diversos microrganismos possuem a capacidade de causar toxinfecções alimentares, como: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella sp.*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, entre outros (MARTINS, 2007). Desta forma, a busca por técnicas alternativas de preservação é importante para que, aliadas às tecnologias existentes, possibilite disponibilizar alimentos de qualidade e seguros para o consumo (OLIVEIRA, 2012).

As bactérias do ácido láctico (BALs) representam um amplo grupo de microrganismos que se apresenta na forma de cocos ou bastonetes, gram-positivos, catalase negativa, não esporogênicos, sem motilidade, ácido tolerantes, microaerófilas e anaeróbias facultativas sendo conhecidas também por atuarem como biopreservadoras, visto que são capazes de produzir uma diversidade de metabólitos primários e secundários com ação antimicrobiana (BORDIGNON, 2012). Sua atividade inibitória provém da produção de ácidos orgânicos ou a partir de compostos secundários, como peróxido de hidrogênio, diacetil, bacteriocinas e outros compostos similares (BORDIGNON, 2012).

Na indústria, as BALs possuem diversas aplicações, podendo ser utilizadas como probióticos e para modificar as características sensoriais dos alimentos, como sabor, odor e textura. Um exemplo de sua aplicação é a fermentação, que resulta na redução do pH devido à produção de ácidos orgânicos, especialmente o ácido láctico, responsável pelo principal efeito antagonista contra diferentes microrganismos (NOGUEIRA, 2010). Desta forma, o estudo de biopreservadores, como as BALs, são de grande valia para indústria alimentícia, uma vez que a ação combinada do ácido láctico e de bacteriocinas apresenta resultados satisfatórios contra bactérias indesejáveis nos alimentos além disso, são consideradas seguras e benéficas aos consumidores.

Neste trabalho o objetivo foi verificar a capacidade de acidificação, sobrevivência em condições gastrointestinais simuladas *in vitro* e identificação de genes de virulência e produtores de bacteriocinas de BALs anteriormente isoladas e identificadas com ação antimicrobiana.

## METODOLOGIA:

A avaliação da capacidade de acidificação das BALs, foi realizada de acordo com Panebianco et al. (2021), onde os isolados de BALs foram pré-cultivadas em caldo MRS a 37 °C/24h, das quais 1% (v/v) em uma concentração de  $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> foi adicionada em 50 mL de leite UHT integral. Esta mistura foi incubada a 37 °C e a acidificação foi determinada pela medição do pH em 0, 6, 12, 24 e 48 horas após incubação.

Seguindo a metodologia descrita por (Garcia et al., 2016; Gizachew et al., 2023), a análise de sobrevivência dos isolados em condições ácidas que simulam o trato gastrointestinal foi realizada. Os isolados foram cultivados em caldo MRS a 37 °C/18h, centrifugados a (4000 x g, 10 min, 4 °C), lavados duas vezes com PBS e ajustados para o padrão 0,5 de McFarland correspondente a  $1,5 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Para determinar a sobrevivência dos isolados em condições ácidas, foram adicionados 100 µL da suspensão padronizada anteriormente a 900 µL de PBS estéril, com pH ajustado para 3,0 (usando HCl 1M), e então incubados sob agitação (150 rpm) a 37 °C/3h, simulando também o tempo de permanência da comida no estômago. Após a incubação, foram coletados 50 µL de cada isolado e diluídos em séries de 10, espalhados em triplicata em placas contendo ágar MRS para a contagem e enumeração das células viáveis.

Para determinar a sobrevivência dos isolados em solução de sal biliar, foram adicionados 100 µL da suspensão padronizada anteriormente a 900 µL de PBS estéril, com pH ajustado para 8,0, suplementado com 0,5% (V/V) de sais biliares. Esta solução foi incubada sob agitação (150 rpm) a 37 °C/4 h, mimetizando o tempo de permanência do alimento no intestino delgado.

