



Triagem de bactérias ácido lácticas produtoras de exopolissacarídeos e avaliação da atividade antimicrobiana

Screening of lactic acid bacteria producing exopolysaccharides and evaluation of antimicrobial activity

Ana Carolina Dorado Gaertner¹, Maria Carolina de Oliveira Ribeiro²

RESUMO

As bactérias ácido lácticas (BAL) constituem um grupo de microrganismos que têm sido grandemente estudados, por possuírem propriedades probióticas e também pela capacidade de produzir compostos bioativos como os exopolissacarídeos (EPS). Podemos definir EPS como sendo polissacarídeos extracelulares produzidos por diversas bactérias e que apresentam uma diversidade de aplicações biotecnológicas e farmacêuticas, como atividade prebiótica e antimicrobiana. A atividade antimicrobiana se refere à capacidade de inibir ou eliminar o crescimento de microrganismos patogênicos. O objetivo desta pesquisa foi realizar uma triagem de bactérias ácido lácticas produtoras de exopolissacarídeos e avaliar a atividade antimicrobiana das mesmas, por meio de cepas isoladas a partir de produtos artesanais como o iogurte natural, pepino em conserva e o rejuvelac. A atividade antimicrobiana foi determinada pelo utilizando o método spot-on-the-lawn, e como patógenos testaram-se a *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella*. A triagem das cepas produtoras de EPS foi determinada a partir do uso de discos em meio base. Obtiveram-se resultados positivos quanto à atividade antimicrobiana, porém a triagem de cepas produtoras de EPS não se demonstrou muito eficaz em nosso caso.

PALAVRAS-CHAVE: atividade antimicrobiana; bactérias ácido lácticas; exopolissacarídeos.

ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB) constitute a group of microorganisms that have been extensively investigated due to their probiotic properties and their ability to produce bioactive compounds, such as exopolysaccharides (EPS). EPS can be defined as extracellular polysaccharides produced by various bacteria and possess a wide range of biotechnological and pharmaceutical applications, including prebiotic and antimicrobial activities. Antimicrobial activity refers to the capacity to inhibit or eradicate the growth of pathogenic microorganisms. This research aimed to conduct a screening of lactic acid bacteria that produce exopolysaccharides and assess their antimicrobial activity. These strains were isolated from artisanal products such as natural yogurt, pickled cucumbers, and rejuvelac. Antimicrobial activity was determined using the spot-on-the-lawn method, and the pathogens tested included *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Salmonella*. The screening of EPS-producing strains was performed using disc-based methods. Positive results were obtained concerning antimicrobial activity; however, the screening of EPS-producing strains did not prove to be highly effective in our case.

KEYWORDS: antimicrobial activity; lactic acid bacteria; exopolysaccharides.

INTRODUÇÃO

O consumo de alimentos funcionais tem se tornado crescente nos últimos anos, reflexo de uma forte tendência mundial em buscar alimentos que ofereçam mais do que nutrientes (MELO *et al.*, 2016). Quando falamos a respeito de probióticos, temos estudos relevantes a respeito, pois são microrganismos conhecidos por conferir inúmeros

¹ Bolsista da UTFPR. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil. E-mail: gaertner@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 4729467054222967.

² Docente no Curso Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil. E-mail: carolina@utfpr.edu.br. ID Lattes: 3261695828340553.



benefícios à saúde humana, como melhora na constipação intestinal, aumento da imunidade, aumento na disponibilidade de nutrientes, entre outros.

As Bactérias Ácido Lácticas (BAL) fazem parte do grupo de probióticos e são microrganismos que, quando conferidos em quantidade correta, possuem a capacidade de impactar positivamente a saúde do hospedeiro. Elas são bactérias capazes de sintetizar polímeros extracelulares, conhecidos como exopolissacarídeos (EPS), os quais apresentam diversas funções tecnológicas e de saúde (IBARBURU *et al.*, 2015). Também são bactérias conhecidas por sua capacidade de produzir substâncias antimicrobianas, como as bacteriocinas, por exemplo.

Os EPS apresentam vários benefícios, como a conservação de alimentos e a melhora da qualidade de produtos fabricados. Além disso, podem ser considerados como prebióticos, os quais podem ser definidos como ingredientes fermentados seletivamente que promovem alterações específicas na composição e/ou atividade da microflora gastrointestinal, proporcionando bem estar e saúde ao hospedeiro (ROBERFROID, 2007).

