



JULIANA BERNARDO DA SILVA



**AÇÃO ANTAGONISTA DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS ISOLADAS
DE QUEIJOS DE COALHO ARTESANAL PRODUZIDOS NO
AGRESTE DE PERNAMBUCO**

GARANHUNS – PE

2019



JULIANA BERNARDO DA SILVA



**AÇÃO ANTAGONISTA DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS ISOLADAS
DE QUEIJOS DE COALHO ARTESANAL PRODUZIDOS NO
AGRESTE DE PERNAMBUCO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Medicina Veterinária da Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de graduação em Medicina Veterinária.

ORIENTADOR

Prof. Dr. Marcelo Mendonça

GARANHUNS - PE

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Ariano Suassuna, Garanhuns - PE, Brasil

S586a Silva, Juliana Bernardo da
Ação antagonista de bactérias ácido lácticas isoladas de
queijos de coalho artesanal produzidos no agreste de
Pernambuco / Juliana Bernardo da Silva. – 2019.
41 f. : il.

Orientador: Marcelo Mendonça.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina
Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Departamento de Medicina Veterinária, Garanhuns, BR-PE,
2019.

Inclui referências e anexo(s).

1. Queijo 2. Queijo - fabricação 3. Bactérias 4. Veterinária
I. Mendonça, Marcelo, orient. II. Título

CDD 637



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIDADE ACADÊMICA DE GARANHUNS
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA



**AÇÃO ANTAGONISTA DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS ISOLADAS
DE QUEIJOS DE COALHO ARTESANAL PRODUZIDOS NO
AGRESTE DE PERNAMBUCO**

Trabalho de conclusão de curso elaborado por:

JULIANA BERNARDO DA SILVA

Aprovada em 03/07/2019

BANCA EXAMINADORA

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcelo Mendonça
Unidade Acadêmica de Garanhuns – UFRPE

Prof^ª. Dr^ª. Elizabete Rodrigues da Silva
Unidade Acadêmica de Garanhuns - UFRPE

Médica Veterinária, MSc., Ana Erundina de Luna Moraes Leite
Laticínio LETA - Pernambuco



FOLHA DE IDENTIFICAÇÃO DO ESO

I. ESTAGIÁRIO

NOME: Juliana Bernardo da Silva

MATRÍCULA Nº 04621302400

CURSO: Medicina Veterinária

PERÍODO LETIVO: 11º

ENDEREÇO PARA CONTATO: Rua Josenildo Henrique Saraiva dos Santos, 57: José Maria Dourado/Garanhuns-PE

FONE: (87) 9 99163337

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcelo Mendonça

SUPERVISOR: Prof. Dr. Marcelo Mendonça

FORMAÇÃO: Médica Veterinária

II. EMPRESA/INSTITUIÇÃO

NOME: Laboratório de Pesquisas em Microbiologia e Imunologia (LAPEMI), situado no Centro Laboratorial de Apoio à Pesquisa da Unidade Acadêmica de Garanhuns (CENLAG) vinculada à Universidade Federal Rural de Pernambuco.

ENDEREÇO: Av. Bom Pastor S/N Bairro: Boa Vista

CIDADE: Garanhuns

ESTADO: PE

CEP: 55292-270

FONE: (87)3764-5505

III. FREQUÊNCIA

INÍCIO E TÉRMINO DO ESTÁGIO: 12/03/2019 a 31/05/2019

TOTAL DE HORAS ESTAGIADAS: 408 horas

SUPERVISOR: Prof. Dr. Marcelo Mendonça

GARANHUNS

2019

AGRADECIMENTO

Agradeço ao meu marido Antônio Vieira da Silva, pela paciência, apoio e dedicação durante este período de finalização de curso.

Ao Prof. Dr. Marcelo Mendonça pela excelente oportunidade de realização deste trabalho, pela supervisão e orientação, por sua confiança depositada em mim e pelo exemplo profissional.

Aos companheiros de laboratório, Wisley da Silva Moraes e Antônio Brito da Silva Filho por toda ajuda, dedicação e por sempre compartilharem de seus conhecimentos e experiências.

À Prof^a. Dr^a. Elizabete Rodrigues da Silva por compartilhar o laboratório e materiais essenciais para a realização deste trabalho.

Às amigas Patrícia Telesca e Andrielle Farias pelo companheirismo e apoio durante todo período de nossa jornada acadêmica.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste Trabalho de Conclusão de Curso.

RESUMO

A denominação de queijo de coalho artesanal é conferida em virtude do modo de produção deste queijo, no qual é utilizado leite cru para sua fabricação, permitindo que a microbiota diversificada do queijo seja a mesma do leite utilizado em sua elaboração. Bactérias ácido lácticas são as responsáveis pela diversificação no sabor e textura de produtos alimentícios devido ao seu poder fermentativo. A produção de bacteriocinas por bactérias ácido lácticas e utilização como conservantes naturais de alimentos mostra-se mais eficiente quando isoladas do próprio produto em que se pretende utilizá-las. O objetivo deste estudo foi isolar e caracterizar bactérias ácido lácticas (BAL), a partir de queijo de coalho artesanal produzido no agreste de Pernambuco, bem como realizar teste de antagonismo contra bactérias potencialmente patogênicas. As bactérias ácido lácticas utilizadas neste estudo foram isoladas de 13 amostras de queijo de coalho, produzidos em cinco diferentes cidades do agreste. As amostras foram semeadas em ágar MRS (Man, Rogosa e Sharpe) e incubadas em anaerobiose por 72h a 30°C. As bactérias isoladas no ágar foram submetidas a testes de caracterização de colônias, coloração de Gram, testes de catalase e urease e de antagonismo *in vitro*, onde verificou-se a atividade inibitória contra cepas padrão de *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium (ATCC 14028) e *Listeria innocua* (CLIP 12612). Dentre as 13 amostras de queijo analisadas foram selecionadas para avaliação 42 colônias, entre estas, verificou-se presença de bactérias com morfologias de cocos ou bacilos, todas Gram-positivas, assim como foram identificadas colônias de leveduras. Todas as bactérias que apresentaram-se como Gram-positivas e foram negativas para o teste de catalase foram consideradas como bactérias ácido lácticas. Das 42 BAL isoladas, 12 foram utilizadas nos ensaios de atividade antagônica em ágar, sendo que nove demonstraram a presença de halo de inibição contra pelo menos uma das cepas padrão utilizadas. Como controle positivo foi utilizada a cepa *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (ATCC 11842). As características de resistência ao meio ácido, as próprias bacteriocinas e o poder antagônico observados nas bactérias testadas as tornam viáveis para serem utilizadas em alimentos, aumentando seu tempo de prateleira, conservando suas características originais e trazendo benefícios à saúde da população.

Palavras chave: Biopreservação, saúde, bacteriocinas, inibição.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

APT – Água Peptonada Tamponada

ATCC – American Type Culture Collection

BAL – Bactérias Ácido Láticas

BHI – Meio de Cultura Brain Heart Infusion

CLIP – Collection de Listeria de l'Institut Pasteur

°C – Graus Celsius

ESO – Estágio Supervisionado Obrigatório

GRAS – Generally Recognized as Safe

LAPEMI – Laboratório de Pesquisas em Microbiologia e Imunologia

mL – Mililitros

mm – Milímetros

MRS – Meio de Cultura Man, Rogosa e Sharpe

OMS – Organização Mundial da Saúde

p/v – Peso/volume

pH – Potencial Hidrogeniônico

RNA – Ribonucleic Acid (ácido ribonucleico)

RPM – Rotações por Minuto

TSB – Caldo Trypticaseína de Soja

UFC – Unidade Formadora de Colônia

µL – Microlitros

v/v – volume/volume

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Características morfológicas de bactérias ácido láticas isoladas de queijos de coalho do agreste de Pernambuco.....	29
Figura 2.	Teste de urease em colônias presuntivas de bactérias ácido láticas.....	29
Figura 3.	Colônias presuntivas de bactérias ácido láticas.....	30
Figura 4.	Inibição de <i>E. coli</i> por BAL isolado Q 5.1.....	32
Figura 5.	Inibição de <i>L. innocua</i> por BAL isolado Q 13.1.....	32
Figura 6.	Inibição de <i>E. coli</i> por BAL isolado Q 6.1.....	32
Figura 7.	Inibição de <i>E. coli</i> por BAL isolado Q 13.1.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Atividades realizadas e/ou acompanhadas durante o ESO.....	13
Tabela 2.	Descrição das principais técnicas desenvolvidas durante o ESO.....	14
Tabela 3.	Teste de ação antagonista <i>in vitro</i> pela formação de halo de inibição...	31
Tabela 4.	Confecção do meio de cultura MRS (Man, Rogosa e Sharpe) modificado <i>in house</i>	41

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – RELATÓRIO DO ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO	12
1. LOCAL DO ESO E CARACTERÍSTICAS.....	12
2. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS.....	12
CAPÍTULO II – AÇÃO ANTAGONISTA DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS ISOLADAS DE QUEIJOS DE COALHO ARTESANAL PRODUZIDOS NO AGRESTE DE PERNAMBUCO.....	16
1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 Queijo de coalho Artesanal.....	19
2.2 Bactérias ácido láticas	20
2.3 Isolamento e identificação de bactérias ácido láticas	22
2.4 Microrganismos probióticos	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1 Obtenção das amostras de queijo de coalho	25
3.2 Isolamento de bactérias ácido láticas a partir de queijo de coalho artesanal.....	25
3.3 Caracterização de colônias	26
3.4 Características morfotintórias.....	26
3.5 Teste de produção de catalase e urease	26
3.6. Teste de antagonismo <i>in vitro</i>	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
CONCLUSÃO.....	35
REFERÊNCIAS	36
ANEXO 1. CONFECÇÃO DO MEIO DE CULTURA ÁGAR MRS: FÓRMULA PARA 1 L.	41

CAPÍTULO I – RELATÓRIO DO ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO

1. LOCAL DO ESO E CARACTERÍSTICAS

O estágio Supervisionado Obrigatório (ESO) foi realizado no período de 12 de março a 31 de maio, com carga horária de 408 horas, no Laboratório de Pesquisas em Microbiologia e Imunologia (LAPEMI), no Laboratório de Reprodução Animal de Pernambuco (LABRAPE), e no Laboratório de Microbiologia, situados no Centro Laboratorial de Apoio à Pesquisa da Unidade Acadêmica de Garanhuns (CENLAG) vinculado à Universidade Federal Rural de Pernambuco, sob a supervisão e orientação do Prof. Dr. Marcelo Mendonça.

