

Isolamento de bactérias ácido lácticas do queijo colonial artesanal produzido na região de Francisco Beltrão-PR

Isolation of lactic acid bacteria from artisanal colonial cheese produced in the region of Francisco Beltrão-PR

RESUMO

Roberta Martins
martins.1996@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica
Federal do Paraná, Francisco
Beltrão, Paraná, Brasil

Andréa Cátia Leal Badaró
andreabadaro@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica
Federal do Paraná, Francisco
Beltrão, Paraná, Brasil

Fabiane Picinin de Castro
Cislaghi
fabianecastro@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica
Federal do Paraná, Francisco
Beltrão, Paraná, Brasil

Ana Paula Silva de Carvalho
Seciliano Moreira
ana.seciliano@gmail.com
Universidade Tecnológica
Federal do Paraná, Francisco
Beltrão, Paraná, Brasil

Jéssica dos Santos Correia
jessicac15@live.com.pt
Universidade Tecnológica
Federal do Paraná, Francisco
Beltrão, Paraná, Brasil

Recebido: 19 ago. 2020.

Approved: 01 out. 2020.

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



As bactérias do ácido láctico (BAL) podem estar presentes na microbiota do queijo e possuem uma importante capacidade de inibir microrganismos deteriorantes e patógenos que porventura estejam fazendo parte desta microbiota. Este projeto teve como objetivo isolar e identificar as bactérias ácido lácticas presentes no queijo colonial artesanal produzido a partir de leite cru pela agricultura familiar na região de Francisco Beltrão. Para isso, as bactérias foram coletadas dos queijos fornecidos pelos agricultores em duas estações diferentes do ano, verão e inverno, e posteriormente foram submetidas a testes de identificação bioquímica como coloração de Gram, teste de catalase, motilidade, capacidade de multiplicação em pH 9,6, capacidade de multiplicação em 6,5% de NaOH e capacidade de multiplicação em diferentes temperaturas (10°C e 45°C). A presença de bactérias do ácido láctico em alimentos ajuda a controlar a presença de microrganismos indesejáveis, contribuindo para a segurança e inocuidade.

PALAVRAS-CHAVE: Maturação de queijos. Leite cru. Microbiota. Segurança dos alimentos.

ABSTRACT

Lactic acid bacteria (BAL) can be present in the cheese microbiota and have an important ability to inhibit deteriorating microorganisms and pathogens that may be part of this microbiota. This project aimed to isolate and identify the lactic acid bacteria present in artisanal colonial cheese produced from raw milk by family farming in the region of Francisco Beltrão. For this, the bacteria were collected from the cheeses provided by the farmers in two different seasons of the year, summer and winter, and subsequently were subjected to biochemical identification tests such as Gram stain, catalase test, motility, multiplication capacity at pH 9.6, multiplication capacity in 6.5% NaOH and multiplication capacity at different temperatures (10 °C and 45 °C). The presence of lactic acid bacteria in food helps to control the presence of undesirable microorganisms, contributing to safety and safety.

KEYWORDS: Cheese maturation. Raw milk. Microbiota. Food safety.



INTRODUÇÃO

O emprego de leite cru sem adição de fermentos lácteos, na maioria dos processos de produção artesanal de queijos, fornece ao produto uma diversificada população microbiana indesejada, proveniente do próprio leite e de condições higiênico-sanitárias às quais é submetido. Esse aspecto se caracteriza como um perigo aos consumidores, já que além de microrganismos deteriorantes, o produto pode também servir como veículo de microrganismos patogênicos (HERMANS et al., 2013).

Determinadas bactérias do ácido láctico (BAL) utilizam, preferencialmente, a lactose como fonte de carbono, tendo como produtos de seu metabolismo substâncias antimicrobianas como: ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, diacetil, acetaldeído e bacteriocinas, que atuam favoravelmente no produto alimentício ao qual foram adicionados, fazendo parte dos microrganismos capazes de exercer efeitos benéficos ao hospedeiro. São denominados microrganismos probióticos, apresentando um amplo espectro de ação contra microrganismos patogênicos e deteriorantes (LIMA et al., 2009). Após alguns estudos constatou-se que entre esses microrganismos patogênicos estão: *Staphylococcus* spp., *Listeria* spp., *Salmonella* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. e bactérias do grupo coliforme (VAUGHAN et al., 1994; BREASHERS e DURRE, 1999; URAZ et al., 2001; ALEXANDRE et al., 2002; CARIDI, 2003; GUEDES NETO, 2005).

As BAL correspondem de 20-30% do total de bactérias presentes no leite cru, cujas espécies bacterianas encontradas dependem da estação do ano, das condições de produção, da origem do animal e do tipo de manejo. Esta diversidade bacteriana está diretamente relacionada às diferenças sensoriais encontradas nos produtos lácteos artesanais (CABRAL et al., 2016; DELAVENNE et al., 2012).

