



Bacteriocina contra bactérias contaminantes de alimentos

Bacteriocin against foodborne pathogens

Gabriel Lucas Giroti*, Luciana Furlaneto-Maia†

RESUMO

A conservação dos alimentos é uma demanda do consumidor e a crescente busca por alternativas mais naturais tem sido um desafio para a indústria alimentícia. Neste contexto, as bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos com ação comprovada como conservantes microbiológicos naturais. A busca por novos isolados produtores de bacteriocina tem sido foco dos processos de bioprospecção. Alimentos fermentados, como exemplo rejuvelac, tem se mostrado potencial para isolamento de bactérias de interesse tecnológico. O objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar bacteriocinas provenientes de Rejuvelac e avaliar a atividade bacteriocinogênica bactérias gram positivas e negativas. Foram isolados bactérias ácido lácticas de rejuvelac de quinoa e gergelim. O teste de antagonismo foi realizado pela técnica do confronto contra as bactérias *Escherichia coli* (sorotipos ETEC e EHEC), *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. Como resultados, obtivemos que dois isolados de cada rejuvelac inibiram o crescimento de uma ou mais bactérias teste. O sobrenadante livre de células contendo bacteriocina foi testado pela técnica de poço difusão contra a bactéria *L. monocytogenes*. Os resultados não foram conclusivos, necessitando de aprimoramento da técnica. Isolados bacterianos provenientes de alimentos fermentados tem se mostrado promissores como inibidores de patógenos alimentares.

Palavras-chave: rejuvelac, alimentos fermentados, BAL, patógenos alimentar

ABSTRACT

Food conservation is a consumer demand and the growing search for more natural alternatives has been a challenge for the food industry. In this context, bacteriocins are antimicrobial peptides with proven action as natural microbiological preservatives. The search for new bacteriocin-producing isolates has been the focus of bioprospecting processes. Fermented foods, such as rejuvelac, have shown potential for isolating bacteria of technological interest. The objective of this work was to isolate and characterize bacteriocins from rejuvelac and evaluate the bacteriocinogenic activity of gram positive and negative bacteria. Lactic acid bacteria from quinoa and sesame rejuvelac were isolated. The antagonism test was performed using the technique of confrontation against the bacteria *Escherichia coli* (serotypes ETEC and EHEC), *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. As a result, we found that two isolates of each rejuvelac inhibited the growth of one or more test bacteria. The cell-free supernatant containing bacteriocin was tested by well diffusion technique against *L. monocytogenes* bacteria. The results were not conclusive, needing to improve the technique. Bacterial isolates from fermented foods have shown promise as inhibitors of food pathogens.

Keywords: rejuvelac, fermented foods, LAB, food pathogens

1 INTRODUÇÃO

Cada vez mais o consumidor vem se tornando mais atento à lista de ingredientes de alimentos em busca de aditivos químicos e substâncias prejudiciais à saúde. Torna-se então um chamado unânime à indústria da área para buscar alternativas naturais e mais saudáveis do que as tradicionais, sem perder as características de segurança e qualidade do produto (KAVISOGLU e ÇOSKUN, 2016).

Um número significativo de microrganismos Gram positivos e Gram negativos produzem compostos antimicrobianos, porém as bactérias do ácido láctico (BAL) são especialmente atraentes para uso no biocontrole de alimentos porque estão normalmente associadas à fermentação de alimentos e têm um longo histórico de segurança como bactérias de "qualidade alimentar" (CLEVELAND 2001).

BAL podem exercer um efeito inibitório sobre outros microrganismos como resultado da competição por nutrientes e / ou produção de compostos antagonistas, como ácido láctico, diacetil, peróxido de hidrogênio e polipeptídeos antimicrobianos chamados bacteriocinas (SCHUELER *et al* 2021).

A ação primária da bacteriocina é a membrana plasmática das bactérias alvo, agindo a permeabilidade na membrana por meio da formação de poros, o que promove a dissipação da força próton motora (PMF) e inibição do transporte de aminoácidos. A PMF está envolvida em diversos processos na membrana citoplasmática, tais como o acúmulo de íons e metabólitos, e a síntese de ATP (MOKOENA, 2017).

