

Geração de um banco de impressões digitais de DNA (DNA fingerprint) de bactérias do ácido láctico isoladas ao longo do processo de fabricação e maturação de queijos artesanais do município de Alagoa, Minas Gerais¹

Tainá Fernandes da Silva Neder², Paula Aparecida Azevedo Almeida³, Bianca de Oliveira Hosken⁴, Edna Froeder Arcuri⁵, Nívea Maria Vicentini⁵, Maria de Fátima Ávila Pires⁵, João Batista Ribeiro^{5,6}

¹Agradecimento à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG. Parte do projeto “Artecem”, Código: 06.13.14.001.00.00, liderado por Maria de Fátima Ávila Pires

²Graduanda em Ciências Biológicas – CES, Juiz de Fora. Bolsista PIBIC FAPEMIG. E-mail: taina_fernandes10@hotmail.com

³Mestranda em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados – UFJF, Juiz de Fora, MG

⁴Graduanda em Farmácia – UFJF, Juiz de Fora, MG

⁵Pesquisador, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG

⁶Orientador. E-mail: joao-batista.ribeiro@embrapa.br

Resumo: A biodiversidade de bactérias ácido lácticas (BAL) é considerada um fator fundamental para as características e qualidade do produto final na produção de queijos artesanais. As BAL apresentam grande importância econômica na fabricação dos queijos, além de possuírem ação antagonista contra microrganismos indesejáveis, com o poder de inibição de bactérias patogênicas e deteriorantes. O principal objetivo deste estudo foi gerar um banco de impressões digitais de DNA de BAL previamente isoladas de amostras de queijos produzidos no Município de Alagoa, MG. Inicialmente foi avaliada a viabilidade e a pureza de uma coleção de 382 BAL por meio de cultivos em ágar M17 e MRS. Foi observado um total de 249 (65,2 %) BAL viáveis, sendo todas consideradas puras. Em seguida, para cada isolado viável foi gerada uma impressão digital de DNA por meio da técnica de REP-PCR direto de colônias gerando um banco de impressões digitais de DNA da população de BAL. Esse banco de imagens será utilizado para selecionar isolados não redundantes para posterior identificação por meio do sequenciamento do rDNA 16S. Além disso, poderá direcionar a escolha de microrganismos para futuros estudos com foco em metabólitos e processos de interesse tecnológico.

Palavras-chave: bactérias ácido lácticas; impressão digital de DNA; REP-PCR; queijo minas artesanal.

Generation of a bank of DNA fingerprint of lactic acid bacteria isolated during the manufacturing and maturation processes of artisanal cheeses from the municipality of Alagoa, Minas Gerais.

Abstract: The biodiversity of lactic acid bacteria (BAL) is considered a fundamental factor for the characteristics and quality of the final product in the production of artisanal cheeses. BALs have great economic importance in the manufacture of cheeses, besides having antagonistic action against undesirable microorganisms due to their ability of inhibiting pathogenic and deteriorating bacteria. The main objective of this study was to generate a bank of DNA fingerprints for BAL previously isolated from samples of cheese produced in the Municipality of Alagoa, MG. Initially, the viability and purity of a collection of 382 BAL were evaluated through cultures on M17 and MRS agar. A total of 249 (65.2%) viable BALs were observed, all of which being considered pure. Then, for each viable isolate, a DNA fingerprint was generated by the REP-PCR technique of colonies generating a bank of DNA fingerprints of the BAL population. This image bank will be used to select non-redundant isolates for further identification through 16S rDNA sequencing. In addition, it may direct the choice of microorganisms for future studies focusing on metabolites and processes of technological interest.