A identificação de BALs naturalmente presentes no leite cru e derivados com atividade antimicrobiana é de extrema importância para se elucidar as interações microbianas que ocorrem nestes alimentos e explicar a baixa ocorrência de microrganismos patogênicos.

O objetivo desta pesquisa foi isolar e identificar bioquimicamente cepas de bactérias lácticas presentes em amostras de queijos coloniais artesanais que estavam sendo avaliados para definição das melhores condições de maturação (refrigerado e ambiente) nos períodos de inverno e verão.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de queijos foram coletadas durante o experimento de avaliação do período de maturação dos queijos coloniais, realizado em duas épocas do ano – uma no inverno de 2018 e no verão de 2019. Para isolamento das bactérias lácticas, retirou-se uma alíquota de 25g do queijo, que foi diluída e homogeneizada em 225mL de água peptonada estéril 0,1%, seguido por diluição decimal. Posteriormente, os microrganismos foram inoculados em triplicata com alíquotas de 1mL de cada diluição, por profundidade e com sobrecamada em placas

contendo ágar Man, Rogosa e Sharpe (MRS). As placas foram incubadas em BOD com atmosfera controlada a uma temperatura de 32°C por 48 horas. Após esse período foi realizado a contagem das colônias e o resultado calculado através do número de colônias da placa multiplicado pelo inverso da diluição.

Este mesmo método foi aplicado a todos os queijos. Após a obtenção de colônias isoladas, iniciou-se os testes bioquímicos em duplicata. Os testes bioquímicos foram: coloração de Gram, catalase, motilidade, capacidade de multiplicação em 6,5% de NaCl, capacidade de multiplicação em pH 9,6 e capacidade de multiplicação a temperaturas de 10°C e 45°C.

Para o teste de catalase, escolheu-se de forma aleatória colônias presentes nas placas onde foram inoculadas contendo ágar MRS e com auxílio de uma alça de platina, foram depositadas em uma lâmina de vidro, em seguida com um conta-gotas gotejou-se peróxido de hidrogênio (H₂O₂ 3%), para interpretação considerou-se catalase positivo a observação da produção de bolhas.

Para o teste de motilidade, utilizou-se tubos contendo ágar SIM (Sulfato, Indol, Motilidade) que foi inoculado com as cepas isoladas de BAL'S, e em seguida incubados em BOD com atmosfera controlada a 32°C por 48 horas. O resultado era considerado pela opacidade disseminada no ágar a partir da picada de inoculação da amostra.

No teste de capacidade de multiplicação à 6,5% de NaCl as colônias isoladas foram depositadas em tubos de ensaio contendo caldo BHI suplementado, em seguida foram incubados em BOD com atmosfera controlada à 32°C por 48 horas. A interpretação dos resultados foi feita mediante a observação de turbidez através das leituras de absorvância com o uso de um espectrofotômetro à 625nm de comprimento de onda.

Para o teste de capacidade de multiplicação em pH 9,6, foi utilizado NaOH 1 mol para alcalinizar o meio BHI, em seguida, as colônias isoladas foram depositadas em tubos de ensaio e inoculadas em BOD com atmosfera controlada por 48 horas à 32°C. Como no teste anterior, os resultados foram obtidos através de observação da turbidez através das leituras de absorvância com o uso de um espectrofotômetro à 625nm de comprimento de onda.

Por fim, os testes de capacidade de multiplicação em diferentes temperaturas foram realizados inoculando as colônias em caldo BHI e em seguida incubadas em BOD com atmosfera controlada e temperaturas de 10°C e 45°C. Os resultados foram interpretados através de observação de turbidez através das leituras de absorvância com o uso de um espectrofotômetro à 625nm de comprimento de onda.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período de análises com as amostras provenientes da avaliação do período de maturação dos queijos (inverno e verão), foram isoladas um total de 143 cepas de bactérias ácido lácticas provenientes do plaqueamento inicial das amostras de queijos coloniais produzidos a partir de leite cru (Tabelas 1 e 2).

Desse total, foram realizados testes bioquímicos em 64 amostras, nas quais 52 foram confirmadas como características de resultados bioquímicos típicos de serem BALs.

Tabela 1 – Contagens de Bactérias Ácido Láticas (BAL's) de amostras de queijos maturados no verão.

