

Produção Animal

Prospecção e caracterização de bactérias ácido-láticas em leite cru provenientes de rebanhos bovinos do estado de Rondônia

Maurino Silvino Virgolino¹, Carolina Schettino Kegele², Flávio Augusto Pereira Terra³, Bruna Vieira Alonso⁴, João Batista Ribeiro⁵, Juliana Alves Dias⁶

Resumo

O objetivo do trabalho foi isolar e caracterizar bactérias ácido-láticas (BAL) em amostras de leite cru da microrregião de Porto Velho, Rondônia visando a constituir coleção biológica geneticamente diversificada e com potencial uso tecnológico. Foram coletadas amostras de leite de oito propriedades rurais e encaminhadas ao Laboratório de Sanidade Animal da Embrapa Rondônia. Foram obtidos 61 isolados em meio MRS e destes, 20 foram definidos como cocos, bacilos ou cocobacilos gram positivos e catalase negativa. Os isolados caracterizados como BAL foram encaminhados ao Laboratório de Microbiologia do Leite da Embrapa Gado de Leite para análise molecular. Dos 20 isolados, oito foram identificados como *Lactobacillus* spp. por meio da técnica de PCR. Os isolados de BAL foram avaliados pela Rep-PCR indicando dezessete perfis geneticamente distintos. Estas linhagens serão taxonomicamente identificadas em nível de espécie e caracterizadas quanto ao potencial uso tecnológico na cadeia produtiva do leite.

Palavras-chave: Análise molecular, BAL, *Lactobacillus* spp.

Prospection and characterization of lactic acid bacteria in raw milk from dairy herds in the state of Rondônia

Abstract

The objective of this study was to isolate and characterize lactic acid bacteria (LAB) from samples of raw milk from the micro-region of Porto Velho/Rondônia in order to constitute a genetically diverse biological collection with technological potential application. Milk samples were collected from eight dairy farms and sent to Animal Health Laboratory/Embrapa Rondônia. Sixty one isolates were obtained in Man Rogosa Shape medium, and of these, 20 were defined as catalase negative gram positive cocci, coccobacillus and bacilli. The isolates characterized as LAB were sent to the Milk Microbiology Laboratory/Embrapa Dairy Cattle for molecular analysis. Of the 20 isolates, eight were identified as *Lactobacillus* spp. through the PCR technique. The LAB isolates were evaluated by Rep-PCR indicating seventeen genetically distinct profiles. These strains will be taxonomically identified at the species level and characterized in terms of potential technological use in the milk production chain.

Keywords: BAL, *Lactobacillus* spp., molecular analysis.

¹ Graduando em Medicina Veterinária, Centro Universitário Aparício Carvalho - FIMCA.
E-mail: maurinosilvino@gmail.com.

² Farmacêutica, Mestranda no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, Universidade Federal de Juiz de Fora.

³ Graduando em Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora.

⁴ Graduanda em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Juiz de Fora.

⁵ Biólogo, D.Sc. Microbiologia Agrícola, Pesquisador da Embrapa Rondônia.

⁶ Médica-veterinária, D.Sc. Ciência Animal, Pesquisadora da Embrapa Rondônia.

Introdução

As bactérias ácido-láticas (BAL) apresentam grande potencial para aplicação na cadeia produtiva do leite em virtude da sua habilidade de produzir moléculas bioativas com atividade antimicrobiana e, ou capazes de transformar os nutrientes fundamentais do leite em compostos que conferem e potencializam propriedades sensoriais e influenciam diretamente na promoção da saúde. São bactérias gram-positivas com resultado negativo no teste da catalase cujo grupo compreende 11 gêneros: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus* e *Weissella*. Bactérias lácticas que utilizam preferencialmente a lactose como fonte de carbono são homofermentativas ou heterofermentativas.

Essas bactérias têm sido usadas como culturas iniciadoras ou adjuntas para a fermentação de alimentos, devido às suas contribuições para as características sensoriais destes produtos e pela estabilidade microbiológica a eles conferida. Espécies diferentes têm padrões de comportamento e atividades diferentes sob condições industriais, assim, o objetivo do trabalho foi isolar e caracterizar BAL a partir de amostras de leite cru provenientes da microrregião de Porto Velho, Rondônia visando a constituir coleção biológica geneticamente diversificada, e com potencial de aplicação na cadeia produtiva do leite.

Material e Métodos

Foram analisadas amostras de leite provenientes de oito propriedades rurais localizadas nos municípios de Porto Velho e Candeias do Jamari no período de julho/2021 a fevereiro/2022. A coleta das amostras de leite total foi realizada, após homogeneização, em frascos de vidro estéreis, conservadas em caixas isotérmicas, encaminhadas ao Laboratório de Sanidade Animal da Embrapa Rondônia e mantidas refrigeradas até a análise.