O percentual de sobrevivência das células foi calculado da seguinte maneira: % sobrevivência celular =  $(\log \text{UFC}_T / \log \text{UFC}_C) \times 100$ , onde  $\text{UFC}_T$  e  $\text{UFC}_C$  representam a contagem viável total de isolados de BAL antes e depois, respectivamente, da incubação sob condições gastrointestinais simuladas.

Por fim, foi investigado a presença de genes que codificam fatores de virulência (*gelE*, *hyl*, *asa1*, *esp*, *cylA*, e *ace*) e genes relacionados à produção de bacteriocinas (*plnNC8*, *plnS*, *plnW*, *nisZ-prom-F*, *lact481*, *lcn972*, *lactGQ*, *lcnAB-F*, *lcnAB*, *brevicin174A*, *plnA*, *plnEF*, *pediocinPA-1*) por amplificação dos genes por PCR utilizando primers específicos e as condições descritas por Amaral et al (2017). Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em 1 % (wt/vol) de géis de agarose em tampão Tris/borato/EDTA (TBE) e os géis corados em tampão TBE contendo Syber safe (ThermoFisher).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A maior redução no valor de pH pelos isolados foi observada entre 24h e 48h, com um pH inicial em torno de 6,8 (0h) e finalizando o processo de incubação com valores de pH de até 4,74. Os

isolados dos gêneros *Lactobacillus* (LPA1149a, LR1326a) e *Lactococcus* (LCG1145b) apresentaram a maior velocidade de redução do pH neste intervalo, chegando a uma redução de até 0,843 pH.h<sup>-1</sup>. Esses mesmos isolados registraram um aumento de até 3 logs durante este período (Figura 1).

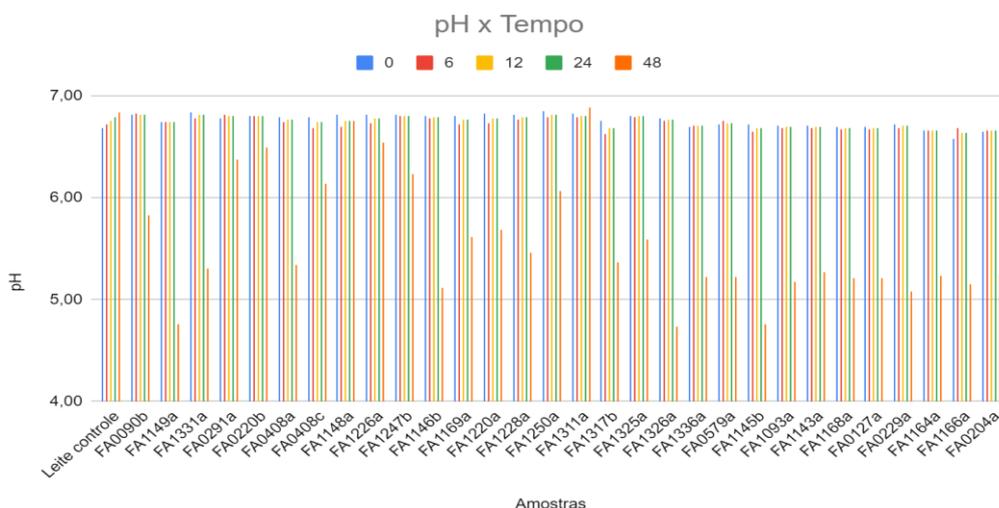


Figura 1- Taxa de acidificação.

Como descrito na Figura 2, todos os isolados sobreviveram aos testes de tolerância a pH 3,0 e sais biliares (0,5%). No entanto, o teste de tolerância em pH 3,0 demonstrou uma diminuição na contagem de células viáveis, com taxas de sobrevivência variando de 34,2% a 69,9% durante o período de incubação de 3h. Nesta condição, os isolados com maior taxa de sobrevivência ( $P \leq 0,05$ ) foram LR220a, LP220b, LCL1143a e LCG1145b, variando de 69,4% a 69,9%, compreendendo espécies de *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* e *Lactococcus garvieae*.