O interesse por bacteriocinas vêm aumentando devido a sua alta atividade inibitória, serem seguras a humanos, estabilidade e diversos modos de ações, além das bactérias que produzem essas substâncias podem ser isoladas de plantas, animais, alimentos, água e solo (SCHUELER *et al* 2021).

Nossa intenção foi isolar LAB bacteriocinogênico que possa ter atividade inibitória contra patógenos Gram-positivos e Gram negativos que possam ser aplicáveis como adjuvantes de segurança alimentar para uso como conservantes de alimentos.

As BALs podem ser isoladas de muitas fontes, pois estão amplamente presentes no meio ambiente e facilmente encontradas em alimentos processados e fermentados. Também estão presentes no trato intestinal de humanos e animais e podem, portanto, ser encontrados nas fezes, que é geralmente considerado um veículo pelo qual são distribuídos em plantações e vegetais cultivados no campo (HENNING *et al.*, 2015).

Em vista disso, o objetivo deste trabalho foi isolar bactérias com potencial bacteriocinogênico de rejuvenescimento feito de grãos de gergelim e de quinoa. As bactérias isoladas foram testadas contra *Salmonella*, *L. monocytogenes*, ETEC, EHEC e *S. aureus*.

2 MÉTODO

O rejuvenescimento produzido neste trabalho foi feito com grãos de gergelim e quinoa. Para tanto, uma porção dos grãos foram lavados em água corrente (com a ajuda de uma peneira) e, então, foram transferidos para um pote de vidro bem higienizado e seco e foi acrescentada água filtrada até cobrir completamente os grãos, permanecendo por 12 horas. Os grãos foram escorridos e lavados novamente na água corrente. Foi transferido para um recipiente limpo e cobertos por um papel toalha, mantidos em local arejado. Após 8 a 12 horas, os grãos iniciaram a germinação.

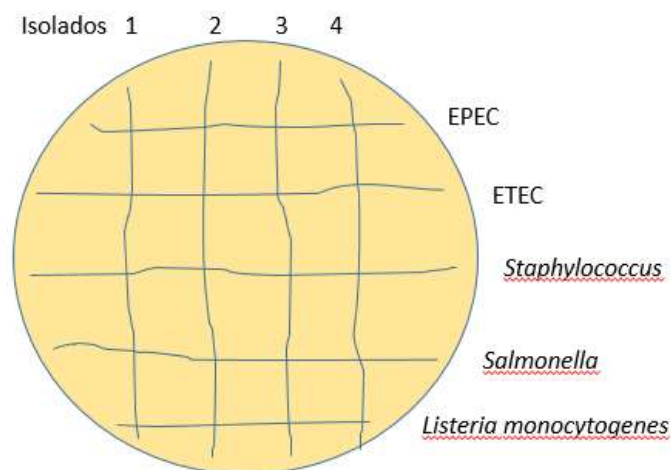
Após o processo de germinação, os grãos foram transferidos para potes limpos e preenchidos com água filtrada; o pote foi tampado com gaze e deixado em local bem ventilado e longe da luz. Após 48

horas, os grãos foram separados do líquido (Rejuvelac) e este foi encaminhado ao laboratório para início das análises microbiológicas.

Para o isolamento de BAL, procedeu-se diluição seriada do fermentado (Rejuvelac) seguido de semeadura em meio ágar ManRogosa Shape (MRS) e M17. As placas foram incubadas a 37°C/24 horas. Cinco colônias de cada tratamento foi selecionada para o teste de antagonismo.

A técnica utilizada foi o de Ensaio Confronto (Figura 1). Para tanto, em placas contendo MRS, foram semeadas em estria reta as bactérias teste. As placas foram incubadas a 37°C/24 hs. Após este período, as células foram submetidas à luz UV por 15 minutos. Uma sobrecamada de meio agar foi depositada, e as bactérias isoladas do Rejuvelac foram semeadas na perpendicular. As placas foram incubadas a 37°C/24 horas.

Figura 1 – Esquema do inóculo na técnica de Ensaio Confronto.



Os isolados que apresentaram efeito antagônico contra as bactérias teste, foram testados quanto a produção de bacteriocinas. Para tanto, foi obtido o sobrenadante livre de células (cfs), seguindo protocolo descrito por Furlaneto-Maia et al (2020).