Para a pesquisa dos microrganismos foi realizada a diluição seriada das amostras de leite em solução tampão fosfato até 1:100.000. Em seguida, 0,1 mL das diluições 1:100, 1:1.000, 1:10.000, 1:100.000 foram inoculadas em duplicata por espalhamento em placas em ágar Man Rogosa Shape (MRS) para identificação de BAL e em ágar padrão leite a 10% para psicrotróficos. Para a pesquisa de mesófilos foi realizada semeadura em profundidade em ágar padrão. As placas foram incubadas a 36 °C por 48 horas para BAL e mesófilos, e a 7 °C por 10 dias para psicrotróficos. Após a incubação foi realizada a contagem de mesófilos e psicrotróficos de acordo com Silva et al. (2010). Para avaliação do crescimento bacteriano das placas de MRS, as colônias foram contadas e as que apresentaram características diferentes foram repicadas em novas placas e incubadas nas condições descritas para BAL, para verificação da pureza dos isolados e identificação presuntiva pelos testes de coloração de gram e catalase. Os isolados caracterizados como cocos, bacilos ou cocobacilos gram positivos e catalase negativa foram conservados em litmus milk e congelados a -20 °C e uma alíquota foi encaminhada em meio MRS para o Laboratório de Microbiologia do Leite da Embrapa Gado de Leite para identificação e caracterização molecular.

Para a identificação do gênero *Lactobacillus* spp. todos os bacilos e cocobacilos foram submetidos a uma PCR monoplex gênero-específica de acordo com a metodologia descrita por Dubernet, Desmasures e Guéguen (2002) e Senan, Grover e Batish (2008) com modificações. O *Lactobacillus casei* foi usado como controle positivo. A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada a partir de colônias isoladas utilizando kit GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega, USA). Cada reação continha tampão 1X, MgCl₂ (2,25 mM), DNTPs (0,4 mM cada), primers LbLMA1 e R16-1 (80 nM cada), Taq DNA Polimerase (0,06 U/μl), uma colônia bacteriana e água deionizada em quantidade suficiente para um volume total de 15 μl. A amplificação do

DNA foi realizada em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, EUA) partindo de uma desnaturação inicial (95 °C, 5 min), seguida de 20 ciclos de desnaturação (95 °C, 30 s), anelamento (59 °C, 30 s) e extensão (72 °C, 30 s) e uma etapa final de extensão (72 °C, 7 min). Todas reações foram submetidas a eletroforeses horizontais em gel de agarose 0,9% (Ludwig Biotec, Brasil) com voltagem constante (80 V) por aproximadamente 2 h. Após as corridas, os géis foram corados com solução de brometo de etídio (Sigma-Aldrich, EUA) na concentração de 0,01% por 7 min e em seguida banhado em água destilada. A visualização e captura das imagens dos géis foi feita em fotodocumentador LPIX-EX (Loccus Biotecnologia, Brasil) sob luz ultravioleta. A amplificação de um fragmento específico de DNA com 250 pb foi considerada evidência à identificação do isolado como *Lactobacillus* spp.

Para todos os isolados obtidos foi gerado um perfil molecular de DNA utilizando a técnica de Rep-PCR de acordo com a metodologia de Versalovic et al. (1994) com modificações. A PCR foi realizada de colônias isoladas com utilização do kit GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega, EUA). Cada reação continha tampão 1X, MgCl₂ (1,5 mM), DNTPs (0,2 mM cada), primer GTG5 (2 µM), Taq DNA Polimerase (0,06 U/µl), uma colônia bacteriana e água deionizada em quantidade suficiente para um volume total de 25 µl. A amplificação do DNA foi realizada em um termociclador GeneAmp PCR Sistem 9700 (Applied Biosystems, EUA) partindo de uma desnaturação inicial (95 °C, 15 min), seguida de 30 ciclos de desnaturação (95 °C, 30 s), anelamento (40 °C, 1 min) e extensão (65 °C, 8 min) e uma etapa final de extensão (65 °C, 10 min). Todas os amplificados foram submetidos a eletroforese de acordo com a metodologia descrita acima, e os perfis obtidos foram comparados visualmente.

Resultados e Discussão

As amostras de leite cru avaliadas dos municípios de Porto Velho e Candeias do Jamari resultaram em 61 isolados fenotipicamente diferentes em meio MRS, e destes, 20 foram caracterizados presuntivamente como BAL, sendo 13 (65%) identificados morfológicamente como cocos, 6 (30%) na forma de bacilos e 1 (5%) cocobacilos gram positivos. A prospecção de linhagens autóctones de BAL, adaptadas as condições ambientais e matéria-prima local/regional visa a obtenção de linhagens mais adaptadas e eficientes do que as disponíveis comercialmente.

