

CULTIVO ASSOCIADO DE *Leuconostoc mesenteroides* LB10.4 E *Lactococcus lactis* L4A8: PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS E POTENCIAL APLICAÇÃO

Amanda Souza da Motta¹
Danieli Silva Quadros²
Andreia Monique Lermen³

RESUMO

O interesse por produtos lácteos funcionais tem motivado o estudo e a prospecção de novas bactérias lácticas. Neste contexto o objetivo deste trabalho foi explorar a potencial associação de *Leuconostoc mesenteroides* LB10.4 e *Lactococcus lactis* L4A8 isolados de leite de búfala e identificar aplicações em matriz alimentar. Foram realizados testes de atividade antimicrobiana, influência das bacteriocinas e avaliação da eficiência das bactérias ácido lácticas (BAL) individualmente e associadas frente a espécie de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 aplicadas em caldo Tryptic Soy Broth e em matriz láctea. Na avaliação da atividade antimicrobiana, *Leuconostoc mesenteroides* LB 10.4 e *Lactococcus lactis* L4A8 foram capazes de inibir *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 com halos de inibição variando de 8 a 16 mm e 6 a 18 mm, respectivamente, pelos dois métodos testados. Na avaliação do efeito das bacteriocinas, os resultados demonstraram melhor controle inibitório dos patógenos pela nisina nas concentrações de 1% e 2%, com halos de inibição entre 14 a 24 mm. A avaliação da eficiência das BAL individualmente e associadas frente a espécie de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, demonstrou que os isolados em associação são capazes de inibir com mais efetividade a bactéria patogênica, sendo observada uma redução na contagem de *L. monocytogenes* de $2,67 \times 10^7$ UFC/g para $1,35 \times 10^4$ UFC/g após 240 horas, em matriz alimentar. As bactérias lácticas *Leuconostoc mesenteroides* LB10.4 e *Lactococcus lactis* L4A8 apresentaram características promissoras quanto ao seu potencial inibitório, não sendo inibidas pela pediocina. Destaca-se com esses resultados, a importância de estudar o leite de búfala como fonte de novos candidatos de bactérias lácticas autóctones para aplicação em alimentos.

Palavras-chave: leite de búfala, bactérias ácido lácticas, alimentos funcionais, probióticos.

ASSOCIATED CULTURE OF *Leuconostoc mesenteroides* LB10.4 AND *Lactococcus lactis* L4A8: ANTIMICROBIAL PROPERTIES AND POTENTIAL APPLICATION

ABSTRACT

The interest in functional dairy products has motivated the study and prospection of new lactic bacteria. In this context, the aim of this study was to explore the potential association of *Leuconostoc mesenteroides* LB10.4 and *Lactococcus lactis* L4A8 isolated from buffalo milk and to identify applications in food matrix. Tests of antimicrobial activity, influence of bacteriocins and evaluation of the efficiency of lactic acid bacteria (LAB) individually and associated against the species of *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 applied in Tryptic Soy Broth and in milk matrix were performed. In the evaluation of antimicrobial activity, *Leuconostoc mesenteroides* LB 10.4 and *Lactococcus lactis* L4A8 were able to inhibit

¹ Docente do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Correspondência: amanda.motta@ufrgs.br

² Danieli.quadros@hotmail.com

³ Doutoranda no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS. andreamoniquelermen@hotmail.com

Staphylococcus aureus ATCC 25923 and *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 with inhibition halos ranging from 8 to 16 mm and 6 to 18 mm, respectively, by the two methods tested. In evaluating the effect of bacteriocins, the results showed better inhibitory control of pathogens by nisin at concentrations of 1% and 2%, with inhibition halos between 14 and 24 mm. The evaluation of the efficiency of LAB individually and associated against the species of *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, showed that the isolates in association are able to more effectively inhibit the pathogenic bacteria, with a reduction in the *L. monocytogenes* count of 2.67×10^7 CFU/g to 1.35×10^4 CFU/g after 240 hours, in food matrix. The lactic acid bacteria *Leuconostoc mesenteroides* LB10.4 and *Lactococcus lactis* L4A8 showed promising characteristics regarding their inhibitory potential, not being inhibited by pediocin. With these results, attract attention the importance of studying buffalo milk as a source of new candidates of autochthonous lactic acid bacteria for application in food.

Keywords: buffalo milk, lactic acid bacteria, functional foods, probiotics.

CULTIVO ASOCIADO DE *Leuconostoc mesenteroides* LB10.4 Y *Lactococcus lactis* L4A8: PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS Y APLICACIÓN POTENCIAL