AMOSTRA	SEMANAS DE MATURAÇÃO (UFC.g ⁻¹)								
	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	8ª	10ª	13ª	17ª
AR	7,5x10 ⁷	4,1x10 ⁸	1,4x10 ⁹	5,3x10 ⁸	5,5x10 ⁸	9,2x10 ⁷	1,1x10 ⁷	7,6x10 ⁷	1,0x10 ⁷
BR	1,4x10 ⁸	1,8x10 ⁸	4,5x10 ⁸	1,2x10 ⁸	7,9x10 ⁸	1,4x10 ⁹	2,1x10 ⁸	4,4x10 ⁸	1,1x10 ⁸
CR	1,6x10 ⁷	1,4x10 ⁸	2,8x10 ⁷	1,0x10 ⁸	7,0x10 ⁷	8,8x10 ⁷	5,3x10 ⁷	6,6x10 ⁷	2,7x10 ⁶
AE	6,1x10 ⁷	1,6x10 ⁸	1,7x10 ⁷	1,6x10 ⁸	1,2x10 ⁸	8,3x10 ⁸	7,4x10 ⁷	6,1x10 ⁷	9,5x10 ⁶
BE	1,0x10 ⁸	5,9x10 ⁸	2,4x10 ⁸	2,7x10 ⁷	2,5x10 ⁷	3,4x10 ⁷	8,9x10 ⁶	4,1x10 ⁵	5,4x10 ⁶
CE	7,6x10 ⁷	3,5x10 ⁸	1,2x10 ⁹	2,8x10 ⁸	1,8x10 ⁷	1,4x10 ⁸	1,2x10 ⁸	1,1x10 ⁹	3,3x10 ⁶

AR, BR, BR: Maturação sob refrigeração; AE, BE, CE: Maturação em temperatura ambiente
Fonte: Autoria própria (2020).

Tabela 2 – Contagens de Bactérias Ácido Láticas (BAL's) de amostras de queijos maturados no inverno.

AMOSTRA	SEMANAS DE MATURAÇÃO (UFC.g ⁻¹)							
	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	7ª	8ª
AX	3,2x10 ⁵	1,3x10 ⁷	1,2x10 ⁸	1,1x10 ⁸	7,4x10 ⁷	3,9x10 ⁷	8,0x10 ⁷	5,6x10 ⁷
AY	3,0x10 ⁵	1,8x10 ⁷	1,4x10 ⁷	9,8x10 ⁷	4,1x10 ⁷	9,1x10 ⁷	8,3x10 ⁷	2,3x10 ⁸
BX	3,6x10 ⁸	8,3x10 ⁸	1,4x10 ⁸	4,5x10 ⁸	2,7x10 ⁸	4,1x10 ⁸	1,4x10 ⁷	4,8x10 ⁸
BY	7,1x10 ⁸	9,1x10 ⁸	3,4x10 ⁸	1,5x10 ⁸	5,2x10 ⁸	6,5x10 ⁸	4,5x10 ⁸	2,8x10 ⁸
CX	2,0x10 ⁷	2,5x10 ⁷	3,0x10 ⁷	4,6x10 ⁷	1,0x10 ⁷	2,4x10 ⁷	3,1x10 ⁶	8,0x10 ⁵
CY	1,8x10 ⁷	1,4x10 ⁷	3,7x10 ⁷	1,0x10 ⁸	4,6x10 ⁷	3,0x10 ⁷	9,7x10 ⁵	9,6x10 ⁵

X e Y: duplicata de cada amostra.
Fonte: Autoria própria (2020).

Observando os resultados das contagens obtidas na maturação no período de verão (Tabela 1), pode-se observar que a amostra C apresentou contagem inicial foi de $1,5 \times 10^7$ UFC.g⁻¹ e ao final do período de maturação verificou-se que houve uma redução das contagens das BALs, sendo que a amostra refrigerada CR estava com $2,7 \times 10^6$ UFC.g⁻¹ e a sob temperatura ambiente CE com $3,3 \times 10^6$ UFC.g⁻¹. Isso pode ter ocorrido em função da diminuição da umidade dentro do queijo o que proporciona a diminuição da atividade de água que é um dos fatores intrínsecos importantes para a multiplicação e sobrevivência dos microrganismos.

Já as amostras da maturação no período de inverno (Tabela 2) que foram mantidas somente à temperatura ambiente, foi possível verificar que o comportamento das amostras foi muito distinto. A amostra A teve contagem inicial de AX: $3,2 \times 10^5$ UFC.g⁻¹ e AY: $3,0 \times 10^5$ UFC.g⁻¹ e no decorrer do período de maturação houve um aumento na contagem, chegando na última semana do experimento com uma contagem de $5,6 \times 10^7$ UFC.g⁻¹ e $2,3 \times 10^8$ UFC.g⁻¹ para AX e AY respectivamente. A amostra B teve inicialmente a contagem de $3,6 \times 10^8$ UFC.g⁻¹ para BX e $7,1 \times 10^8$ UFC.g⁻¹ para BY e ao longo das semanas ficou em 10^8 UFC.g⁻¹, já

a amostra C teve contagem inicial de 2×10^7 para CX e $1,8 \times 10^7$ para CY terminando no final da maturação em 10^5 UFC.g⁻¹.