Um total de 11 isolados apresentou taxa de sobrevivência acima de 56,3% até 67,8%, sendo que 4 pertenciam ao gênero *Lactobacillus* e 2 ao gênero *Lactococcus*. Espécies dos gêneros *Pediococcus* e *Weissella* também apresentaram boas taxas de sobrevivência. De maneira geral, a exposição dos isolados a uma concentração de 0,5% de sais biliares não resultou em diminuições significativas ( $P \leq 0,05$ ) na contagem de células viáveis durante 4h de incubação. A maior redução na contagem de células viáveis foi de 16,3%, sendo que os isolados LCL1143a e LCL1168a apresentaram as maiores taxas de sobrevivência nesta condição (acima de 82%), representando espécies de *Lactococcus lactis*.

Do total de 30 isolados testados, apenas 6 tiveram taxa de sobrevivência abaixo de 50%. A maioria dos isolados do gênero *Lactobacillus*, incluindo *L. plantarum*, *L. rhamnosus* e *L. paracasei*, apresentaram taxas de sobrevivência de até 80,4%.

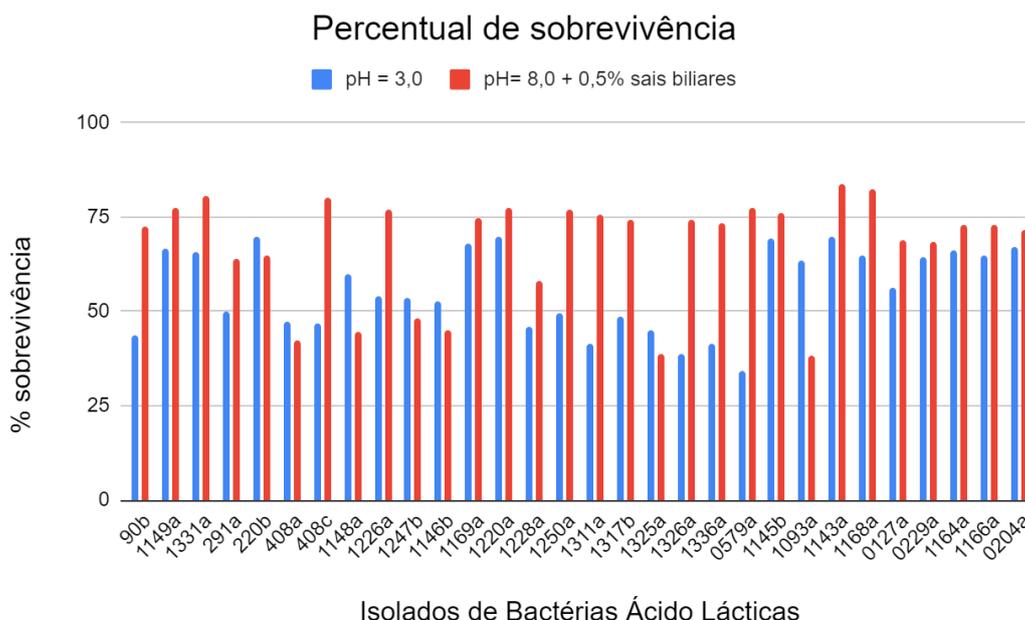


Figura 2- Percentual de sobrevivência em condições ácidas e em sais biliares.

A análise de PCR com primers específicos para genes de bacteriocina revelou a presença dos genes *plnIEF* e *plnNC8* em alguns isolados de *Lactobacillus* e *Lactococcus*. No entanto, outros genes não foram detectados em nenhum dos isolados de BALs examinados. Os isolados LPL1226a (*L. plantarum*) e LPL1247b (*L. plantarum*) apresentaram o gene *plnEF*, enquanto o isolado LR1250a (*L. rhamnosus*) apresentou tanto os genes *plnNC8* quanto *plnEF*. Esses isolados demonstraram eficácia na inibição de patógenos transmitidos por alimentos, com destaque para o isolado LR1250a, que gerou halos de inibição entre 16 e 18mm, indicando que a bacteriocina desempenha um papel significativo na ação antimicrobiana em adição a detecção de genes codificadores de plantaricina nesses isolados é interessante, pois podem ser usados na preservação de alimentos, e as bacteriocinas produzidas por BALs são geralmente reconhecidas como seguras (GRAS) (Kawahara et al., 2022).