RESUMEN

El interés por los productos lácteos funcionales ha motivado el estudio y prospección de nuevas bacterias ácido lácticas. En este contexto, el objetivo de este trabajo fue explorar la asociación potencial de *Leuconostoc mesenteroides* LB10.4 y *Lactococcus lactis* L4A8 aislados de leche de búfala e identificar aplicaciones en matriz alimentaria. Se realizaron pruebas de actividad antimicrobiana, influencia de bacteriocinas y evaluación de la eficiencia de bacterias ácido lácticas (BAL) individualmente y asociadas frente a las especies de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 aplicadas en caldo Tryptic Soy Broth y en matriz de leche. En la evaluación de la actividad antimicrobiana, *Leuconostoc mesenteroides* LB10.4 y *Lactococcus lactis* L4A8 fueron capaces de inhibir *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 con halos de inhibición de 8 a 16 mm y de 6 a 18 mm, respectivamente, por los dos métodos probados. Al evaluar el efecto de las bacteriocinas, los resultados mostraron un mejor control inhibitorio de patógenos por parte de la nisina a concentraciones de 1% y 2%, con halos de inhibición entre 14 y 24 mm. La evaluación de la eficiencia de las BAL de forma individual y asociada frente a la especie de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, mostró que los aislados en asociación son capaces de inhibir más eficazmente las bacterias patógenas, con una reducción del recuento de *L. monocytogenes* de $2,67 \times 10^7$ UFC/g a $1,35 \times 10^4$ UFC/g después de 240 horas, en matriz alimentaria. Las bacterias del ácido láctico *Leuconostoc mesenteroides* LB10.4 y *Lactococcus lactis* L4A8 mostraron características promisorias en cuanto a su potencial inhibitorio, no siendo inhibidas por la pediocina. Con estos resultados, se destaca la importancia de estudiar la leche de búfala como fuente de nuevos candidatos de bacterias ácido lácticas autóctonas para su aplicación en alimentos.

Palabras clave: leche de búfala, bacterias ácido lácticas, alimentos funcionales, probióticos.

INTRODUÇÃO

O uso de bactérias ácido lácticas (BAL) como culturas bioprotetoras e funcionais em produtos lácteos tem sido amplamente estudado nos últimos anos (1). Estas aplicações, promovem a capacidade de produção de processos sintéticos, inibidores e bioativos de forma

natural, podendo as BAL sintetizarem peptídeos antimicrobianos, substâncias orgânicas e acelerar os processos bioquímicos nos alimentos (2, 3).

Atualmente as BAL são cada vez mais empregadas seja com fins tecnológicos, bem como com objetivos probióticos para humanos e animais, visto a promoção de propriedades organolépticas desejáveis nos produtos e vários benefícios ao hospedeiro (4). As propriedades das BAL perpassam pela capacidade de inibição do crescimento de microrganismos patogênicos pela competição por substratos, impedem a aderência de bactérias patogênicas nas células hospedeiras do intestino (reforçando o efeito de barreira da mucosa intestinal), liberam metabólitos que protegem o intestino (arginina, glutamina, ácidos graxos de cadeia curta e ácidos linolêicos conjugados) e, por fim, secretam compostos antimicrobianos, como bacteriocinas, ácidos orgânicos (ácido lático, ácido acético e ácido butírico) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (5).

As BAL podem ser veiculadas à dieta através de diversas matrizes alimentares. No entanto, sabe-se que produtos lácteos, com destaque para os leites fermentados, são produtos alimentares amplamente disponíveis, atraentes para muitos paladares e apropriados para todas as faixas etárias, além de serem excelentes matrizes para veiculação dos probióticos (6-7). Entretanto, a aplicação das BAL na indústria de alimentos requer uma avaliação de segurança para garantir a inocuidade dos isolados a serem empregados, bem como assegurar a viabilidade destas culturas no produto, para que ocorra o desempenho tecnológico e funcional desejados (8).

Diversas BAL vem sendo utilizadas em pesquisas como culturas iniciadoras ou adjuvantes na fabricação de produtos lácteos (6). Nesse sentido, *Lactococcus lactis* e *Leuconostoc mesenteroides* desempenham um papel essencial como culturas mistas em laticínios, principalmente devido a sua importância comercial na quebra de caseína, elaboração de textura e formação de sabor (9). O crescimento associado entre essas duas espécies é complexo, visto que, pode influenciar em diversos aspectos as propriedades de produtos lácteos, incluindo taxa de crescimento, produção de ácido, produção de aroma, atividade proteolítica e podem auxiliar na conservação do alimento (10). Por esta razão, muitos esforços têm sido realizados para prospectar os efeitos desses microrganismos considerando também seu potencial probiótico.

No entanto, ainda há poucos estudos sobre estes microrganismos isolados do leite bubalino. Em vista disto, este trabalho foi desenvolvido visando explorar a potencial associação de *Leuconostoc mesenteroides* LB 10.4 e *Lactococcus lactis* L4A8 isolados de leite de búfala, bem como, suas propriedades bioativas. Compreender e interpretar a funcionalidade destes isolados em matriz láctea torna-se importante considerando o interesse de aplicação em produtos derivados lácteos.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismos e condições de cultivo

Para o estudo, foram selecionadas duas BAL isoladas de leite de búfala, previamente identificadas como *Leuconostoc mesenteroides* LB 10.4 e *Lactococcus lactis* L4A8, em trabalho anterior (8). As culturas foram cultivadas em caldo de Man, Rogosa e Sharpe (MRS) a 30 °C por 24 horas e depois semeadas por esgotamento em placas de Ágar MRS para avaliação da pureza dos isolados.

Como culturas indicadoras foram empregadas quatorze bactérias de importância na área de alimentos: *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076,

Klebsiella pneumoniae (alimento), *Serratia marcescens* ATCC 43861, *Enterobacter cloacae* (alimento), *Escherichia coli* ATCC 10536, *Listeria monocytogenes* 17D78 (alimento), *Listeria monocytogenes* 4C (alimento), *Listeria monocytogenes* QF Oxford (alimento), *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Listeria seeligeri* (alimento), *Listeria innocua* L13 (alimento), *Listeria seeligeri* PB Palcam (alimento) e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Essas culturas foram cultivadas em placas de Tryptic Soy Agar (TSA) a 37 °C por 24 horas, para a execução dos experimentos.