Keywords: lactic acid bacteria; DNA fingerprint; REP-PCR; artisanal minas cheese

Introdução

A biodiversidade de bactérias ácido lácticas (BAL) é considerada um fator fundamental para as características e qualidade do produto final na produção de queijos artesanais (MORANDI et al., 2011). As BAL têm grande importância econômica, já que de forma natural ou adicionada intencionalmente, desempenham importante papel na fermentação de grande variedade de alimentos. Suas atividades metabólicas não apenas contribuem para o desenvolvimento de características sensoriais desejáveis como também permitem conservar e ou aumentar o valor nutritivo da matéria-prima (GÓMEZ et al., 2000).

O grupo de BAL é formado por treze gêneros bacterianos: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Paralactobacillus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella*. Esses gêneros recebem a denominação de BAL devido ao principal produto de seu processo fermentativo, o ácido láctico.

Tendo em vista a importância das bactérias lácticas na produção de queijos artesanais, e também na segurança microbiológica do mesmo, os objetivos deste estudo foram avaliar a viabilidade e a pureza de uma população de BAL obtidas de queijo artesanal Alagoa, padronizar um ensaio de REP-PCR direto em

cultura de BAL, aplicar a técnica de REP-PCR na coleção de BAL supramencionada e gerar um banco de impressões digitais visando a discriminação dos isolados bacterianos.

Material e Métodos

Foram utilizadas 382 bactérias lácticas previamente isoladas por Arcuri et al., (2017) e Lange et al., (2017), de amostras lácteas (leite, soro fermento, salmoura e queijo em diferentes tempos de maturação) coletadas em 05 propriedades produtoras de queijo artesanal no Município de Alagoa, MG ao longo de 28 dias. Os isolados foram recuperados de estoques conservados em meio Litmus Milk a -20 °C.

Inicialmente, as bactérias foram cultivadas em meio ágar M17 e ou BHI, a 30 °C, com o período de incubação variando entre 24 h e 48 h. As cepas foram agrupadas considerando a propriedade de origem para posterior triagem molecular visando a discriminação de diferentes espécies e linhagens por meio da técnica de REP-PCR. Em seguida foi realizada a padronização de um ensaio de REP-PCR direto de colônias de BAL, utilizando o oligonucleotídeo 5' - GTG GTG GTG GTG GTG - 3'. As reações de amplificação foram realizadas com o kit de PCR Go Taq (Promega®) em um volume total de 25 µL, e uma colônia de células bacterianas como fonte do DNA molde. As condições de termociclagem foram desnaturação inicial a 95 °C por 15 minutos, seguida de 30 ciclos de 30 segundos para a 95 °C, 1 minuto a 40°C para o anelamento do primer, 65 °C por 8 minutos para a extensão do primer. Por fim, uma extensão final a 65 °C por 10 minutos seguida de resfriamento a 4 °C.

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8 % em tampão TBE 1X (Tris base 90 mM, ácido bórico 90 mM e EDTA 0,1 mM - pH 8,0) sendo utilizado como padrão de tamanho molecular o marcador 100 pb ladder (Biolab). Os géis foram corridos a 80V, em cuba eletroforética média para gel de 15 cm (Bio-rad). O gel foi corado com brometo de etídio (0,01%) e em seguida fotodocumentado sob luz ultravioleta (UV). Em seguida, arquivos .tif contendo as imagens dos géis foram gerados e armazenados para futuras análises *in silico*.

Resultados e Discussão

Dos 382 isolados bacterianos, identificados presuntivamente como bactérias do ácido láctico (ARCURI et al., 2017), 249 (65,2%) isolados foram consideradas viáveis apresentando crescimento nos meios de cultura utilizados após 24 ou 48 h de incubação. Todas as amostras de BAL viáveis apresentaram colônias com características morfológicas uniformes após período de incubação sendo consideradas culturas puras. Os isolados considerados inviáveis serão recuperados de tubos estoques conservados a -80 °C.