O CENLAG fica situado no município de Garanhuns, funcionando de 7 as 18 horas, todos os dias da semana, sendo possível a utilização das dependências em horários alternativos. O mesmo dispõe de uma gama de equipamentos específicos necessários para a realização de projetos de pesquisas, como autoclaves, estufas de incubação, contador de colônias, capelas de fluxo laminar, espectrofotômetro, pHmetro, microscópios, centrífugas, vortex agitador de tubos, bicos de Bunsen, termociclador, destiladores, balanças de precisão, banho Maria, micropipetas, provetas e vidrarias em geral.

2. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

As atividades desenvolvidas durante o Estágio Supervisionado Obrigatório tiveram como principal objetivo complementar a formação curricular do curso de Medicina Veterinária, colocando em prática os conhecimentos adquiridos em sala de aula através do contato direto com a realidade profissional na área de Microbiologia de Alimentos de Origem Animal. Durante este período, os estagiários acompanham diariamente a rotina laboratorial, participando ativamente de todas as etapas de processamento de amostras, até a interpretação dos resultados definitivos. Inicialmente, são apresentadas as instalações, os equipamentos disponíveis e sua forma correta e segura de utilização, para então os estagiários serem inseridos nas atividades práticas, sempre supervisionados pelo professor responsável.

Tabela 1. Atividades realizadas e/ou acompanhadas durante o ESO. Período de 12 de março a 31 de maio de 2019 na especialidade de Microbiologia de Alimentos no Laboratório de Pesquisas em Microbiologia e Imunologia (LAPEMI) da UFRPE, Garanhuns-PE.

Atividades desenvolvidas no laboratório	
Atividade	Equipamento/Material
Limpeza e manutenção dos materiais destinados à prática.	Vidrarias, tubos, alças bacteriológicas.
Confecção e preparo dos meios de cultura.	MRS, BHI, TSB, Mueller Hinton, Sabouraud, Ureia.
Confecção de discos de papel filtro estéreis.	Testes de antagonismo bacteriano <i>in vitro</i> .
Descontaminação e esterilização de materiais e meios de cultura	Realizado em Autoclaves.
Repique bacteriano.	Métodos pour-plate, spread-plate, semeadura por estriamento, picada em profundidade (tubos de ensaio).
Contagem padrão em placas.	Contador de Colônias.
Caracterização de colônias de bactérias.	Quanto à cor, tamanho, forma, elevação, densidade, consistência.
Técnica de Diluição seriada das amostras de queijo de coalho.	Contagem de microrganismos em concentrações elevadas - 1/10 em microtubos de 1,5 mL até 10^{-6}
Preparação de diluentes a serem utilizados.	Água peptonada, solução salina.
Preparação de meio de congelamento de isolados bacterianos.	Solução de glicerol 20%.
Congelamento de bactérias para utilização futura.	Criopreservação a -70°C .
Teste de catalase.	Avaliar a produção da enzima catalase.
Teste de urease.	Avaliar a produção da enzima urease.
Padronização de amostras pela escala de Mc Farland.	Diluição 0,5 da escala.
Teste de antagonismos de bactérias ácido lácticas.	Contra <i>Salmonella</i> Typhimurium, <i>Listeria innocua</i> e <i>Escherichia coli</i> .
Organização, limpeza e manutenção do laboratório e seus materiais de uso geral.	Equipamentos, vidrarias e utensílios em geral.

Durante o período do estágio, foi possível observar, auxiliar e realizar tarefas essenciais da rotina laboratorial, juntamente com professores, outros estagiários e alunos de mestrado, os quais contribuíram de forma especial para a complementação do aprendizado e realização deste trabalho.

As técnicas utilizadas nas principais atividades realizadas no LAPEMI estão descritas mais detalhadamente na **Tabela 2**, as quais foram essenciais para se chegar a resultados mais concretos sobre o experimento desenvolvido neste trabalho.

Tabela 2. Descrição das principais técnicas desenvolvidas durante o ESO. Período de 12 de março a 31 de maio de 2019, na especialidade de Microbiologia de Alimentos Laboratório de Pesquisas em Microbiologia e Imunologia (LAPEMI) da UFRPE, Garanhuns-PE.

DESCRIÇÃO TÉCNICA DAS PRINCIPAIS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	
ATIVIDADE	TÉCNICA UTILIZADA
Confecção dos meios de cultura	Pesar em balança de precisão todos os componentes do meio conforme recomendações do fabricante, depositar em vidraria seca e limpa, acrescentar água destilada para diluir todo o meio em volume determinado pelo fabricante, ajustar o pH e só após acrescentar o ágar. Fundir em micro-ondas até diluição e homogeneização total dos componentes, autoclavar em frascos de vidro por 15 minutos a temperatura de 121°C, após diminuir parcialmente a temperatura, verter em placas de Petri estéreis. Embalar as placas em filme plástico a fim de evitar seu ressecamento, para utilizações futuras.
Diluição seriada de amostras de queijo	Retirar assepticamente porção de 10 g de várias partes do queijo, homogeneizar em 90 mL de água peptonada 0,1% (p/v), em saco de <i>stomacher</i> . Preparar diluições seriadas a partir da primeira diluição (10^{-1}) até a obtenção da diluição 10^{-6} , adicionar 0,1 mL de cada diluição a 0,9 mL de água peptonada em Ependorffs de 1,5 mL e homogeneizar em vortex. Em seguida, semear 100 μ L das diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} em superfície de ágar MRS pelo método spread-plate, ou profundidade - pour-plate - e incubar em jarra de anaerobiose a 25°C por até 72 h. Semear as colônias em caldo MRS e, após seu crescimento, estriar em placas de ágar MRS, incubar em estufa a 35°C por 24 horas.
Preparação de cepas para criopreservação	Cultivar as bactérias em 3 mL de um meio líquido (BHI) por 24h a 37°C, passar 1 mL do cultivo para microtubos estéreis, centrifugar a 7000 RPM por 3 minutos, retirar o sobrenadante e ressuspender o pellet em 1 mL de solução de congelamento de glicerol a 20%, homogeneizar no vortex e congelar imediatamente.
Teste de catalase	Com uma alça bacteriológica devidamente flambada e resfriada, coletar parte da colônia e inocular em uma gota de peróxido de hidrogênio a 3% (v/v) sobre uma lâmina.

	Após este procedimento observar a formação imediata de bolhas de gás, sendo este um indicativo de presença da enzima catalase na colônia coletada.
Teste de urease	Utilizando-se uma agulha bacteriológica devidamente flambada e resfriada, inocular no meio da colônia, em seguida introduzir no meio do ágar ureia, contido em tubos de ensaio pela técnica de picada em profundidade, e em 24h verificar se houve mudança de coloração do meio.
Teste de antagonismo	<p>Cultivar as bactérias ácido lácticas em caldo MRS a 36°C durante 72 horas. Após este período, adicionar 3 discos de papel estéreis com 3 mm de diâmetro na superfície do ágar com a utilização de uma pinça estéril, inocular 10 µL do caldo contendo as BAL sobre os discos e incubar sob aerobiose em estufa a 36°C por 48 horas.</p> <p>Cultivar as bactérias a serem inibidas em caldo TSB enriquecido com 0,6% de extrato de levedura (TSB-YE) por 24 horas a 36°C, inocular uma sobrecamada de 10 mL de ágar BHI semi-sólido (0,75%), contendo as cepas a serem inibidas, já diluídas em solução salina, sobre a superfície do ágar MRS contendo os discos de papel filtro impregnados com as bactérias ácido lácticas. Incubar sob aerobiose em estufa a 36°C durante 24 a 48 horas, e verificar presença de halo de inibição.</p>

Os procedimentos, atividades e técnicas desenvolvidas no LAPEMI durante o período de Estágio Supervisionado Obrigatório contribuíram significativamente para um crescimento pessoal, aperfeiçoamento e o desenvolvimento na formação profissional, requisitos essenciais para ingressar no mercado de trabalho.

CAPÍTULO II – AÇÃO ANTAGONISTA DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS ISOLADAS DE QUEIJOS DE COALHO ARTESANAL PRODUZIDOS NO AGRESTE DE PERNAMBUCO

1. INTRODUÇÃO

O interesse por parte dos consumidores na busca por alimentos mais saudáveis, seguros e naturais, tem aumentado nos últimos anos devido a preocupação com a saúde e procura por uma qualidade de vida melhor, obtida através de alimentos compostos por produtos de alto valor nutricional, sem aditivos químicos e pouco processados (LOUREIRO, 2015).

A Instrução Normativa N° 30, de 26 de junho de 2001 estabelece que o leite utilizado na fabricação de queijo de coalho destinado ao consumo humano e comércio nacional e internacional deve ser submetido à pasteurização ou tratamento térmico equivalente (BRASIL, 2001). No Brasil, porém, existe a preocupação em preservar a qualidade dos queijos artesanais por serem considerados referências culinárias regionais e representarem uma fonte de renda para o pequeno produtor (CARVALHO, 2007; EMBRAPA, 2009). A denominação de queijo artesanal é conferida em virtude do modo de produção deste tipo de queijo utilizando-se o leite cru de vaca, cabra, ovelha e búfala (PERNAMBUCO, 2018; ADAGRO, 2018), podendo este ser fresco ou maturado, adicionado ou não de condimentos por pequenos produtores rurais, seguindo técnicas tradicionais como aponta Cogan et al. (1997). Entretanto, essa produção artesanal caracteriza um produto com um importante papel econômico e social, uma vez que seu consumo e/ou comercialização contribui para a subsistência de populações agrícolas, por ser sua única fonte de renda, fixando o homem no campo e contribuindo para o desenvolvimento da economia nacional (SILVA, 2016).