Avaliação da atividade antimicrobiana das BAL frente às culturas indicadoras

As bactérias lácticas foram cultivadas em caldo MRS a 30 °C por 72 horas constituindo diferentes grupos: Grupo 1 - *Leuconostoc mesenteroides* LB 10.4, Grupo 2 - *Lactococcus lactis* L4A8 e Grupo 3 - *Leuconostoc mesenteroides* LB 10.4 + *Lactococcus lactis* L4A8 (1:1). Após o período de incubação, uma alíquota de 1 mL de cada cultivo foi colocada em tubos Eppendorfs, em duplicata e centrifugados a 10.000 rpm por 15 minutos. Após esta etapa foi realizada a avaliação do pH do cultivo e 800 µL do sobrenadante livre de células (SLC) foi transferido para outro tubo. Para o teste de atividade antimicrobiana, foi realizada uma suspensão das culturas indicadoras em solução salina 0,85%, conforme a Escala de McFarland de 0.5 (10^8 UFC/mL). Cada suspensão foi espalhada com suabe sobre a superfície do meio de cultivo Ágar leite (TSA + 10% leite UHT). Após, os SLC dos grupos preparados foram aplicados pelo Método da Gota (10 µL). O Método da Picada também foi realizado com a picada de cada um dos 2 isolados, em triplicata e as placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. A avaliação da presença dos halos de inibição foi verificada e foi expressa em milímetros (mm).

Efeito da nisina e pediocina sobre o crescimento das bactérias lácticas e indicadoras

Para a verificação do efeito da nisina e pediocina sobre o crescimento das culturas *Leuconostoc mesenteroides* LB 10.4 e *Lactococcus lactis* L4A8, e das indicadoras *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, seguiu-se o mesmo Método da Gota descrito acima. As soluções de nisina e pediocina foram preparadas à 1 e 2% e esterilizadas por filtração em Filtros Millipore (0,22 µm). O método de difusão em ágar foi realizado com a inoculação em forma de gotas de 20 µL das soluções das bacteriocinas em triplicatas, sobre as placas de ágar leite previamente inoculadas com os isolados, incubando-se à 30 °C e/ou 37 °C por 24 horas. Após fez-se a leitura dos halos de inibição que foram expressos em milímetros (mm).

Avaliação do efeito das BAL sobre espécie de *Listeria* selecionada

As culturas de *Leuconostoc mesenteroides* LB 10.4 e *Lactococcus lactis* L4A8 foram incubadas em caldo MRS, enquanto a *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 foi incubada em Tryptic Soy Broth (TSB), incubadas a 30 °C por 24 horas. Após este período distribuiu-se as culturas em Erlenmeyer contendo 100 mL de TSB, da seguinte forma: A) *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 (400 µL); B) *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 (400 µL) + *Leuconostoc mesenteroides* LB 10.4 (1 mL) e C) *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 (400 µL) + *Leuconostoc mesenteroides* LB 10.4 (500 µL) + *Lactococcus lactis* L4A8 (500 µL). Este experimento foi incubado à 30 °C por 48 horas, realizando-se coletas nos tempos de 16, 24 e 48 horas. Para a avaliação das UFC/mL foi empregado o método da microdiluição (11).

Preparo da coalhada a partir do leite cru de búfala e avaliação da qualidade microbiológica

O leite de búfala obtido na Estação Experimental Agronômica da UFRGS foi coletado e acondicionado em frasco estéril, refrigerado em caixa isotérmica e levado ao Laboratório de Microbiologia da UFRGS. A amostra de 1 litro desse leite foi aquecida à 40 °C, e então foram adicionados o coagulante líquido HA-LA (5 mL diluído em 25 mL de água) e cloreto de cálcio (0,5 g). Após 30 min de repouso foi feito o corte na massa e depois de 10 min a coalhada foi coada, obtendo-se aproximadamente 740 mL de soro e 198,33 g de massa coalhada. Para a avaliação da qualidade microbiológica foi transferido 1 mg da coalhada para Eppendorfs contendo 900 µL de solução salina 0,85% e a partir disto, foram realizadas diluições seriadas. Em seguida, 20 µL de cada diluição da coalhada foram aplicadas em uma placa com meio Plate Count Ágar (PCA) e em placa com meio Agar *Listeria* Oxford, ambas incubadas a 37 °C por 24 horas para verificação de crescimento microbiano. O pH da coalhada foi avaliado.

Avaliação do efeito das BAL sobre *Listeria monocytogenes* em matriz láctea

Alíquotas de 20 g da coalhada foram acondicionadas em Falcons estéreis individualmente. Em seguida foi adicionado 7 µL de um cultivo de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e procedeu-se com uma homogeneização. Após, dividiu-se em três tratamentos diferentes: T1: Falcon somente com a *Listeria monocytogenes* selecionada, o T2: Falcon com adição de 200 µL de *Leuconostoc mesenteroides* LB 10.4 + *Listeria monocytogenes* e T3: Falcon com 100 µL de *Leuconostoc mesenteroides* LB 10.4 + 100 µL *Lactococcus lactis* L4A8 + *Listeria monocytogenes*. Os Falcons foram mantidos sob refrigeração a uma temperatura média de 5 °C realizando-se coletas nos tempos de 48, 120, 168 e 216 horas. Para a avaliação da viabilidade da *Listeria monocytogenes*, foi empregado o método da microdiluição e o meio Agar *Listeria* Oxford foi empregado (11).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação da atividade antimicrobiana das BAL frente às culturas indicadoras