## CONCLUSÕES:

A produção de ácidos, resultando na acidificação e redução do pH do meio, é uma das principais características das BALs. Por isso, seu uso é altamente valorizado na produção de uma variedade de alimentos fermentados. A determinação dessa capacidade é essencial devido à sua importância em processos tecnológicos onde a redução do pH do meio é necessária. Além disso, a multiplicação bacteriana é crucial para avaliar a capacidade de sobrevivência em ambientes de baixo pH, o que permite o uso dessas bactérias como culturas starters em processos biotecnológicos. A tolerância ao estresse ácido e aos sais biliares são propriedades importantes para avaliar o potencial probiótico e a capacidade das bactérias de se manterem em contagens elevadas nessas condições.

## BIBLIOGRAFIA

- AMARAL, D. M. F. et al. Enterococcus faecium and Enterococcus durans isolated from cheese: Survival in the presence of medications under simulated gastrointestinal conditions and adhesion properties. *Journal of Dairy Science*, v. 100, n. 2, p. 933-49, 2017.
- BORDIGNON JUNIOR, Sidnei Emilio. Seleção de biocompostos antimicrobianos produzidos por bactérias lácticas. 2012.
- DE ANDRADE JÚNIOR, Francisco Patricio et al. Fatores que propiciam o desenvolvimento de Staphylococcus aureus em alimentos e riscos atrelados a contaminação: uma breve revisão. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 18, n. 1, p. 89-93, 2019.
- DE OLIVEIRA, Cybelle Pereira; DE SIQUEIRA JÚNIOR, José Pinto; DA SILVA, João Andrade. Bacteriocinas como alternativa na conservação de alimentos. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 7, n. 1, p. 2, 2012.
- MARTINS, Ana Paula Melo. Pesquisa de E. coli e S. aureus em patês não industrializados comercializados no Plano Piloto–DF. 2007.
- GARCIA, E. F., Luciano, W. A., Xavier, D. E., da Costa, W. C. A., Oliveira, K. de S., Franco, O. L., de Morais Júnior, M. A., Lucena, B. T. L., Picão, R. C., Magnani, M., Saarela, M., & de Souza, E. L. (2016). Identification of lactic acid bacteria in fruit pulp processing byproducts and potential probiotic properties of selected Lactobacillus strains. *Frontiers in Microbiology*, 7(AUG), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01371>
- GIZACHEW, S., Van Beeck, W., Spacova, I., Dekeukeleire, M., Alemu, A., Woldemedhin, W. M., Mariam, S. H., Lebeer, S., & Engidawork, E. (2023). Antibacterial and Immunostimulatory Activity of Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria Isolated from Ethiopian Fermented Dairy Products. *Fermentation*, 9(3), 258. <https://doi.org/10.3390/fermentation9030258>
- Kawahara, A., Zendo, T., & Matsusaki, H. (2022). Identification and characterization of bacteriocin biosynthetic gene clusters found in multiple bacteriocins producing Lactiplantibacillus plantarum PUK6. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 133(5), 444–451. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2022.01.008>
- NOGUEIRA, Vanessa Cristina. Culturas de bactérias lácticas com propriedades probióticas e tecnológicas para aplicação como bioconservantes. 2010. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- PANEBIANCO, F., Giarratana, F., Caridi, A., Sidari, R., De Bruno, A., & Giuffrida, A. (2021). Lactic acid bacteria isolated from traditional Italian dairy products: activity against Listeria monocytogenes and modelling of microbial competition in soft cheese. *Lwt*, 137(October 2020), 110446. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110446>
- World Health Organization. (2015). WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/199350>.