O estado de Pernambuco se destaca por ser considerado um dos poucos estados brasileiros autorizado por lei a produzir e comercializar queijos de coalho artesanais. Sobre essa vertente, a lei n° 16.312, de 11 de janeiro de 2018, que altera a Lei n° 13.376, de 20 de dezembro de 2007, a qual dispõe sobre o processo de produção artesanal do Queijo de Coalho traz em seu Art. 1° o seguinte: “É considerado queijo coalho artesanal o queijo produzido no Estado de Pernambuco, a partir do leite cru integral fresco, obtido da ordenha ininterrupta de bovinos, bubalinos, caprinos e ovinos, descansados, bem nutridos e com saúde, beneficiado em propriedade de origem ou de grupo de propriedades com mesmo nível higiênico-sanitário, seguindo o processo de fabricação tradicional e que tenham sido produzidos em:

- I - queijaria artesanal de pequeno porte;
- II - estabelecimento agroindustrial rural de pequeno porte; ou
- III - pequena fábrica de laticínios” (PERNAMBUCO, 2018).

A prática de fabricação de queijos de coalho utilizando-se leite não pasteurizado permite que a microbiota diversificada do queijo seja a mesma do leite utilizado em sua elaboração, a depender da época do ano, estado sanitário dos animais ordenhados, forma de ordenha, tempo e forma de armazenamento e transporte (SILVA et al., 2006). Os queijos artesanais também não recebem cultivos iniciadores comerciais, além da não utilização de tratamento térmico, fazendo com que todo processo de fermentação e acidificação seja proveniente do metabolismo de bactérias ácido lácticas do próprio leite, e até mesmo do ambiente em que ele é produzido (COGAN et al., 1997; SILVA, 2016).

Por outro lado, a pasteurização destrói tanto microrganismos indesejáveis, quanto desejáveis, a exemplo da microbiota láctica natural do leite, a qual é responsável pelas características sensoriais dos queijos (EMBRAPA, 2009; GRAPPIN e BEUVIER, 1997). Na tentativa de minimizar o problema, as indústrias adotam o uso de fermento láctico comercial em queijos fabricados com leite pasteurizado, promovendo uma padronização no produto, sem recuperar a perda de suas características sensoriais ocasionadas pelo efeito do tratamento térmico (CARVALHO, 2007). Como uma alternativa para minimizar as perdas de características próprias do queijo, são selecionadas cepas da própria microbiota presente no leite cru e queijos artesanais, de modo a obter culturas iniciadoras de bactérias ácido lácticas especificamente preparadas para serem adicionadas ao leite tratado termicamente e destinado à produção de queijos (CARVALHO, 2007; EMBRAPA, 2009).

Bactérias ácido lácticas (BAL) estão inseridas em um grupo de microrganismos responsáveis pela diversificação no sabor e na textura de produtos alimentícios devido ao seu poder de fermentação de matérias primas alimentares (AXELSSON, 2003). As BAL são consideradas excelentes fontes tecnológicas, por sua grande capacidade de produzir inúmeras substâncias que influenciam na qualidade final do produto, como suas bacteriocinas, proteínas sintetizadas e liberadas no meio extracelular com ação bactericida ou bacteriostática (COSTA, 2014). Para serem utilizadas, essas substâncias devem ser consideradas como GRAS (*Generally Recognized as Safe*), ou seja, que não oferecem risco ao consumidor e possuam um amplo espectro de inibição contra patógenos (COTTER, 2005; LOUREIRO, 2015). As BAL também são capazes de produzir enzimas proteolíticas e outros metabólitos secundários, como exopolissacarídeos, os quais podem ser isolados e aplicados nas indústrias, sendo a

proteólise um dos processos bioquímicos mais importantes envolvidos na fabricação de produtos lácteos fermentados (El-GHAISH et al., 2011; FERNANDES, 2014).

Frente ao exposto, o presente estudo teve como objetivo isolar e caracterizar bactérias ácido lácticas a partir de queijos de coalho artesanais produzidos no agreste de Pernambuco, bem como realizar teste de atividade inibitória contra bactérias potencialmente patogênicas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Queijo de coalho artesanal

Em Pernambuco a produção do queijo de coalho artesanal, obtido originalmente com leite cru, teve início na época da colonização e se tornou patrimônio cultural coletivo da sociedade pernambucana (PAQUEREAU et al., 2016). Seu método de produção segue uma tradição familiar histórica, que sofreu modificações com o emprego do processo de pasteurização devido às exigências da segurança alimentar estabelecidas pela legislação brasileira, como afirma Carvalho (2007). Diante disso, hoje os produtores recebem treinamentos em ordenha higiênica, alimentação, manejo animal e processamento e, ainda assim, estabelecendo boas práticas de fabricação (BPF) para que desta forma, atingissem um padrão exigido pela legislação para o produto final e assim continuassem produzindo queijo de coalho considerado artesanal (PAQUEREAU et al., 2016).

Segundo a Agência de Defesa e Fiscalização Agropecuária do Estado de Pernambuco (ADAGRO, 2018), entende-se por queijo coalho artesanal aquele obtido por coagulação do leite cru, por meio de coalho ou outras enzimas coagulantes registradas no órgão competente, complementada ou não por bactérias lácteas específicas, podendo ser fresco, maturado, defumado e adicionado de condimentos e especiarias. Sendo então classificado como queijo de coalho artesanal fresco de alta umidade ou maturado de baixa e média umidade, adicionados ou não de condimentos.

O queijo de coalho é considerado um produto típico do Nordeste brasileiro, produzido por pequenos e médios produtores familiares ou laticínios, apresentando um sabor ácido e levemente salgado, resistente ao calor, podendo ser consumido também assado. Apresenta propriedades organolépticas típicas e aroma particular associados a características como raça e nutrição das vacas, processo de fabricação e a microbiota natural autóctone (SILVA et al., 2012; FERNANDES, 2014), que auxiliam na fermentação e maturação do produto, composta em sua grande maioria por BAL e leveduras, que conferem características particulares ao produto e estão presentes em quantidades consideráveis em alimentos probióticos (FERNANDES, 2014). Atualmente, o que se observa é que os queijos de coalho encontram-se difundidos por todas as partes do Brasil, em decorrência da grande aceitação da população por este produto.

Os gêneros de BAL mais encontrados em queijo de coalho artesanais são os *Lactococcus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Leuconostoc* spp. e *Enterococcus* spp. Os gêneros *Lactococcus* e *Enterococcus* geralmente são os mais

predominantes em queijos frescos artesanais elaborados com leite cru, os quais não sofreram cozimento da massa, e podem tanto advir da matéria-prima quanto do meio ambiente, variando em quantidade conforme este ambiente, as condições de higiene do processo e a época do ano (EMBRAPA, 2009), variáveis estas que podem ocasionar o aparecimento de uma grande diversidade de bactérias no produto final.

2.2 Bactérias ácido lácticas

As bactérias ácido lácticas fazem parte de um grupo de microrganismos caracterizados como cocos ou bacilos Gram-positivos, catalase e oxidase negativa, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos, aerotolerantes, produtores de ácido láctico devido a fermentação de açúcares, facilmente encontrados em diferentes produtos alimentares fermentados, a exemplo dos derivados lácteos, contribuindo para o desenvolvimento de características sensoriais diferenciais desses produtos (AXELSSON, 2003; FORSYTHE, 2013).

Dentre as bactérias ácido lácticas de maior importância para a indústria de alimentos destacam-se aquelas pertencentes a onze gêneros: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Bifidobacterium*, *Vagococcus* e *Weissella*, sendo o *Lactobacillus plantarum* muito encontrado em uma grande variedade de alimentos, podendo ser isolado de produtos lácteos, assim como produtos fermentados cárneos como salsichas, salames, entre outros alimentos de origem vegetal, como chucrute e vinhos (SABO et al., 2014; LOUREIRO, 2015).

As BAL são classificadas em dois grandes grupos: homofermentativas e heterofermentativas, a depender de quais serão os produtos finais da fermentação. As homofermentativas tem como principal produto o ácido láctico a partir da fermentação da glicose, enquanto as heterofermentativas, além de produzirem ácido láctico, ainda produzem dióxido de carbono, ácido acético, etanol, aldeído e diacetil (EMBRAPA, 2009).

As BAL homofermentativas mais comumente utilizadas em alimentos são as do gênero *Lactobacillus* e *Streptococcus*, pois o ácido láctico produzido por elas pode ser utilizado em indústrias de alimentos como acidulante, flavorizante, tamponante e inibidor de bactérias deteriorantes em alimentos processados tais como produtos de panificação, bebidas, produtos lácteos, cerveja entre outros. As principais BAL heterofermentativas são *Weissella* spp. e *Leuconostoc* spp., assim como alguns lactobacilos. Os ácidos produzidos por elas

assumem um papel de aromatizantes nos alimentos em que se encontram, sendo, por este motivo, também empregados em larga escala em indústrias de laticínios (CAPELLARI, 2010; FORSYTHE, 2013).

A biopreservação é um método eficaz de conservação de alimentos e tem sido utilizada pela indústria alimentícia em produtos como carnes, produtos lácteos, alimentos enlatados, peixes, bebidas alcoólicas, entre tantos outros alimentos. O principal produto metabólico utilizado no processo de biopreservação são as bacteriocinas, produzidas por bactérias ácido lácticas da própria microbiota do alimento, capazes de estender a vida útil dos mesmos pela inibição de bactérias deteriorantes e patogênicas (COTTER et al., 2005). Devido sua capacidade fermentativa, é crescente o uso dessas bactérias como iniciadoras na produção de alimentos fermentados para melhorar a segurança microbiológica do alimento, bem como para estender sua vida de prateleira (COSTA, 2016), um vez que a queda do pH, ocasionada pela produção de ácido láctico durante o processo fermentativo, pode interferir na proliferação de bactérias deteriorantes de alimentos, gerando uma estabilidade do produto ao armazenamento (PAULA et al., 2009).