A atividade antimicrobiana de *Leuconostoc mesenteroides* LB 10.4 e *Lactococcus lactis* L4A8 frente as culturas indicadoras foi avaliada por dois métodos (Tabela 1). Ambas as BAL foram capazes de inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 com halos de inibição variando de 8 a 16 mm no método da picada e de 9 a 10 mm com a aplicação do SLC. Estes resultados corroboram com Marques et al. (12), que verificaram antagonismo de 80% das BAL isoladas de queijos artesanais frente a *S. aureus* ATCC 25923 com halos entre 10 a 13 mm de diâmetro. A inibição de *S. aureus* nos alimentos é de extrema importância, uma vez que este microrganismo é potencialmente patogênico e pode produzir enterotoxinas termoestáveis responsáveis por causar intoxicação alimentar nos consumidores (13-14). Dentre as intoxicações alimentares de origem bacteriana, cerca de 45% destas no mundo estão relacionadas com *S. aureus* (15). As espécies de *Listeria* testadas também foram inibidas pelos dois isolados de BAL quando testadas pelo método da picada. Os halos variaram de 6 a 18 mm, sendo *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 a espécie mais sensível. Satisfatoriamente, os resultados encontrados neste estudo indicam que a aplicação dos isolados em estudo mostram-se eficazes na inibição de dois patógenos Gram-positivos importantes na área de alimentos.

Quando *Leuconostoc mesenteroides* LB 10.4 e *Lactococcus lactis* L4A8 foram testados frente as bactérias Gram-negativas, não foi observada a presença de halos de inibição. Resultados semelhantes a estes foram encontrados por Svetoslav e Leon (16), onde foram

testados o potencial antimicrobiano de bactérias dos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc* e nenhuma atividade foi registrada contra as bactérias Gram-negativas incluídas no estudo. Outros trabalhos também relatam resistência à atividade antimicrobiana das BAL frente os organismos Gram-negativos, os quais constataram ser devido a essas bactérias apresentarem uma membrana externa, dificultando a permeabilidade dos compostos antimicrobianos na cultura indicadora (17-19).

Tabela 1. Atividade antimicrobiana de *Leuconostoc mesenteroides* LB 10.4 e *Lactococcus lactis* L4A8 contra as culturas indicadoras pelo método da gota e o método da picada.

| Bactérias Gram Positivas | Alíquotas (mm) | | | | |
|---|----------------|-------|-----|----|--------|
| | L | Leuco | L+L | PL | PLEuco |
| <i>L. monocytogenes</i> 17D78 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>L. monocytogenes</i> 4C | 0 | 0 | 0 | 0 | 16 |
| <i>L. monocytogenes</i> QF Oxford | 0 | 0 | 0 | 0 | 16 |
| <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644 | 0 | 0 | 0 | 6 | 18 |
| <i>L. innocua</i> L13 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>L. seeligeri</i> PB Palcam | 0 | 0 | 0 | 0 | 19 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | 9 | 10 | 9 | 8 | 16 |

L: SLC *Lactococcus lactis* L4A8; Leuco: SLC *Leuconostoc mesenteroides* LB 10.4; L+L: SLC *Lactococcus lactis* L4A8 + *Leuconostoc mesenteroides* LB 10.4; PL: picada *Lactococcus lactis* L4A8 e PLeuco: picada *Leuconostoc mesenteroides* LB 10.4.

Efeito da nisina e pediocina sobre as bactérias lácticas e culturas indicadoras selecionadas

Ao avaliar as diferentes concentrações de nisina (1% e 2%) sobre os isolados selecionados, foram observados halos de inibição que variaram de 18 mm a 24 mm frente a *L. lactis* L4A8, 14 mm a 18 mm frente a *L. mesenteroides* LB 10.4, 20 mm a 24 mm frente a *L. monocytogenes* ATCC 7644 e 14 mm a 15 mm, quando avaliadas frente a *S. aureus* ATCC 25923 (Tabela 2). Resultados semelhantes com nisina foram descritos por Bordignon-Junior et al. (20), onde avaliou-se a ação antimicrobiana da nisina sobre as bactérias de importância alimentar (incluindo *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923), empregando-se somente concentrações crescentes da bacteriocina e, todas as bactérias estudadas se mostraram susceptíveis, nas diferentes concentrações. Estudos anteriores nos quais foram analisados o potencial da nisina com diferentes grupos de bactérias de importância alimentar, reportaram a alta atividade inibitória da nisina sobre bactérias Gram-positivas em relação às Gram-negativas. De maneira geral, isso se deve ao modo de ação da nisina diretamente na membrana plasmática e na parede celular da bactéria, o que é dificultado pela membrana externa presente na parede nas Gram-negativas e que atua como uma barreira impermeável à molécula da nisina (21-23).