Já as bacteriocinas, são peptídeos biologicamente ativos que apresentam atividade antimicrobiana contra diversos microrganismos deteriorantes e patógenos frequentemente associados a alimentos (PERIN, 2011), especialmente *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus* produtores de enterotoxinas, frequentemente associados a produtos lácteos (MORGAN *et al.*, 2001).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi caracterizar as bactérias ácido lácticas quanto ao potencial de produção de EPS e também analisar sua atividade antimicrobiana frente à patógenos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os microrganismos utilizados foram previamente isolados a partir de 3 produtos artesanais: iogurte natural, pepino em conserva e rejuvelac (um tipo de bebida probiótica proveniente da fermentação de grãos ou sementes). Todos os isolados foram classificados como bactérias ácido lácticas, após uma sequência de provas morfológicas e bioquímicas.

A triagem de BAL produtoras de EPS foi realizada em meio base (GUIMARÃES, 1999), utilizando sacarose como açúcar e pH 7,5, conforme descrito por PAULO (2010).

A técnica utilizada consistiu em inocular 2 µl da cultura reativada em caldo *Man Rogosa e Sharp* (MRS) de cada isolado em discos de papel de filtro esterilizados que foram depositados sobre o meio base em placas, seguido por incubação por um período de 72h a 28 °C. O resultado foi observado por meio da formação de uma colônia mucóide ao redor dos discos.

Para a atividade antimicrobiana foram utilizados os patógenos: *Listeria innocua* 123, *Staphylococcus aureus* 117, *Escherichia coli* 051 e *Salmonella* 118, os quais foram cedidos pela Coleção Microbiológica (CMIB) da UTFPR campus Ponta Grossa.

Para esta avaliação foi empregado o método *spot-on-the-lawn* (LEWUS *et al.*, 1991), para isto as cepas foram reativadas em caldo MRS e diluídas em solução salina (0,85% p/v) até uma concentração próxima de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (0,5 na escala de *McFarland*). Posteriormente estes inóculos foram semeados por picada em placas contendo ágar MRS e, incubados por 72h em estufa a 37 °C. Após o período de incubação, foi vertida sobre a placa uma camada de caldo *Brain Heart Infusion* (BHI)

suplementado com 1% de ágar bacteriológico e acrescido de 10% (v/v) de uma diluição do inóculo do patógeno, seguindo as mesmas especificações de diluição das cepas. As placas foram novamente incubadas nas mesmas condições de temperatura por 48h.

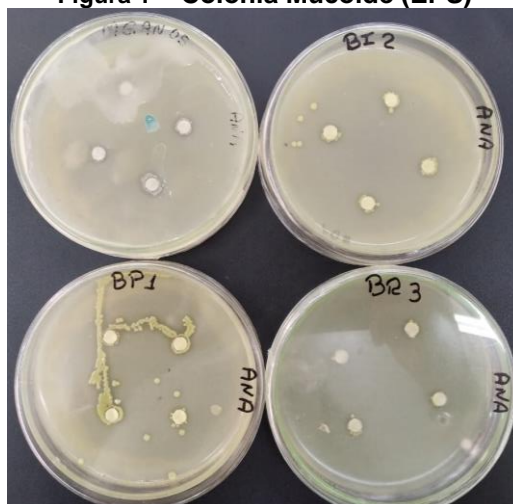
O resultado foi observado pela formação de halos ao redor das colônias, os quais foram medidos e tiveram o resultado expresso em milímetros (mm).

RESULTADOS

TRIAGEM DA PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS

A triagem de BAL produtoras de exopolissacarídeos foi observada pela formação de uma colônia mucóide ao redor dos discos (figura 1) e apresentou um resultado majoritariamente negativo nas cepas testadas.

Figura 1 – Colônia Mucóide (EPS)



Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

As BAL isoladas do pepino em conserva apresentaram apenas 1 cepa possivelmente produtora de EPS, resultado que se repete para os isolados do iogurte natural. Já as BAL isoladas do rejuvelac apresentaram 3 cepas em potencial.

Estudos demonstram que o EPS tem efeito prebiótico devido ao seu efeito bifidogênico e ao estímulo do crescimento das BAL (HONGPATTARAKEREA *et al.*, 2012). Porém, de um total de 23 cepas testadas, apenas 21,7% apresentaram um resultado promissor à produção de EPS.

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antimicrobiana apresentou resultados favoráveis para os patógenos testados, com destaque para os patógenos Gram positivos: *Listeria innocua* e *Staphylococcus aureus* (quadro 1 e figura 2). No caso da *Escherichia coli* e da *Salmonella*, a média das medidas dos halos de inibição foi positiva, porém não foi tão notável quanto nas Gram-positivas.