O número médio de isolados de BAL por amostra de leite cru em meio MRS foi 2,5 (20/8). Luercio (2021) avaliou queijos artesanais de Minas Gerais e obteve média de 4,8 (191/40) isolados diferentes de BAL por amostra utilizando os meios MRS e M17, indicando maior isolamento de bacilos em MRS (74,5%) e de cocos em M17 (55,3%). A matriz leite foi utilizada neste estudo em virtude do estado de Rondônia não possuir tradição de produção de queijos artesanais elaborados a partir de leite cru.

Oito isolados de BAL foram classificados como gênero *Lactobacillus* spp. na PCR, sendo identificados em três das propriedades avaliadas (37,5%). Propriedades que apresentaram isolados de BAL caracterizados como *Lactobacillus* spp. apresentaram média de contagens de mesófilos e psicrotróficos no leite de 432.000 UFC/mL e 22.333 UFC/mL (Tabela 1). Essas propriedades possuíam como característica comum o uso de silagem de milho na suplementação das vacas leiteiras. Propriedades que apresentaram isolamentos de BAL não caracterizados como *Lactobacillus* spp. apresentaram médias de 121.000 UFC/mL e 2.236 UFC/mL para contagens de mesófilos e psicrotróficos respectivamente. Ortolani (2009) avaliando amostras de leite de rebanhos de Minas Gerais demonstrou que 94,4% das amostras com isolamento de BAL apresentaram contagem de mesófilos acima de 100.000 UFC/mL.

Tabela 1. Características microbiológicas do leite das propriedades avaliadas, microrregião de Porto Velho, Rondônia.

Propriedade	Município	Contagem de microrganismos (UFC/mL)		Nº isolamentos	
		Mesófilos	Psicrotróficos	BAL	<i>Lactobacillus</i> spp.
1	Porto Velho	4.500	10	3	0
2	Porto Velho	445.000	44.500	5	4
3	Candeias do Jamari	5.750	170	1	0
4	Candeias do Jamari	60.500	3.500	3	0
5	Candeias do Jamari	71.000	20.500	3	3
6	Candeias do Jamari	350.000	4.500	2	0
7	Candeias do Jamari	780.000	2.000	2	1
8	Candeias do Jamari	185.500	3.000	1	0

Dos 20 isolados de BAL em leite cru, foram identificados 17 perfis moleculares distintos (85%), sendo dez isolados (58,8%) obtidos no município de Candeias do Jamari e sete (41,2%) no município de Porto Velho. O perfil dos isolados foi distinto em todas as propriedades quando comparadas entre si. Dos oito isolados bacterianos identificados como *Lactobacillus* spp., seis (75%) apresentaram perfis moleculares diferentes. Luercio (2021) avaliando a diversidade genética de *Lactobacillus* spp. obtidos a partir de queijo minas artesanal de oito regiões de Minas Gerais, identificou 83 isolados do gênero *Lactobacillus* spp. sendo 64 (77,1%) com perfis moleculares distintos. Neste estudo, cinco linhagens de *Lactobacillus* spp. foram identificadas com potencial tecnológico para utilização em culturas adjuntas.

Conclusão

O presente estudo possibilitou o isolamento de 17 BAL geneticamente não redundantes a partir de amostras de leite cru de oito rebanhos leiteiros da microrregião de Porto Velho, Rondônia, incluindo linhagens pertencentes ao gênero *Lactobacillus* (n=6). A utilização exclusiva do meio MRS pode ter subestimado o número de isolamentos de BAL, sendo indicada a utilização concomitante do meio M17 visando melhorar o desempenho de isolamento. Estas linhagens serão taxonomicamente identificadas em nível de espécie e caracterizadas quanto ao potencial tecnológico para uso na cadeia produtiva do leite.

Apoio Financeiro: Embrapa (Projeto SEG 10.18.03.061.00.02.011) e CNPq, pela concessão da bolsa.

Referências

DUBERNET, S.; DESMASURES, N.; GUÉGUEN, M. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. **FEMS Microbiology Letters**, v. 214, p. 271-275, 2002.

LUERCIO, D. O. de. **Bioprospecção de Lactobacillus spp. em Queijos Minas Artesanais**: um estudo de diversidade genética e propriedades tecnológicas. 2021. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados) - Faculdade de farmácia e bioquímica, Universidade Federal de Juiz de Fora.

ORTOLANI, M. B. T. **Bactérias ácido lácticas autóctones de leite cru e queijo minas frescal**: Isolamento de culturas bacteriocinogênicas, caracterização da atividade antagonista e identificação molecular. 2009. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa.

SEMAN, S.; GROVER, S.; BATISH, V. K. Comparison of Specificity of Different Primer Pairs for The Development of Multiplex PCR Assays for Rapid Identification of Dairy Lactobacilli. **International Journal of Science e Technology**, v. 3, n. 2, p. 123-137, 2008.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TABIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R.A.R.; **Manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2010.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F. J.; LUPSKI, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based Polymerase Chain Reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v. 5, p. 25-40, 1994.