Muitas bacteriocinas são eficazes contra bactérias patogênicas Gram-positivas e o efeito da nisina em *L. monocytogenes* é descrito por vários autores (24, 25, 23). A nisina e a pediocina demonstraram serem bacteriocinas eficazes contra *L. monocytogenes* ATCC 7644, tendo em vista que as medidas dos halos de inibição encontrados variaram entre 17 mm e de 20 a 24 mm, para nisina e pediocina, respectivamente. (Tabela 2). Fato este confirmado também por Vitola et al. (26), onde foi avaliada a atividade antimicrobiana das bacteriocinas sobre *S. aureus* e *L. monocytogenes* ATCC 7644, no qual observou-se que com ambas as bacteriocinas testadas, a bactéria *L. monocytogenes* mostrou-se sensível. Além disso, os resultados sobre o isolado de *S.*

aureus também foram semelhantes ao obtido no presente estudo, uma vez que apresentou atividade antimicrobiana apenas nos testes com a nisina e em relação a pediocina não foram observadas nenhuma atividade antimicrobiana nas diferentes concentrações testadas (1%, 5% e 10%).

Tabela 2. Efeito antimicrobiano de nisina e pediocina sobre crescimento de bactérias lácticas e culturas indicadoras selecionadas.

| Microrganismos | Halos de inibição (mm) | | | |
|--|------------------------|----|----|----|
| | N1 | N2 | P1 | P2 |
| <i>Lactococcus lactis</i> L4A8 | 18 | 24 | 0 | 5 |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> LB 10.4 | 14 | 18 | 0 | 0 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644 | 20 | 24 | 17 | 17 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | 14 | 15 | 0 | 0 |

P1: pediocina a 1%; P2: pediocina a 2%; N1: nisina a 1%; N2: nisina a 2%.

Além disso, para a avaliação da potencial aplicação de bioconservantes e BAL em associação, o ideal seria que as bacteriocinas não afetassem o desenvolvimento das culturas lácticas desejáveis. Neste estudo a nisina afetou o crescimento das BAL em estudo, já a pediocina não causou nenhuma inibição nas condições experimentais estudadas, exceto pela concentração de 2% frente a *Lactococcus lactis* (Tabela 2). Dessa forma, a pediocina é um potencial bioconservante a ser associado com os isolados *Lactococcus lactis* L4A8 e *Leuconostoc mesenteroides* LB 10.4 em estudos com matriz alimentar (27-28).

Avaliação do efeito das BAL sobre espécie de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644

O efeito de *L. mesenteroides* LB 10.4 (Grupo B) e a associação de *L. lactis* L4A8 e *L. mesenteroides* LB 10.4 (Grupo C) foram avaliados sobre *L. monocytogenes* ATCC 7644 (Tabela 3). Observa-se que as diferenças nas contagens em ambos os grupos experimentais ao longo do armazenamento foram distintas no tempo de 48 horas, visto que houve maior diminuição do cultivo da *Listeria* no grupo C, que apresentou ao final do tempo experimental a contagem de $7,88 \times 10^5$ UFC/mL. Portanto, os resultados deste estudo demonstram a capacidade inibitória de *L. lactis* L4A8 e *L. mesenteroides* LB 10.4 no processo de desenvolvimento de *L. monocytogenes* ATCC 7644, o que corrobora com vários estudos que têm mostrado que a inoculação de alimentos com culturas de BAL pode inibir o crescimento de *L. monocytogenes* (29-31). Estudos anteriores ainda mostram que o antagonismo microbiano das BAL (*L. mesenteroides* e *L. lactis*) é atribuído à produção de produtos metabólicos finais, como peróxido de hidrogênio, diacetil, ácidos orgânicos e bacteriocina (32-34).

Estes resultados trazem interessantes perspectivas, uma vez que, muitos produtos lácteos requerem estratégias adicionais para controlar o crescimento e a sobrevivência de *L. monocytogenes*. A inibição desta bactéria nos alimentos é de extrema importância, uma vez que este microrganismo é o agente causador da listeriose, uma das doenças de origem alimentar mais significativas nos países industrializados (31). A inclusão de obstáculos adicionais para controlar este patógeno nos alimentos é particularmente desejável dada sua ampla distribuição no meio ambiente, sua capacidade de crescer em temperaturas de refrigeração e o fato de que pode sobreviver durante a fabricação de queijos (35). Portanto, é fundamental estudos que identifiquem possíveis isolados que poderão ser utilizados como mais uma alternativa de uso para prevenir o crescimento de *L. monocytogenes* em alimentos.

Tabela 3. Resultados obtidos em relação ao efeito das BAL na contagem de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 expressos em UFC/mL, após 48 h de incubação.

| Tempo (horas) | Grupo | | |
|---------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | A | B | C |
| 0 | 1,02 x 10 ⁶ | - | - |
| 16 | 8,12 x 10 ⁸ | 3,35 x 10 ⁷ | 5,76 x 10 ⁷ |
| 24 | 2,52 x 10 ⁷ | 4,03 x 10 ⁷ | 5,73 x 10 ⁷ |
| 48 | 3,35 x 10 ⁷ | 8,5 x 10 ⁶ | 7,88 x 10 ⁵ |

Grupo A: *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 (400 µL); Grupo B: *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 (400 µL) + *Leuconostoc mesenteroides* LB 10.4 (1 mL); Grupo C: *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 (400 µL) + *Leuconostoc mesenteroides* LB 10.4 (500 mL) + *Lactococcus lactis* L4A8 (500 mL).

Avaliação do efeito das BAL sobre espécie de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 em matriz láctea

Na avaliação do pH da coalhada obtida, verificou-se o valor de pH 6 na massa. Nas avaliações microbiológicas da coalhada, observou-se ausência de crescimento microbiano nas diluições realizadas em placas de PCA e no Agar *Listeria* Oxford, após incubação de 37 °C por 24 horas. Esse resultado pode ser explicado devido a adoção das boas práticas agropecuárias no momento da ordenha e durante a manipulação e processamento do leite de búfala para a obtenção da coalhada.