Quadro 1 – Atividade Antimicrobiana em Diferentes Patógenos

BAL Testada	<i>Listeria innocua</i> (halo em mm)	<i>Staphylococcus aureus</i> (halo em mm)	<i>Escherichia coli</i> (halo em mm)	<i>Salmonella</i> (halo em mm)
BR2	26,6	12,5	-	-
BR7	14,6	12,5	40,5	23,0
BR8	31,0	15,8	37,7	10,0
BP1	8,6	39,5	5,7	11,3
BI2	13,3	17,3	4,7	7,0
BI5	-	40,2	20,7	7,2

Fonte: Elaborado pelos autores (2023). * “-“: não houve inibição.

Figura 2 – Atividade antimicrobiana



Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

Com os resultados obtidos podemos ver que a média dos halos de inibição da *Staphylococcus aureus* (22,96mm) foram 46,4% maiores que as médias da *Listeria innocua* (15,68mm), com destaque para a cepa BR8 para a inibição da *Listeria* e da BP1 para a inibição da *S. aureus*.

Também podemos observar que a média dos halos da *Escherichia coli* (18,21mm) foram 86,8% maiores que as médias da *Salmonella* (9,75mm).

Comparando as inibições dos patógenos Gram positivos e Gram negativos, os positivos foram inibidos 38,2% a mais que os negativos, o que é um indicativo positivo para a presença de bacteriocinas.

As bacteriocinas são substâncias antimicrobianas de natureza proteica (NAIDU *et al.*, 1999), e possuem uma maior capacidade de inibição de microrganismos patógenos Gram positivos.

As BAL testadas apresentam um metabolismo homofermentativo, ou seja, sintetizam mais de 90% dos carboidratos em ácido láctico. Por isso podemos definir a natureza da ação inibitória das cepas como proveniente de ácido láctico ou bacteriocinas.



Além do resultado completamente inibitório, algumas cepas apresentaram um efeito bacteriostático, no qual não inibem completamente a presença do patógeno, mas diminuem significativamente seu desenvolvimento ao seu redor.

CONCLUSÃO

Com a presente pesquisa podemos concluir que as BAL isoladas a partir de diferentes produtos artesanais possuem uma grande atividade antimicrobiana, a qual é altamente benéfica quando se diz respeito a microrganismos prebióticos, uma vez que poderão aumentar a microflora gastrointestinal e diminuir significativamente os microrganismos patógenos indesejados nesse meio, além de sugerir aplicações biotecnológicas promissoras na produção de alimentos e no desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos baseados em microrganismos naturais.

Também pudemos ver a necessidade de análises mais precisas para a triagem e quantificação de EPS sintetizado por essas BAL.

Agradecimentos

À UTFPR por viabilizar o desenvolvimento da pesquisa por meio de recursos no formato de bolsa e auxílio financeiro. À Prof^a Dra. Maria Carolina de Oliveira Ribeiro pelo suporte, pelos ensinamentos e pela confiança depositada no meu trabalho durante a realização do presente projeto de pesquisa.

Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

GUIMARÃES, D. P., *et al.* Optimization of dextran synthesis and acidic hydrolysis by surface response analysis. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 16:2, 129-139, 1999.

IBARBURU, I. *et al.* Production and partial characterization of exopolysaccharides produced by two *Lactobacillus suebicus* strains isolated from cider. **International Journal of Food Microbiology**, v.214, p. 54-62, 2015.

LEWUS, C.B.; SUN, S.; MONTEVILLE, T.J. Production of an amylase-sensitive bacteriocin by an atypical *Leuconostoc paramesenteroides* strain. **Applied Environmental Microbiology**, v.58, p.143-149, 1992.

MELO, I.A., *et al.* Levantamento e caracterização dos produtos probióticos disponíveis no mercado varejista da região metropolitana do Rio de Janeiro. **Revista Rede de Cuidados em Saúde**. 2016; 10.

MORGAN, F., *et al.* Survival of *Listeria monocytogenes* during manufacture, ripening and storage of soft lactic cheese made from goat milk. **International Journal of Food Microbiology**, v.64, n.1-2, p.217-221, 2001.



NAIDU, A.S.; BIDLACK, W.R.; CLEMENS, R.A. **Probiotic spectra of lactic acid bacteria.** Crit. Rev. Food Sci. Nutr., v. 38, p.13-126, 1999.

PAULO, E. M. **Produção de exopolissacarídeos (EPS) por bactérias lácticas visando encapsulação de Lactobacillus acidophilus La-5 pelo processo de Spray drying.** 2010. 212 f. Tese (Doutorado Acadêmico em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2010.

PERIN, L. M. **Caracterização de Fatores Interferentes na Produção de Bacteriocinas por Bactérias Ácido Lácticas Isoladas de Leite Cru e Queijo.** Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária para Magister Scientiae, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

ROBERFRIOD, M.B. Prebiotics: the concept revisited. **Journal of Nutrition**, v.137, p.830S-837S, 2007.