As substâncias antimicrobianas, como as bacteriocinas são comumente utilizadas como conservantes naturais dos alimentos, mostrando-se mais eficientes quando isoladas do próprio produto em que se pretende utilizá-las (FURTADO, 2010). A nisina é a bacteriocina mais utilizada como aditivo alimentar, sendo comercializada pela primeira vez na Inglaterra em 1953, e desde então tem sido aprovada para uso em mais de 48 países, incluindo o Brasil (COTTER et al., 2005). Produzida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, é utilizada principalmente em queijos, produtos lácteos e enlatados, recebendo o status de GRAS e sendo aprovada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para uso como conservante concentrado em pó, podendo ser armazenada por longos períodos (COSTA, 2016).

Quanto à atmosfera de crescimento, as BAL podem ser aeróbios estritos, microaerófilas ou anaeróbias facultativas de acordo com cada espécie. Apesar de algumas cepas de BAL serem consideradas termófilas, apresentam principalmente características de mesófilas, com capacidade de se multiplicar em temperaturas que podem variar de 5 a 45°C, além de serem ácido tolerantes, podendo se multiplicar em pH em torno de 3,8 (LOUREIRO, 2015; FORSYTHE, 2013).

De acordo com Costa (2016) a demanda por alimentos considerados probióticos, tem aumentado o interesse das indústrias pelo isolamento de novas cepas de bactérias ácido lácticas com ação probiótica, como a produção de bacteriocinas ou outras substâncias inibidoras de

outros microrganismos. Além dessas substâncias inibirem agentes patogênicos, são consideradas conservantes naturais, aumentando a segurança alimentar e reduzindo a prevalência de doenças associadas à contaminação por alimentos (LOUREIRO, 2015). A introdução de uma dieta mais saudável por parte dos consumidores pode aumentar a expectativa e melhorar a qualidade de vida, uma vez que, pelo menos cerca de um sexto das causas de morte no mundo está relacionada com a dieta (CARNEIRO, 2010).

2.3 Isolamento e identificação de bactérias ácido lácticas

A identificação de BAL pode ser realizada mediante seu crescimento em meios de cultura seletivos, seja em ágar MRS ou M17, testes bioquímicos e fisiológicos, como a coloração de Gram e as provas de catalase e urease, e moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (RESENDE et al., 2011; SILVA, 2016). Entretanto, na maioria das vezes, apenas os testes fenotípicos não permitem a separação em subespécies, sendo necessário a utilização de outros métodos mais específicos, como a análise do gene 16s rRNA, uma vez que algumas espécies de BAL são fenotipicamente relacionadas (QUERE, 1997).

Dentre os meios mais utilizados para isolamento destas bactérias estão o ágar M17, mais seletivo para bactérias com morfologia de cocos, e o ágar Rogosa acidificado ou ágar MRS (Man, Rogosa e Sharpe), para bactérias com morfologia de bacilos (CARVALHO, 2007; SILVA, 2016). De acordo com o estudo realizado por Medina et al. (2001), contagens de BAL foram feitas utilizando-se os meios de cultura MRS e M17, porém a contagem média não mostrou diferença significativa entre os dois meios, mostrando apenas uma contagem ligeiramente elevada das bactérias cultivadas em ágar MRS (MEDINA et al., 2001).

Desenvolvido pelos pesquisadores Man, Rogosa e Sharpe em 1960, o MRS ágar ou caldo tem sido o meio de cultura mais utilizado devido a sua capacidade de manter adequadamente uma grande variedade de espécies de bactérias ácido lácticas (CARR et al., 2002). A crescente descrição de novos gêneros de BAL tornou a identificação e classificação dessas bactérias, apenas por meio de testes clássicos, extremamente trabalhosa podendo, desta forma, ser facilmente divididas apenas pela análise morfológica em bacilos, cocos ou cocobacilos (FURTADO, 2010).

2.4 Microrganismos probióticos

O termo probiótico vem de origem grega, e significa “para a vida”, definido inicialmente como substâncias capazes de estimular o crescimento microbiano intestinal pela

ação de bactérias lácticas e leveduras, exibindo efeito benéfico sobre a saúde do hospedeiro após sua ingestão devido à melhora da microbiota nativa (NOGUEIRA e GONÇALVES, 2011; RAIZEL et al., 2011). Efeitos terapêuticos do probiótico foram observados quando administrado em doses variáveis de 10^6 a 10^9 UFC/dia (OLIVEIRA et al., 2017).

Com o advento da introdução de alimentos saudáveis na dieta dos consumidores, houve também um crescente desenvolvimento do mercado de alimentos funcionais, aumentando a necessidade de busca por bactérias ácido lácticas com propriedades probióticas (SANTOS et al., 2011). Embora as BAL possam ser encontradas em diferentes alimentos, sua presença pode ser observada principalmente em produtos lácteos fermentados, tais como iogurte, queijos e coalhada (BROWN e VALIERI, 2004; RAIZEL et al., 2011), os quais tem demonstrado avanços mercadológicos sob essa perspectiva de funcionalidade, e que são bastante apreciados devido a presença de microrganismos probióticos e metabólitos por eles produzidos durante a fermentação, contribuindo com a melhoria da nutrição básica do consumidor final (FERNANDES, 2014).

Os alimentos funcionais, por apresentarem a capacidade de afetar benéficamente uma ou mais funções do corpo devido aos seus efeitos nutricionais, reduzindo, assim, os riscos de doenças, assemelham-se muito aos produtos conhecidos como nutracêuticos, ou seja, alimentos que proporcionam benefícios médicos e de saúde, produzidos por métodos fermentativos utilizando-se microrganismos considerados como GRAS (MORAES e COLLA, 2006). Porém seu alvo difere dos alimentos funcionais, que se apresentam como alimentos comuns e visam apenas à redução dos riscos de doenças, enquanto os nutracêuticos incluem suplementos dietéticos e outros tipos de alimentos, os quais visam tanto à prevenção quanto ao tratamento de doenças (ANDLAUER e FÜRST, 2002).

De acordo com a Resolução-RDC ANVISA nº 2, de 07 de janeiro de 2002, que aprova o regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcionais e/ou de saúde, os probióticos são definidos como “microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo, devendo constar a quantidade dos microrganismos viáveis, que garanta a ação alegada dentro do prazo de validade do produto. Tal informação deve estar próxima à alegação de propriedade funcional e/ou de saúde do produto e fora da tabela de informação nutricional” (BRASIL, 2002).

Um alimento é considerado probiótico quando administrado em quantidades adequadas para conferir efeitos benéficos à saúde do hospedeiro (AVELINE, 2016). Entre os

principais microrganismos com tal potencial encontrados nos alimentos estão, em sua maioria, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, sendo atualmente as bactérias mais frequentemente utilizadas em suplementos alimentares e produtos lácteos fermentados como iogurtes e coalhadas (RAIZEL et al., 2011). Um microrganismo considerado probiótico deve suportar as adversidades do trato entérico, devendo apresentar resistência ao ácido clorídrico, à bili e às enzimas pancreáticas e digestivas. Além disso, possuir preferencialmente a capacidade de se aderir às células da mucosa intestinal, apresentar elevada velocidade de crescimento e produzir bacteriocinas, para que receba o status de probiótico de alta eficiência para o organismo (AVELINE, 2016; BROWN e VALIERI, 2004).

Bactérias do gênero *Lactobacillus* foram isoladas pela primeira vez por Moro em 1900, a partir de fezes de neonatos alimentados com leite materno, e foram chamadas de *Bacillus acidophilus*, uma designação genérica dos lactobacilos intestinais, os quais apresentaram-se como Gram-positivos, catalase negativa, não formadores de esporos, bacilos ou cocobacilos aerotolerantes, sendo o mais comum deles *L. acidophilus*, que se encontra na forma de células livres, aos pares ou em cadeias curtas, seu crescimento em meio sólido é favorecido pela anaerobiose (NOGUEIRA e GONÇALVES, 2011).

O gênero *Bifidobacterium* é hoje considerado o mais recente grupo de bactérias utilizadas em alimentos, sendo classificadas como Gram-positivas, catalase negativa, não formadoras de esporos, desprovidas de flagelo, anaeróbias, em forma de bastonete curvo e algumas espécies apresentando uma bifurcação em forma de Y (BARBOSA et al., 2011). O estudo realizado por Nogueira e Gonçalves (2011), refere-se a 30 espécies do gênero conhecidas até hoje, das quais, 10 foram isoladas de cáries dentárias, fezes e vagina de seres humanos, porém sua predominância é no intestino grosso ao nível de cólon proximal. De acordo com Raizel et al. (2011), além do conhecimento das 10 espécies de origem humana, seu trabalho ainda cita 17 espécies de origem animal, duas originárias de águas residuais e uma isolada de leite fermentado.

O consumo regular de probióticos também tem demonstrado possíveis efeitos na prevenção de doenças como: diarreia, gastroenterite, síndrome do intestino irritável, câncer, doença inflamatória do intestino (doença de Crohn e colite ulcerosa), auxilia no bom funcionamento do sistema imunológico do hospedeiro, na digestão da lactose, previne alergia infantil e doenças hepáticas (BROWN e VALIERI, 2004). Existem relatos ainda de suas aplicações na prática clínica como controle do colesterol e melhoria da resposta imune intestinal através da imunomodulação de mucosa (OLIVEIRA et al., 2017).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção das amostras de queijo de coalho

As bactérias ácido lácticas utilizadas neste estudo foram isoladas de treze amostras de queijo de coalho artesanal provenientes de estabelecimentos comerciais das cidades de Capoeiras, Correntes, São Bento do Una, Cachoeirinha, Caetés e Garanhuns, localizadas no Agreste de Pernambuco. As amostras de queijo foram adquiridas de estabelecimentos comerciais (mercadinhos) da cidade de Garanhuns e transportados até o Laboratório de Pesquisa em Microbiologia e Imunologia (LAPEMI) do CENLAG da UAG/UFRPE.