Na avaliação do efeito das BAL sobre *L. monocytogenes* ATCC 7644 verificou-se que no primeiro tratamento (T1), a *L. monocytogenes* ATCC 7644 desenvolveu-se na coalhada durante o armazenamento sob refrigeração (Tabela 4). Considerando que bactérias psicotróficas podem sobreviver em queijos durante a fabricação, maturação e armazenamento sob refrigeração, o controle do crescimento de *L. monocytogenes* é de forte relevância e um grande desafio para produtores e consumidores. No Grupo T2, incorporado experimentalmente com 200 µL de *Leuconostoc mesenteroides* LB 10.4 (T2), as contagens de UFC/g da *L. monocytogenes* ATCC 7644 apresentaram uma redução de 3,35 x 10⁸ UFC/g para 2,65 x 10⁵ UFC/g no período de 240 horas. Na pesquisa de Borges et al. (34), onde foi avaliado o efeito de *L. mesenteroides* no desenvolvimento de *L. monocytogenes* ATCC 7644 em creme fermentado, observaram-se resultados promissores para a preservação de alimentos devido a sua resposta antimicrobiana, pois o crescimento da *L. monocytogenes* ATCC 7644 foi menor na presença de substâncias antimicrobianas produzidas por *L. mesenteroides* ao longo de um período de 9 horas. Resultados do presente estudo também estão de acordo com Nájera-Dominguez et al. (29), onde foi observado que as cepas de *L. lactis* inibem o crescimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos de origem alimentar, melhorando a qualidade microbiana e a segurança dos produtos lácteos.

Contudo, o resultado observado no grupo contendo o crescimento associado de 100 µL de *L. mesenteroides* LB 10.4 + 100 µL de *L. lactis* L4A8 (T3) apontou uma diminuição maior em relação aos demais grupos, visto que a contagem microbiana decresceu de 2,67x10⁷ UFC/g para 1,35x10⁴ UFC/g ao longo de todo o experimento. Logo, as diferenças nas contagens em ambos os tratamentos (T2 e T3) ao longo do armazenamento mostraram que a inibição de *L. monocytogenes* ATCC 7644 foi mais efetiva com a associação de ambas as BAL. Desta forma, as culturas *L. mesenteroides* LB 10.4 e *L. lactis* L4A8 tornam-se candidatos importantes para a produção de produtos lácteos, uma vez que o risco de contaminação pelo patógeno *Listeria* spp. existe, por tratar-se de uma bactéria ubíqua e presente no ambiente de produção. Ainda *Listeria* spp. é uma bactéria difícil de erradicar uma vez estabelecida no ambiente, pois sobrevive em condições de ampla faixa de pH, temperaturas de refrigeração e altas concentrações de sal e é

capaz de formar biofilmes microbianos em ambientes de processamento de alimentos (36, 35, 30).

Tabela 4. Resultados obtidos em relação ao efeito das BAL na contagem de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 expressos em UFC/g, em matriz láctea, após 240 h de incubação.

| Tempo (horas) | Grupo | | |
|---------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | T1 | T2 | T3 |
| 0 | 2,87 x 10 ⁶ | - | - |
| 48 | 1,42 x 10 ⁹ | 3,35 x 10 ⁸ | 2,67 x 10 ⁷ |
| 120 | 3,57 x 10 ⁹ | 2,57 x 10 ⁶ | 1,00 x 10 ⁶ |
| 168 | 3,45 x 10 ⁸ | 1,50 x 10 ⁶ | 6,00 x 10 ⁴ |
| 240 | 1,67 x 10 ⁸ | 2,65 x 10 ⁵ | 1,35 x 10 ⁴ |

T1, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 (7 µL); T2, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 (7 µL) + *Leuconostoc mesenteroides* LB 10.4 (200 mL); T3, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 (7 µL) + *Leuconostoc mesenteroides* LB 10.4 (100 µL) + *Lactococcus lactis* L4A8 (100 µL).

CONCLUSÃO

As BAL apresentam grande potencial de aplicação na indústria de alimentos e, atualmente, inúmeros benefícios à saúde têm sido atribuídos a elas. No presente estudo verificou-se que *L. mesenteroides* LB 10.4 e *L. lactis* L4A8 foram capazes de inibir o crescimento de *S. aureus* ATCC 25923 e *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, através do método da picada e da aplicação do SLC. No teste de influência das bacteriocinas, os resultados obtidos neste estudo demonstraram melhor controle inibitório da nisina em relação à pediocina frente ao *S. aureus* ATCC 25923, já para *L. monocytogenes* ATCC 7644, ambas demonstraram serem bacteriocinas eficazes. Além disso, as bactérias lácticas *L. mesenteroides* LB10.4 e *L. lactis* L4A8 demonstraram serem tolerantes a matriz alimentar, e ao serem utilizadas em associação em uma matriz láctea, demonstraram que são capazes de inibir com mais efetividade a bactéria patogênica *L. monocytogenes* ATCC 7644, sendo observada uma redução na contagem de *L. monocytogenes* de 2,67x10⁷ UFC/g para 1,35x10⁴ UFC/g após 240 horas de contato.