Visando à realização de triagem molecular para discriminar os isolados de diferentes gêneros, espécies ou linhagens a técnica de REP-PCR foi padronizada no Laboratório de Microbiologia do Leite e, em seguida, utilizada para gerar perfis eletroforéticos de todas as 249 amostras de BAL viáveis. A Figura 01 mostra imagem do gel contendo a impressão digital de 18 isolados bacterianos pertencentes à coleção de trabalho de BAL. Quando comparados por meio de inspeção visual e ou com auxílio do *Software Bionumerics*, muitos perfis eletroforéticos resultantes da amplificação do DNA de isolados bacterianos provenientes de uma mesma propriedade produtora de queijo se mostraram idênticos em termos de posições relativas das bandas de DNA, demonstrando uma relação de clonalidade entre os isolados de BAL presentes no queijo minas artesanal produzido no Município de Alagoa. Em algumas propriedades foram observados diversos isolados com perfis eletroforéticos com 100 % de similaridade. Este resultado, juntamente com outras informações associadas a estas bactérias permitem afirmar conclusivamente que esses isolados correspondem a amostras de microrganismos redundantes.



Figura 1. Imagem ilustrativa de um gel contendo perfis eletroforéticos (impressões digitais de DNA) de isolados de bactérias lácticas obtidas de amostras lácteas em propriedades produtoras de queijo minas artesanal no município de Alagoa, MG.

Por outro lado, foram observados subgrupos de isolados de uma mesma propriedade apresentando uma relativa diversidade genética (Figura 1). Isso comprova que os isolados são geneticamente distintos, porém não possibilita ainda a identificação da espécie biológica ou gênero a que os mesmos pertencem. Análises *in silico* vem sendo realizadas em nosso laboratório visando ao estabelecimento de uma coleção de isolados não redundantes para futuros estudos. Além disso, a triagem molecular realizada no presente estudo agrega valor aos isolados analisados devido ao fato de estabelecer a sua identidade molecular tornando-os rastreáveis. Ademais, o banco de impressões digitais de DNA de BAL permitirá inferir sobre isolados capazes de sobreviver e se desenvolver no queijo Alagoa durante a evolução do período de maturação do queijo e dessa forma direcionar a escolha de bactérias para futuros estudos com foco no desenvolvimento de linhagens ou biomoléculas para aplicação tecnológica na produção de queijos artesanais mais seguros de melhor qualidade beneficiando o produtor, o consumidor e a cadeia produtiva em geral.

Conclusões

Sessenta e cinco (n=249) por cento das BAL estocadas à -20 °C foram consideradas viáveis e todas as amostras viáveis foram consideradas puras. A técnica de REP-PCR diretamente de colônias de BAL foi padronizada e utilizado na triagem molecular de todas amostras viáveis (n=249). Foi constituído um banco de impressões digitais de DNA da população de BAL que poderá ser usado em futuros estudos para identificar isolados de BAL geneticamente distintos para a constituição de uma coleção biológica de cepas não redundantes.

Agradecimentos

À Embrapa (Projeto ARTECEM, Código 06.13.14.001.00.00).

Referências

- ARCURI, E. F. et al. **Isolamento de bactérias lácticas associadas ao queijo artesanal Alagoa produzido na Serra da Mantiqueira em Minas Gerais**. Anais do 31° Congresso Nacional de Laticínios, Juiz de Fora, 2017. 1 CD. 5 p.
- GÓMEZ, J. M. R. et al. Las bacteriocinas de las bacterias lácticas. 1. Definición, clasificación, caracterización y métodos de detección. **Alimentaria: Revista de tecnología e higiene de los alimentos**, (314) v.37, p.59-66, 2000.
- LANGE, C. C. et al. **Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella spp.* e contagem de *Staphylococcus spp.* coagulase positiva e coliformes em queijo artesanal produzido no município de Alagoa, Minas Gerais**. Anais do 31° Congresso Nacional de Laticínios, Juiz de Fora, 2017. 1 CD. 5 p. AINFO 23631.
- MORANDI, S.; BRASCA, M.; LODI, R. Technological, phenotypic and genotypic characterization of wild lactic bacteria involved in the production of Bitto Italian cheese. **Dairy Science and Technology**, v. 91, n.3, p. 341-359, 2011.