3.2 Isolamento de bactérias ácido lácticas a partir de queijo de coalho artesanal

Para o isolamento das BAL, a partir de amostras de queijo de coalho artesanal, foi utilizado o meio ágar Man-Rogosa-Shape (MRS) como descrito por Carvalho (2007), porém com algumas modificações descritas no anexo 1. O ágar foi totalmente formulado em laboratório, com a adição dos principais componentes da formulação comercial. Antes do ensaio de isolamento das BAL dos queijos de coalho, o meio elaborado *in house* foi testado com cepas de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (ATCC 11842) e *Lactobacillus casei* cepa Shirota.

Inicialmente para o isolamento, foram retiradas assepticamente em capela de fluxo laminar, porções de várias partes do queijo, de forma a obter uma amostra representativa de 10 g do produto, o qual foi homogeneizado em 90 mL de água peptonada 0,1% (p/v), em saco de *stomacher*. Diluições seriadas foram preparadas a partir da primeira diluição (10^{-1}) até a obtenção da diluição 10^{-6} , onde um volume de 100 μ L de cada diluição foi adicionado 900 μ L de água peptonada em microtubos de 1,5 mL e homogeneizados em vortex. Em seguida, 100 μ L das diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} foram semeadas em superfície de ágar MRS pelo método espalhamento de superfície (spread-plate) com auxílio da alça de Drigalski, e incubadas em jarra de anaerobiose a 25°C por até 72 horas, como descrito por Costa (2016). Transcorrido esse período, foram selecionadas placas para realização de caracterização das colônias, coloração de Gram, teste de produção de urease e catalase. Após estes testes, as colônias foram semeadas em caldo MRS a 35°C por 48 horas e, após seu crescimento, estriadas em placas de ágar MRS, incubadas em estufa a 35°C por 24 horas. Por fim, os isolados identificados como BAL foram armazenados a -70°C em caldo BHI com glicerol a 20% (v/v) para realização de estudos futuros.

3.3 Caracterização de colônias

As características das colônias foram definidas quanto ao tamanho, podendo ser puntiformes, pequenas, médias ou grandes. Quanto à forma da colônia, se circular, filamentosa, irregular, rizoide ou fusiforme. Quanto à elevação da colônia, na forma plana, elevada, convexa, crateriforme ou papilada. Quanto à margem da colônia, se inteira, ondulada, lobulada, filamentosa ou espiral. Quanto à densidade, se transparente, opaca ou translúcida. Quanto à consistência, se brilhante, cremosa, seca ou mucoide; quanto a coloração, a depender do meio em que foi cultivada, podendo-se observar as seguintes cores: amarela, branca, branca acinzentada, cinza, rosa, esverdeada, preta, alaranjada, creme e incolor (ANVISA, 2004).

3.4 Características morfotintoriais

A identificação morfológica e tintorial foi realizada pelo método de coloração de Gram. No caso das bactérias ácido lácticas são exclusivamente Gram-positivas e podem ser agrupadas como cocos, cocobacilos ou bacilos (AXELSSON, 2003).

3.5 Teste de produção de catalase e urease

Para o teste de produção de catalase, observou-se a formação imediata de bolhas de gás ao colocar a bactéria em contato com peróxido de hidrogênio a 3%, sendo este um indicativo da presença da enzima catalase na amostra. Esta reação justifica-se devido à conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio gasoso após entrar em contato com a enzima catalase. No caso das bactérias ácido lácticas, estas se enquadram no grupo das catalase negativa (NOGUEIRA E MIGUEL, 2009; FORSYTHE, 2013).

O teste de urease foi realizado com intuito de avaliar a produção de urease, uma enzima que degrada a ureia, liberando amônia e CO₂, a qual reage formando carbonato de amônio que aumenta o pH do meio de cultura, indicada pela mudança de sua coloração. Para o teste, foi coletada amostra da colônia isolada em placa de Petri, utilizando-se agulha bacteriológica, e inoculando-se em tubos de ensaio contendo ágar ureia pela técnica de picada em profundidade (NOGUEIRA E MIGUEL, 2009). De acordo com Mora (2014), algumas BAL com características probióticas são urease positivas, assim como algumas bactérias que compõem a microbiota intestinal humana. Microrganismos considerados urease positivos apresentam como vantagem o fornecimento de uma fonte extra de nitrogênio para as bactérias benéficas ao corpo humano, proveniente do amônio liberado durante a degradação da ureia.

3.6. Teste de antagonismo *in vitro*.

Foram selecionadas para o teste de antagonismo as bactérias Gram-positivas em formato de cocos ou bastões, catalase negativas, as quais apresentaram características de bactérias lácticas, de acordo com Forsythe (2013).

Os ensaios para o teste de antagonismo foram realizados de acordo com o método descrita por Tagg et al., em 1976, com adaptações de Costa (2014). As bactérias ácido lácticas foram cultivadas em caldo MRS a 36°C durante 72 horas. Após este período, foram adicionadas três discos de papel estéreis com seis mm de diâmetro (tamanho equivalente a um disco de antibiograma) na superfície do ágar MRS com a utilização de uma pinça estéril. Em seguida, 10 µL do caldo contendo as BAL foram inoculadas sobre os discos, conforme descrito por Silva e Paulo (2018). As placas foram feitas em triplicata, e incubadas sob aerobiose em estufa a 36°C por 48 horas.

Segundo Duarte et al. (2013), há uma necessidade do período de incubação de bactérias ácido lácticas ser mais extenso para que possam exibir sua atividade antimicrobiana, sendo que esses autores demonstraram que o período de 72 horas de incubação a uma temperatura de 37°C sob condições de aerobiose apresentou os melhores resultados para a produção de ácido láctico e inibição de bactérias patogênicas.

As cepas utilizadas no teste para serem inibidas pelas BAL foram *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium (ATCC 14028) e *Listeria innocua* (CLIP 12612), as quais foram cultivadas em caldo TSB enriquecido com 0,6% de extrato de levedura (TSB-YE) por 24 horas a 36°C. Decorrido este período, foi inoculada uma sobrecamada de 10 mL de ágar BHI semi-sólido (0,75%), contendo as cepas a serem inibidas, previamente diluídas em solução salina na concentração de 0,5 de acordo com a escala de Mc Farland sobre a superfície do ágar MRS contendo os discos de papel filtro impregnados com as bactérias ácido lácticas conforme adaptação citada por Costa (2016). As placas foram incubadas em condições de aerobiose em estufa a 36°C durante 24 a 48 horas. Decorrido este período, verificou-se a presença de halo de inibição, independente do seu diâmetro, sendo este um forte indicativo de atividade antagonista frente às bactérias *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* e *Listeria innocua*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 13 amostras de queijo de coalho analisadas, foram selecionadas para avaliação 42 colônias de micro-organismos nas placas de MRS, entre estas foram verificadas a presença de leveduras e bactérias com morfologia de cocos ou bacilos, todas Gram-positivas. Destas, 36 (85,71%) apresentaram-se negativas para o teste de catalase, 14 (33,3%) apresentaram morfologia de cocos, 24 (57,14%) apresentaram morfologia de bacilos, características típicas de bactérias ácido lácticas, conforme descritas por Axelsson (2004), e três colônias (7,14%) se apresentaram como leveduras na coloração de Gram (**Figura 1**).

Os resultados apresentados após o teste de urease foram considerados como “fraco positivo”, visto que a alteração de coloração do meio de cultura utilizado ocorreu de forma muito leve em 10 (4,2%) dos 25 (59,52%) isolados testados (**Figura 2**). A produção de urease no meio de cultura é indicada pela mudança de sua coloração, alterando de amarelo (controle negativo) para rosa intenso ou vermelho (FERNANDES, 2014). Estudos realizados por Mora (2014) relataram a existência de algumas BAL urease positivas utilizadas em produtos lácteos fermentados, a exemplo do *Lactobacillus reuteri* e *S. thermophilus*.