Em geral, as BAL apresentam grande potencial de aplicação na indústria de alimentos e, atualmente, inúmeros benefícios à saúde têm sido atribuídos a elas. A busca e caracterização de BAL com potencial funcional, oriundas de fontes ainda pouco pesquisadas como o leite bubalino, foi o principal foco deste estudo. As bactérias lácticas autóctones *Leuconostoc mesenteroides* LB10.4 e *Lactococcus lactis* L4A8 demonstraram serem tolerantes a matriz alimentar, possibilitando a utilização de ambos os isolados como bacteriocinas, principalmente em associação pois atestaram potencial de inibição mais eficaz contra a bactéria patogênica estudada.

REFERÊNCIAS

1. Minto M, Phebus RK, Schmidt KA. Impact of a plant extract on the viability of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in nonfat yogurt. Int Dairy J. 2010;20(10):665-72. doi: 10.1016/j.idairyj.2010.03.005.
2. Pignata MCA, Fernandes SAA, Ferrão SPB, Faleiro AS, Conceição DG. Estudo comparativo da composição química, ácidos graxos e colesterol de leites de búfalas e vaca. Rev Caatinga. 2014;27(4):226-33.

3. Yilmaz-Ersan L, Ozcan T, Akpinar-Bayizit A, Sahin S. The antioxidative capacity of kefir produced from goat milk. *Int J Chem Eng Appl.* 2016;7(1):22-5. doi: 10.7763/IJCEA.2016.V7.535.
4. Bachtarzi N, Kharroub K, Ruas-Madiedo P. Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria isolated from traditional Algerian dairy products and their application for skim-milk fermentations. *Lwt Food Sci Technol.* 2019;107:117-24. doi: 10.1016/j.lwt.2019.03.005.
5. Carafa I, Clementi F, Tuohy K, Franciosi E. Microbial evolution of traditional mountain cheese and characterization of early fermentation cocci for selection of autochthonous dairy starter strains. *Food Microbiol.* 2016;53:94-103. doi: 10.1016/j.fm.2015.09.001.
6. Margalho LP, Feliciano MD, Silva CE, Abreu JS, Piran MVF, Sant'Ana AS. Brazilian artisanal cheeses are rich and diverse sources of nonstarter lactic acid bacteria regarding technological, biopreservative, and safety properties-insights through multivariate analysis. *J Dairy Sci.* 2020;103(9):7908-26. doi: 10.3168/jds.2020-18194.
7. Tagliazucchi D, Martini S, Solieri L. Bioprospecting for bioactive peptide production by lactic acid bacteria isolated from fermented dairy food. *Fermentation.* 2019;5(4):1-34. doi: 10.3390/fermentation5040096.
8. Breyer GM, Arechavaleta NN, Siqueira FM, Motta AS. Characterization of lactic acid bacteria in raw buffalo milk: a screening for novel probiotic candidates and their transcriptional response to acid stress. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 2021;13(2):468-83. doi: 10.1007/s12602-020-09700-4.
9. Özogul F, Hamed I. The importance of lactic acid bacteria for the prevention of bacterial growth and their biogenic amines formation: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2018;58(10):1660-70. doi: 10.1080/10408398.2016.1277972.
10. Foucaud C, Hemme D, Desmazeaud M. Peptide utilization by *Lactococcus lactis* and *Leuconostoc mesenteroides*. *Lett Appl Microbiol.* 2001;32(1):20-5. doi: 10.1111/j.1472-765X.2001.00852.x.
11. Miles AA, Mirsa SS, Irwin JO. The estimation of the bactericidal power of the blood. *J Hyg (Lond).* 1938;38(6):732-49. doi: 10.1017/s002217240001158x.
12. Marques JDL, Hoffmann JF, Chaves FC, Silva WP, Maria A. Bactérias ácido lácticas isoladas de queijo artesanal: potencial tecnológico e atividade antagonista contra *Staphylococcus aureus*. In: *Anais do 17o Encontro de Pós-Graduação (ENPOS); 2015; Pelotas (RS). Pelotas: Universidade Federal de Pelotas; 2015.*
13. Otto M. Toxinas de *Staphylococcus aureus*. *Curr Opin Microbiol.* 2014;17:32-7. doi: 10.1016/j.mib.2013.11.004.
14. Feitosa AC, Rodrigues RM, EAT Torres, Silva JFM. *Staphylococcus aureus* em alimentos. *Rev Desafios.* 2017;4(4):15-31. doi: 10.20873/uft.2359-3652.2017v4n4p15.
15. Andrade FP Jr, Lima BTM, Alves TWB, Menezes MES. Fatores que propiciam o desenvolvimento de *Staphylococcus aureus* em alimentos e riscos atrelados a