A importância das BAL's no queijo vai bem além da questão sensorial, também é de extrema importância microbiológica, pois quando estão em altas contagens, elas competem com os demais microrganismos presentes no queijo, além de atuarem na produção de agentes inibidores como as bacteriocinas e o próprio ácido láctico, que altera a acidez e o pH, resultando na inibição e na diminuição do desenvolvimento de microrganismos indesejáveis.

Vale destacar que com o início da pandemia mundial causada pelo Novo Coronavírus (COVID-19) todas as análises foram suspensas a partir de março de 2020, e com isso as amostras ainda não avaliadas, quanto sua caracterização bioquímica, foram armazenadas por criopreservação em caldo BHI com 20% de Glicerol, e estão sendo mantidas congeladas a -18°C . Tão logo retomem as atividades laboratoriais na instituição, estas amostras serão também caracterizadas.

CONCLUSÃO

A presença de bactérias do ácido láctico em produtos alimentícios, sobretudo os derivados lácteos, pressupõe a produção de ácido láctico através dos seus processos fermentativos, resultando na diminuição do pH e no aumento acidez titulável, o que pode contribuir na redução do desenvolvimento e sobrevivência de bactérias indesejáveis, o que é importante para a segurança e inocuidade dos alimentos.

Pode-se observar que as amostras de queijos fabricados e maturados no inverno tiveram uma qualidade microbiológica superior aos maturados no verão, porém independente de qual estação, os queijos coloniais artesanais devem ser mais estudados e pesquisas devem contribuir para a definição do melhor tempo de maturação, de forma a incorporar características sensoriais desejáveis ao produto e para sejam comercializados de forma inócua e segura ao consumo.

AGRADECIMENTOS

As autoras agradecem o financiamento recebido do CNPq, da Fundação Araucária, da Cooperativa de Crédito Rural com Interação Solidária – Cresol – de Francisco Beltrão, da PROPPG e PROREC da Universidade Tecnológica Federal do Paraná UTFPR, que contribuíram com apoio financeiro e laboratorial para o desenvolvimento científico dessa pesquisa.

REFERÊNCIAS

ALEXANDRE, D.P.; SILVA, M.R.; SOUZA, M.R. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo-de-minas artesanal do Serro (MG) frente a microrganismos indicadores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.54, p.424-428, 2002.

BRASHEARS, M.M.; DURRE, W.A. Antagonistic action of *Lactobacillus lactis* toward *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 during growth and refrigerated storage. **Journal Food Protections**, v.62, p.1336-1340, 1999.

CABRAL, M.L.B.; LIMA, M.S.F.; ARAÚJO, G.A.; COSTA, E.F.; PORTO, A.L.F.; CAVALCANTI, M.T.H. Artisan cheese: a potential source of wild lactic acid bacteria to obtain new starter cultures. **Food Science**, v.3, n.4, p.207-215, 2016.

CARIDI, A. Ripening and seasonal changes in microbial groups and in physicochemical properties of the ewes' cheese Pecorino del Poro. **International Dairy Journal**, v.13, p.191-200, 2003.

DELAVENTE, E.; MOUNIER, J.; DÉNIEL, F.; BARBIER, G.; LE BLAY, G. Biodiversity of antifungal lactic acid bacteria isolated from raw milk samples 51 from cow, ewe and goat over one-year period. **International Journal of Food Microbiology**, n. 155 p. 185–190, 2012.

GUEDES NETO, L.G. Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-láticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a microrganismos indicadores **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.57, supl.2, set., 2005.

HERMANS, G. et al. Isolamento e identificação de bactérias lácticas supostamente bacteriocinogênicas em leite e queijo. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, nº 11, p. 497, abril, 2013.

LIMA, C.D.L.C.; LIMA, L.A.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; FERREIRA, E.G.; ROSA, C.A. Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.61, n.1, p.266-272, 2009. Disponível em:
<https://www.scielo.br/pdf/abmvz/v61n1/v61n1a37.pdf>. Acesso em: 14 ago. 2020

URAZ, G.; SIMSEK, H.; MARAS, Y. The inhibitory effects of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus helveticus* on *Bacillus* species isolated from raw milk in various salt concentrations. **International Journal Dairy Technology**, v.54, p.146-150, 2001.

VAUGHAN, E.E.; CAPLICE, E.; LOONEY, R. Isolation from food sources, of lactic acid bacteria that produced antimicrobials. **Journal Applied Bacteriology**, v.76, p.118-123, 1994.