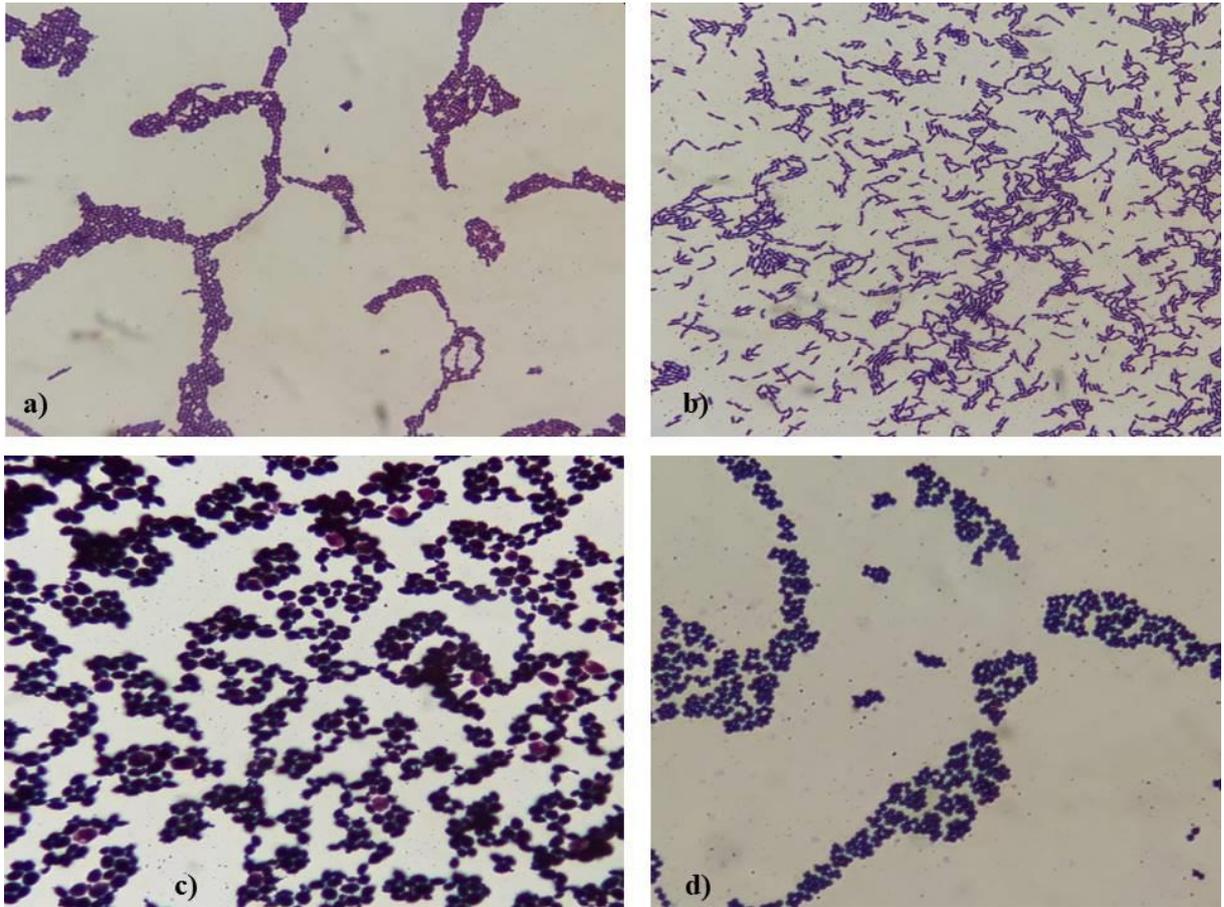


Figura 1 - Características morfotintoriais de bactérias ácido láticas isoladas de queijos de coalho do agreste de Pernambuco. a) bacilos agrupados; b) bacilos agrupados como diplobacilos; c) leveduras; d) cocos. Fonte: Arquivo pessoal (2019).



Figura 2. Teste de urease em colônias presuntivas de bactérias ácido láticas. Fonte: Arquivo pessoal (2019).

A escolha do ágar MRS para cultivo de bactérias ácido lácticas justifica-se devido a sua capacidade de manter viável uma grande variedade de espécies destas bactérias, como comprovaram em seus experimentos Carr et al. (2002). Durante este experimento até a fase de teste de antagonismo, observou-se a perda da viabilidade de vários isolados às sucessivas repicagens em caldo MRS, o que também foi observado por Carvalho (2007) durante a verificação da morfologia dos microrganismos, sendo considerados não cultiváveis devido sua fragilidade quando isolados individualmente. Conforme Axelsson (2003), as necessidades nutricionais das BAL são complexas, sendo estas dependentes da presença de um carboidrato fermentável para seu crescimento ativo e produção de ácido lático, se homofermentativas ou produção de ácido acético, etanol e dióxido de carbono além do ácido lático, no caso de heterofermentativas.

Em meio ágar MRS, as colônias presuntivas de bactérias ácido lácticas crescem com uma coloração esbranquiçada, consistência mucoide ou cremosa, de tamanho pequeno e forma arredondada ou ovalada (**Figura 3**).

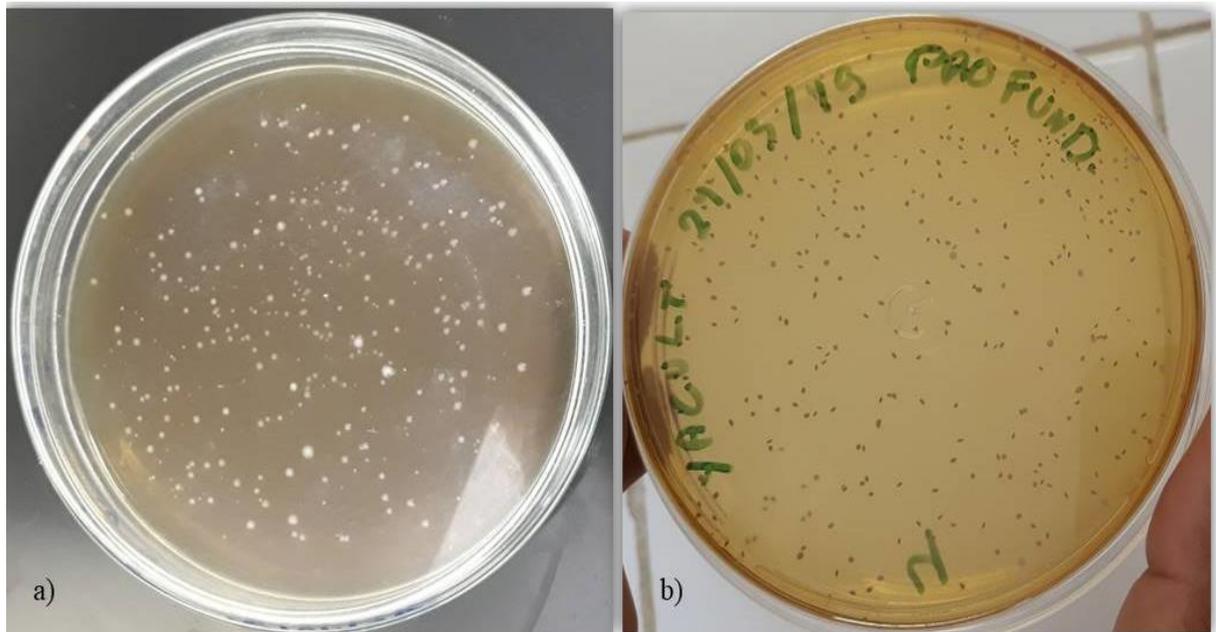


Figura 3: Colônias presuntivas de bactérias ácido lácticas. Em a) colônias formadas sobre Ágar MRS pela técnica de espalhamento em superfície (spread plate); b) colônias formadas em meio ao Ágar MRS pela técnica de espalhamento em profundidade (pour plate). Fonte: Arquivo pessoal (2019).

Para o teste de antagonismo foram selecionados 12 isolados (**Tabela 3**) com características indicativas de BAL, com morfologia de cocos ou bacilos, Gram-positivos e catalase negativo, utilizando-se como controle *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

pertencente ao banco de cepas do LAPEMI. A atividade antagonista *in vitro* frente às estirpes de *Salmonella* Typhimurium, *E. coli* e *L. innocua* foi demonstrada pela presença de halo de inibição independente do seu tamanho.

Tabela 3. Teste de ação antagonista *in vitro* pela formação de halo de inibição. Bactérias ácido lácticas provenientes de queijo de coalho artesanal que apresentaram ação inibitória contra *Salmonella* Typhimurium, *E. coli* e *L. innocua*.

Teste de antagonismo				
Isolados	Morfologia	<i>E. coli</i> (ATCC 8739)	<i>S. Typhimurium</i> (ATCC 14028)	<i>L. innocua</i> (CLIP 12612)
Q 1.3	Cocos	(+)	(+)	
Q 5.1	Bacilos	(+)		(+)
Q 6.1	Cocos	(+)		
Q 6.2	Bacilos			
Q 8.1	Bacilos			
Q 8.2	Bacilos			
Q 9.2	Bacilos	(+)	(+)	
Q 10.1	Bacilos	(+)	(+)	
Q 10.2	Bacilos	(+)		
Q 11.2	Bacilos			(+)
Q 12.1	Cocos	(+)	(+)	(+)
Q 13.1	Bacilos	(+)		(+)
<i>L. delbrueckii</i>	Bacilos	(+)	(+)	(+)

No presente estudo, 9 (64,27%) colônias apresentaram forte halo de inibição contra *E. coli*, 5 (35,71%) formaram halo contra *Salmonella* Typhimurium, e 5 (35,71%) formaram halo de inibição para *L. innocua*. Os resultados deste experimento apresentam uma forte concordância com os obtidos por Duarte et al. (2013), os quais demonstraram ação antagonista contra *E. coli*, onde em 3,3% (um) houve formação de halo de 10 mm e 16,6% (cinco) apresentaram halos de 12 mm de diâmetro.

Os halos de inibição sobre o crescimento das cepas patogênicas utilizadas neste estudo ao redor das áreas correspondentes ao crescimento de bactérias ácido láticas podem ser visualizados nas figuras 4, 5, 6 e 7.

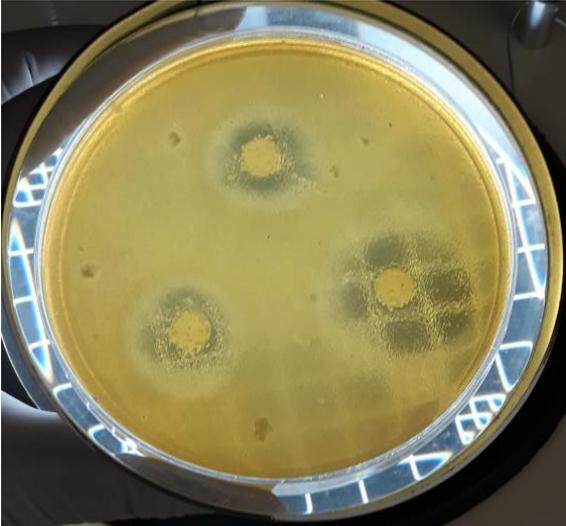


Figura 4: Inibição de *E. coli* por BAL isolado Q 5.1. Fonte: Arquivo pessoal (2019)