- contaminação: uma breve revisão. Rev Cienc Med Biol. 2019;18(1):89-93. doi: 10.9771/cmbio.v18i1.25215.
16. Todorov SD, Dicks LMT. Characterization of mesentericin ST99, a acteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* ST99 isolated from boza. J Ind Microbiol Biotechnol. 2004;31(7):323-9. doi: 10.1007/s10295-004-0153-6.
 17. Majolo C, Nascimento VP, Chagas EC, Chaves FCM. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de rizomas de açafrão (*Curcuma longa* L.) e gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) frente a salmonelas entéricas isoladas de frango resfriado. Rev Bras Plantas Med. 2014;16(3):505-12. doi: 10.1590/1983-084X/13_109.
 18. Santos CHS, Piccoli RH, Tebaldi VMR. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais e compostos incluídos frente aos agentes patogênicos de origem clínica e alimentar. Rev Inst Adolfo Lutz. 2017;76:1-8. doi: 10.53393/rial.2017.v76.33539.
 19. Trentin MM, Malfatti LH, Becker AF, Monteiro LK, Canonica LR, Marco I, et al. [The essential oil of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and peptide synthesized by *Lactococcus lactis* as antimicrobial agents against *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes*]. Braz J Health Rev. 2020;3(3):5381-91. Portuguese. doi: 10.34119/bjhrv3n3-112.
 20. Bordignon-Junior SE, Miyaoka MF, Costa JL, Benavente CAT, Couto GH, Soccol CR. Inhibiting Gram-negative bacteria growth in microdilution by Nisin and EDTA treatment. J Biotechnol Biodivers. 2012;3(4):127-35. doi: 10.20873/jbb.uft.cemaf.v3n4.bordignon.
 21. Rishi P, Singh AP, Garg N, Rishi M. Evaluation of nisin- β -lactam antibiotics against clinical strains of *Salmonella enterica* serovar Typhi. J Antibiot (Tokyo). 2014;67(12):807-11. doi: 10.1038/ja.2014.75.
 22. Field D, Seisling N, Cotter PD, Ross RP, Hill C. Synergistic nisin-polymyxin combinations for the control of *Pseudomonas* biofilm formation. Front Microbiol. 2016;7:1-7. doi: 10.3389/fmicb.2016.01713.
 23. Alves FCB. Mecanismos de ação da atividade antimicrobiana da nisina e em combinações com antimicrobianos tradicionais sobre *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e *Pseudomonas aeruginosa* [dissertação]. Franca (SP): Universidade Estadual Paulista; 2018.
 24. Chen H, Davidson PM, Zhong Q. Antimicrobial properties of nisin after glycation with lactose, maltodextrin and dextran and the thyme oil emulsions prepared thereof. Int J Food Microbiol. 2014;191:75-81. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.09.005.
 25. Miyamoto KN, Monteiro KM, Caumo KS, Lorenzatto KR, Ferreira HB, Brandelli A. Comparative proteomic analysis of *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 exposed to a sublethal concentration of nisin. J Proteomics. 2015;119:230-7. doi: 10.1016/j.jprot.2015.02.006.
 26. Vitola HRS, Gandra EA, Frazzon APG, Dannenberg GS, Motta AS. Efeito de nisina e pediocina sobre culturas de *Staphylococcus aureus* isoladas de carcaças de frango. Rev Bras Biocienc. 2018;16(1):21-7.

27. Amado IR, Fuciños C, Fajardo P, Pastrana L. Pediocin SA-1: a selective bacteriocin for controlling *Listeria monocytogenes* in maize silages. *J Dairy Sci.* 2016;99(10):8070-80. doi: 10.3168/jds.2016-11121.
28. Porto MCW, Kuniyoshi TM, Azevedo POS, Vitolo M, Oliveira RPS. *Pediococcus* spp.: an important genus of lactic acid bacteria and pediocin producers. *Biotechnol Adv.* 2017;35(3):361-74. doi: 10.1016/j.biotechadv.2017.03.004.
29. Nájera-Dominguez C, Gutierrez-Méndez N. Autolytic and proteolytic properties of strains of *Lactococcus lactis* isolated from different vegetables, raw-milk cheeses and commercial starter cultures. *Food Nutr Sci.* 2013;4(11A):21-6. doi: 10.4236/fns.2013.411A004.
30. Khan I, Khan J, Miskeen S. Prevalence and control of *Listeria monocytogenes* in the food industry - a review. *Czech J Food Sci.* 2017;34:469-87. doi: 10.17221/21/2016-CJFS.
31. Ho TTV, Lo R, Bansal N, Turner MS. Characterisation of *Lactococcus lactis* isolates from herbs, fruits and vegetables for use as biopreservatives against *Listeria monocytogenes* in cheese. *Food Control.* 2018;85:472-83. doi: 10.1016/j.foodcont.2017.09.036.
32. Reis JA, Paula AT, Casarotti SN, Penna ALB. Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: characteristics and applications. *Food Eng Rev.* 2012;4(2):124-40. doi: 10.1007/s12393-012-9051-2.
33. Shao X, Fang K, Medina D, Wan J, Lee J-L, Hong SH. The probiotic, *Leuconostoc mesenteroides*, inhibits *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *J Food Saf.* 2019;40(2):e12750. doi: 10.1111/jfs.12750.
34. Borges DO, Matsuo MM, Bogsan CSB, Silva TF, Casarotti SN, Penna ALB. *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 reduces *Listeria monocytogenes* growth and impacts on fatty acids profile and conjugated linoleic acid content in fermented cream. *Lwt Food Sci Technol.* 2019;107:264-71. doi: 10.1016/j.lwt.2019.02.085.
35. Furtado DN, Todorov SD, Landgraf M, Destro MT, Franco BDGM. Bacteriocinogenic *Lactococcus lactis* subsp. DF04Mi lactis isolated from goat milk: application in the control of *Listeria monocytogenes* in fresh Minas-type goat cheese. *Braz J Microbiol.* 2015;46(1):201-6. doi: 10.1590/S1517-838246120130761.
36. Zocche F, Bastos CP, France RC. Comparison between of the methods for extracting DNA from *Staphylococcus aureus* in fresh mine type cheese. *Aliment.* 2010;43:110-6.

Recebido em: 25/07/2022

Aceito em: 22/09/2022