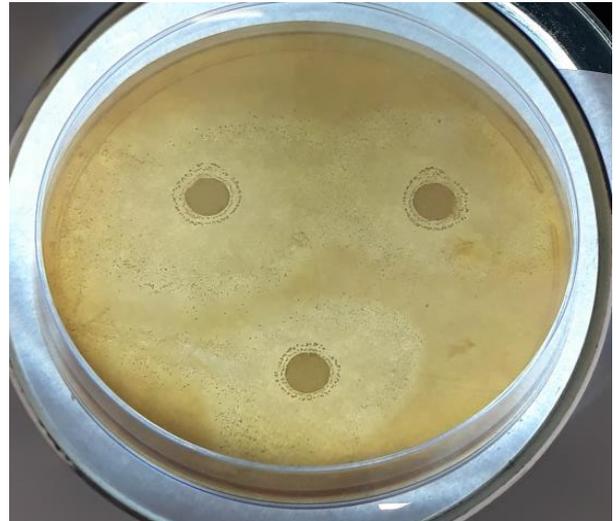


Figura 5: Inibição de *L. innocua* por BAL isolado Q 13.1. Fonte: Arquivo pessoal (2019)



Figura 6: Inibição de *E. coli* por BAL isolado Q 6.1. Fonte: Arquivo pessoal (2019)

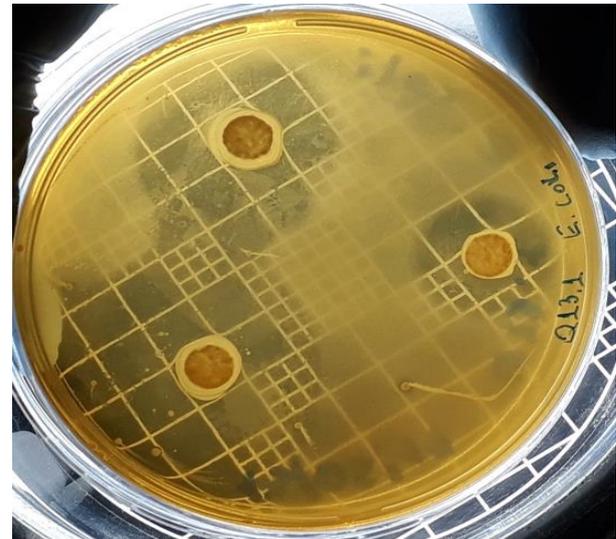


Figura 7: Inibição de *E. coli* por BAL isolado Q 13.1. Fonte: Arquivo pessoal (2019)

Resultados semelhantes também foram obtidos por Chioda et al. (2007), os quais observaram em seus experimentos ação antagonista de algumas cepas de BAL contra *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7, *S. aureus*, *Listeria innocua* e *Pseudomonas fragi* pela simples presença de halo de inibição, e afirmam que a variação da formação de um halo para outro pode ocorrer em decorrência da produção em maior ou menor quantidade de substâncias

antimicrobianas como peróxido de hidrogênio, ácidos orgânicos e bacteriocinas. Tais resultados também corroboram com os encontrados por Pereira e Gomes (2007), onde em seus experimentos observaram que a maior inibição encontrada ocorreu contra *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente.

Neste experimento, a avaliação da natureza das substâncias antagonistas produzidas pelas culturas utilizadas não foi realizada, assim como no trabalho desenvolvido por Duarte et al. (2013), sendo as atividades inibitórias possivelmente justificadas pelo trabalho desenvolvido por Pereira e Gomes (2007) e Chioda et al. (2007), os quais observaram que, durante a fase de multiplicação das bactérias ácido lácticas, ocorre a queda do pH do meio em decorrência da presença de ácido láctico e outros por elas produzidos, fatores estes que podem determinar a inibição do crescimento de culturas patogênicas e deteriorantes de alimentos por proporcionar um ambiente inóspito para sua sobrevivência.

De acordo com Moreira (2007) e Araújo (2016), bactérias do gênero *Salmonella* crescem em uma ampla faixa de pH que varia entre 4,5 e 8,0, com sua faixa ótima de 6,0 a 7,5. Já o gênero *Listeria* cresce em pH ótimo de 6,0 a 8,0, embora consiga se multiplicar em pH entre 4,0 e 9,5, e *E. coli*, pertencente ao grupo dos coliformes termotolerantes, apresenta um pH ótimo em torno de 6,0 a 8,0. Estudos realizados por Sabo et al. (2014) e Loureiro (2015), apontam que as bactérias ácido lácticas apresentam certa tolerância a meios ácidos, o principal produto da sua fermentação é o ácido láctico e o seu pH ótimo de crescimento varia de 4,0 a 7,5, apesar de suportarem pH tão baixo quanto 3,8, como relata Forsythe (2013).

Uma segunda hipótese que pode justificar a influência na formação dos halos de inibição é o fato das bactérias ácido lácticas se desenvolverem ao mesmo tempo em que as cepas de *Salmonella* Typhimurium, *E. coli* e *L. innocua* utilizadas neste trabalho, proporcionando a inibição por competição pelos nutrientes do meio de cultura utilizado (DUARTE et al., 2013).

Levando-se em consideração a importância da fabricação e comercialização de queijos de coalho artesanais no estado de Pernambuco, sobretudo em relação à promoção da Saúde Pública, incluindo em sua confecção as Boas Práticas de Fabricação (BPF), pesquisas relacionadas com a utilização de bactérias ácido lácticas como bioconservantes e inibidoras de patógenos estão em crescente avanço, pois sua habilidade em promover atividade antagonista pode contribuir para sua utilização na indústria de alimentos.

A crescente busca das indústrias por microrganismos capazes de compor a microbiota de alimentos considerados probióticos tem aumentado o interesse por estudos mais detalhados acerca dos seus efeitos no organismo humano e da forma correta de sua utilização, com

intuito de proporcionar saúde e bem estar à população, na tentativa de melhorar a qualidade nutricional e aumentar a expectativa de vida destes indivíduos, através da alimentação, por ser esta, um fator primordial na prevenção e controle de várias doenças e na promoção da saúde.

O estudo do efeito inibitório das bactérias ácido lácticas frente às bactérias patogênicas, de um modo geral, é de extrema importância, visto ser esse um dos pré-requisitos para a utilização de BAL como bioconservadores pelas indústrias de alimentos. Uma vez que demonstram grande capacidade de proporcionar um meio ácido e sobreviver nele, ao mesmo tempo preservando sua capacidade de produzir bacteriocinas, o que faz com que algumas bactérias patogênicas e deteriorantes não sobrevivam neste tipo de ambiente, considerado desfavorável para sua multiplicação.

CONCLUSÃO

Neste estudo foi possível isolar e identificar bactérias ácido lácticas de queijos de coalho artesanais, bem como testar e comprovar sua capacidade inibitória frente a bactérias consideradas prejudiciais aos alimentos e consumidores.

Sendo assim, as características de resistência ao meio ácido, às próprias bacteriocinas e o poder antagônico observados nas bactérias testadas podem contribuir para sua utilização em alimentos, uma vez que podem aumentar seu tempo de prateleira, conservar suas características originais, trazendo ainda grandes benefícios à saúde da população.

REFERÊNCIAS

ANDLAUER, W. FÜRST, P. Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook. **Food Research International**. v. 35, p. 171-176, 2002. Disponível Em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096399690100179X>. Acesso em 12/06/2019

ARAÚJO, V. G. **Estudo preditivo da sobrevivência e crescimento de bactérias patogênicas em queijo de coalho**. 2016. 76f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Nutrição) – Universidade Federal da Paraíba – João Pessoa, 2016.

AVELINE, V. A. **Uso de probióticos para manutenção da fase de remissão em pacientes com doença de crohn**. 2016. 54f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Nutrição) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, 2016.

AXELSSON, L. Acid lactic bacteria: classification and physiology. *In*: SALMINEN, S., WRIGHT, A.V., OUWEHAND, A. **Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects**. 4 ed. New York: Marcel Dekker Inc, p. 1-17, 2003.

BARBOSA, F. H. F. et al. O gênero *Bifidobacterium*: Dominância a favor da vida. **Ciência Equatorial**. v.1, n.2, semestre 2, 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Interpretação de dados microbiológicos. **Métodos para o TSA - Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos: Disco-difusão**. AT Mracional, 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção em serviço de saúde. **Edição comemorativa para o IX congresso brasileiro de controle de infecção e epidemiologia hospitalar**. 1 ed. Salvador, BA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução-RDC n. 2, de 07 de janeiro de 2002**. Regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcionais e/ou de saúde. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 09 jan. 2002. Disponível em: <https://www.saude.rj.gov.br/comum/code/MostrarArquivo.php?C=MjI1Mw%2C%2C>. Acesso em: 17/04.2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº 30, de 26 de junho de 2001**. Regulamento técnico de identidade e qualidade de queijos de coalho. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2001. Disponível em: <https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/instrucao-normativa-n-30-de-26-de-junho-de-2001,1039.html>. Acesso em 12/04/2019

BROWN, A. C; VALIERE, A. Probiotics and Medical Nutrition Therapy. **Nutrition in Clinical Care**. v, 7, p. 56-68, 2004.

CAPELLARI, J. B. **Biossíntese de ácido láctico por *Lactobacillus amylovorus* a partir de resíduos agroindustriais**. 2010. 71f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Universidade da Região de Joinville. Joinville, 2010.

CARNEIRO, R. P. **Desenvolvimento de uma cultura iniciadora para produção de kefir**. 2010. 143 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2010.

CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: a literature survey. **Critical Reviews Microbiology**, V. 28, P. 281-370, 2002.

CARVALHO, J.D.G. **Caracterização da microbiota láctica isolada de queijo de coalho artesanal produzido no Ceará e de suas propriedades tecnológicas**. 2007. 154 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2007.

CHIODA, T.P.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; GARCIA, G.R.; PIGATTO, C.P.; RIBEIRO, C.A.M.; RAGAZZANI, A.V.F. Inibição do crescimento de *Escherichia coli* isolada de Queijo “Minas Frescal” por *Lactobacillus acidophilus*. **Ciência Rural**, Universidade Federal de Santa Maria, v.37, n.2, p.583-585, mar-abr. 2007.

COGAN, T. M.; BARBOSA, M.; BEUVIER, E. et al. **Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy Products**. In *Journal of Dairy Research*, v. 64, 409-421, 1997.

COSTA, A. C. C. C. **Isolamento de Bactérias Lácticas produtoras de bacteriocinas e avaliação de sua atividade frente a patógenos alimentares em sistemas de bioconservação de produto lácteo**. 2016. 58f. Dissertação (mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2016.

COSTA, E. F. et al. Avaliação antagonista de bactérias ácido lácticas isoladas de queijo coalho artesanal produtoras de bacteriocinas. **XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química - Engenharia e Tecnologia de Alimentos**. Florianópolis/SC, 2014.

COTTER, P. D., HILL, C., ROSS, R. P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, 3(10), 777-788, 2005. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrmicro1273>. Acesso em 05/06/2019

DUARTE, M. C. K. H. Ação antagonista de bactérias lácticas frente ao crescimento de estirpe patogênica. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer – Goiânia, v.9, n. 16, p. 25, julho/2013.

EL-GHAISH, S. et al. Potential use of lactic acid bacteria for reduction of allergenicity and for longer conservation of fermented foods. **Trends in Food Science e Technology**, v. 22, p. 509-516, 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224411000926>. Acesso em 20/05/2019

EMBRAPA AGROINDÚSTRIA TROPICAL. **Microbiota láctica de queijos artesanais**. Fortaleza, CE, dez. 2009. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agroindustria-tropical/busca-de-publicacoes/-/publicacao/748514/microbiota-latica-de-queijos-artesanais>. Acesso em: 28/03/2019

FEERNANDES, G. A. A. **Avaliação do Potencial Tecnológico e Enzimático de Bactérias Ácido Lácticas e Leveduras Isoladas de Queijo de coalho Artesanal**. 2014. 108f. Dissertação (mestrado em Biociência Animal) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2014.

FORSYTHE, Stephen J. **Microbiologia da Segurança dos Alimentos**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

FURTADO, D. N. **Isolamento de bactérias produtoras de bacteriocinas e sua aplicação no controle de *Listeria monocytogenes* em queijo fresco de leite de cabra**. 2010. 87f.

Dissertação (mestrado em Ciência dos Alimentos, área de Bromatologia) – Universidade de São Paulo - Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental. São Paulo, 2010.

GRAPPIN, R.; BEUVIER, E. Possible Implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese. **International Dairy Journal**, v. 7, n. 12, p.751-871, 1997.

LOUREIRO, D. S. P. M. **Estudos da bacteriocina produzida por *Lactobacillus plantarum* B391 para potencial utilização na Indústria**. 2015. 73f. Dissertação (Mestrado em Gestão da Qualidade e Segurança Alimentar) - Instituto Politécnico de Viana do Castelo. Viana do Castelo, 2015.

MEDINA, R.; KATZ, M.; GONZALES, S.; OLIVER, G. Characterization of lactic acid bacteria in Ewe's milk and cheese from Northwest Argentina. **Journal Food Protection**, Des Moines, v. 64, n. 4, p. 559-563, Apr., 2001.

MORA, D. ARIOLI, S. Microbial Urease in Health and Disease. **Plos Pathogens**. December 2014. V. 10, Issue 12. e1004472 Disponível em: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1004472>. Acesso em 13/06/2019

MORAES, F. P. COLLA, L. M. Alimentos funcionais: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia. v. 3, n. 2, p. 99-112, 2006.

MOREIRA, H. O. M. **Isolamento de Escherichia coli ácido-resistente em fezes de bovinos submetidos à dieta de volumoso e concentrado**. 2007. 60f. Dissertação (Mestrado em Nutrição Humana) – Universidade de Brasília. Distrito Federal, 2007.

NOGUEIRA, J. C. R.; GONÇALVES, M. C. R.; Probióticos – Revisão de literatura. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, João Pessoa. V. 15, n 4, p. 487- 492, 2011.

NOGUEIRA, J. M. R.; MIGUEL, L. F. S. Bacteriologia. In: MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. (orgs). **Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde**, v. 4; Rio de Janeiro: EPSJV, IOC, P. 1221-1397, 2009.

OLIVEIRA, J. L.; ALMEIDA, C.; BOMFIM, N. S. A importância do uso de Probióticos na saúde humana. **Revista Unoesc & Ciência** – ACBS Joaçaba: v. 8, n 1, p. 7-12, 2017.

PAQUEREAU, B.; MACHADO, G.; CARVALHO, S. (editores). **O queijo de coalho em Pernambuco: histórias e memórias**. Garanhuns: Engenho Comunicação, 2016 - 146p. : il.

PAULA, J. C. J.; CARVALHO, A. F.; FURTADO, M. M. Princípios básicos de fabricação de queijo: do histórico à salga. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Mar/Jun, n 367/368, p. 19-25, 2009.

PEREIRA, V.G.; GOMÉZ, R.J.H. Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus acidophilus*, contra microrganismos patogênicos veiculados por alimentos. **Seminário de Ciências Agrárias**. Londrina: Universidade Estadual de Londrina, v.28, n. 2, p. 229- 240, abr./jun. 2007.

PERNAMBUCO. Lei nº 16.312, de 11 de janeiro de 2018. Dispõe sobre o processo de Produção do Queijo Artesanal e dá outras providências, a fim de incluir o queijo de manteiga, a manteiga de garrafa e o doce de leite no processo de produção artesanal. **Diário Oficial do Estado**, Pernambuco, 12 jan. 2018. Disponível em: <https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=355402>. Acesso em: 17/04.2019

PERNAMBUCO. Portaria ADAGRO nº 007, de 04 de janeiro de 2018. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Queijo de Coalho no estado de Pernambuco, adicionado ou não de condimentos. **Diário Oficial do Estado**, Pernambuco, 04 jan. 2018.

QUERE, F.; DESCHAMPS, A.; URDACI, M. C. DNA probe and PCR-specific reaction for *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Applied Microbiology**, V. 82, p. 783-790, 1997.

RAIZEL, R. et al. Efeitos do consumo de probióticos, prebióticos e simbióticos para o organismo humano. **Revista Ciência & Saúde**, Porto Alegre, v. 4, n. 2, p. 66-74, jul./dez. 2011.

RESENDE, M. F. S.; COSTA, H. H. S.; ANDRADE, E. H. P. et al. Queijo de minas artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude das queijarias nas populações de bactérias ácido lácticas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.6, p.1567-1573, 2011. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352011000600039. Acesso em 20/05/2019

SABO, S., VITOLO, M., GONZÁLEZ, J. M. D., OLIVEIRA, R. P. d. S. Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. **Food Research International**, v. 64, p. 527-536, 2014.

SANTOS, R. B.; BARBOSA, L. P. J. L.; BARBOSA, F. H. F. Probióticos: Microrganismos funcionais. **Ciência Equatorial**, v. 1, nº 2, 2011.

SANTOS, W.L.M. **Aislamiento y caracterización parcial de una bacteriocina producida por *Pediococcus* sp.** 347, de origem carnico. 1993. 294f. Tese (Doutorado) – Universidade Complutense de Madrid, Madrid, 1993.

SILVA, E. M. ECHEVERRIGARA, S. DELAMARE, A. P. L. Padronização de método para estudo de bacteriocina produzida por bactérias lácticas isoladas de queijo Serrano. In: **Reunião Anual da SBPC/UFSC**, 58. 2006, Florianópolis. Disponível em: http://www.sbpcnet.org.br/livro/58ra/jnic/RESUMOS/resumo_3311.html. Acesso em 17/04/2019

SILVA, J. G. **Identificação molecular de bactérias ácido lácticas e propriedades probióticas in vitro de *Lactobacillus* spp. Isolados de queijo Minas artesanal de Araxá, Minas Gerais.** 2016. 82f. Dissertação (mestrado em Ciência Animal, Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária. Belo Horizonte, 2016.

SILVA, R. A. et al. Avaliação da microbiota bacteriana do queijo de coalho artesanal produzido na região Agreste do estado de Pernambuco. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.64, n.6, p.1732-1738, 2012a.

SILVA, S. B.; PAULO, E. M. Teste de antagonismo da microbiota do soro de queijo comerciais e coalhadas produzidos de forma artesanais. In: **Anais Seminário de Iniciação**

Científica/UEFS, n 22. Feira de Santana 2018. Disponível em:
<http://periodicos.uefs.br/ojs/index.php/semic/article/view/4214>. Acesso em 30/05/2019

VIANA, A. C. **Avaliação de queijo de coalho produzido com bactérias lácticas endógenas**. 2009. 80f. Dissertação (mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia. Salvador, 2009.

ANEXO 1. CONFECCÃO DO MEIO DE CULTURA ÁGAR MRS: FÓRMULA PARA 1 L.

Os principais compostos químicos comerciais utilizados para a formulação do ágar MRS estão descritos na tabela abaixo com suas respectivas proporções. As substituições de compostos químicos foram as seguintes: Substituiu-se o polissorbato 80 (Tween 80) por polissorbato 20 (Tween 20) em meio líquido em concentração proporcional ao primeiro - Citrato de amônio foi substituído por citrato de amônia com ferro, e o sulfato de manganês foi substituído por cloreto de manganês. Ao final, o pH foi ajustado para 6,4 +/- 0,2.

Tabela 4. Confeccão do meio de cultura MRS (Man, Rogosa e Sharpe), modificado *in house*.

Composto Químico	Quantidade
Enzima Tecidual Animal	10 g
Extrato de Carne	10 g
Extrato de Levedura	5 g
Dextrose	20 g
Acetato de Sódio	5 g
Polissorbato 80 (Tween 80)	1 mL
Citrato de Amônio e Ferro	2 g
Cloreto de Manganês	0,05 g
Sulfato de Magnésio	0,1 g
Ágar Bacteriológico	15 g

Modo de preparo do meio de cultura: Pesar em balança de precisão todos os componentes do meio conforme recomendações do fabricante, suspender em 1 L de água destilada, ajustar o pH e só após acrescentar o ágar. Ferver no micro-ondas por 1 minuto ou até diluição e homogeneização total dos componentes, autoclavar por 15 minutos a temperatura de 121°C. Após esterilização, o meio tem aspecto ligeiramente turvo e âmbar claro a médio.