Os isolados selecionados foram crescidos em meio caldo mrs e incubados a 37 °C sob agitação de 150 rpm por 18 h. O cultivo foi centrifugado a 10.000 rpm por 15 minutos. o pH do sobrenadante foi ajustado para 6,5 com hidróxido de sódio 1 N, para inibir a ação do ácido láctico.

Para o teste de ensaio antagônico da bacteriocina, 20 ml de mh soft ágar foi inoculado com a bactéria indicadora *L. monocytogenes* na concentração final correspondente à escala 0,5 de mcfarland ($1,5 \times 10^6$ células/ml). Este inóculo foi transferido para uma placa de petri, e após a solidificação foram feitos 3 poços de aproximadamente 5mm de diâmetro. Em cada poço, foi adicionado 30µl do cfs neutralizado. As placas foram incubadas a 37°C/24 horas

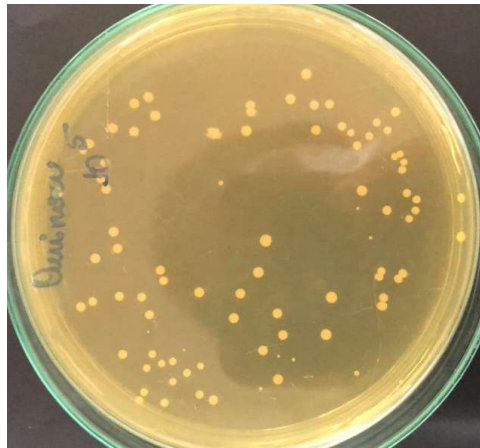
3 RESULTADOS

Foram isolados BAL provenientes de ambos rejuvelac (quinoa e gergelim) (figura 2). Foram selecionadas 5 colônias de cada fermentado, sendo denominadas de RQ1, RQ2, RQ3, RQ4 e RQ5, referentes à rejuvelac de quinoa; e RG1, RG2, RG3, RG4 e RG5, provenientes de rejuvelac de gergelim.

Nos testes de antagonismo, pela técnica de ensaio confronto, obtivemos resultados positivos para os isolados RQ2, RQ3, e RG2, RG3, ou seja, estes isolados inibiram pelo menos uma das bactérias teste. A figura 3 mostra a ausência de crescimento das bactérias testes próximo ao crescimento dos isolados

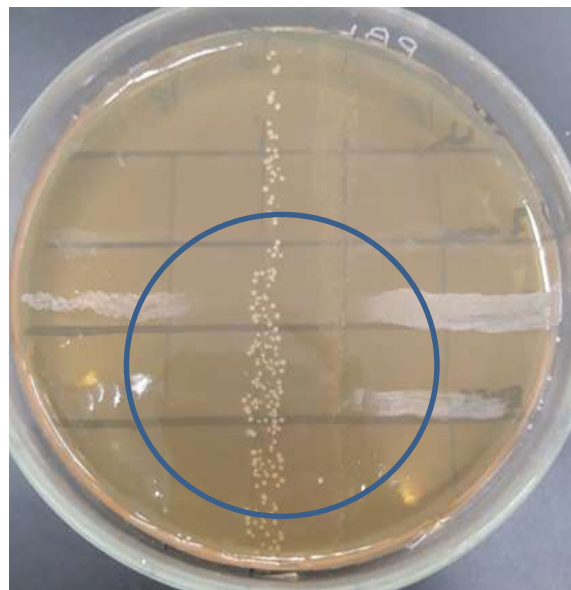
bacteriogenicos. Isso indica que estes isolados produziram alguma substancia que inibiu das bactérias patogênicas.

Figura 2 - Colônias de bacterias ácido lácticas provenientes de rejuvelac.



Fonte: Aatoria própria 2021

Figura 3 – Teste de antagonismo dos isolados de BAL contra as bacterias teste. Círculo mostra ausência de crescimento da bactéria teste.



Fonte: Aatoria própria 2021

Posteriormente, foi realizado o teste de obtenção do CFS para verificar a presença de peptídeos antimicrobianos. Embora seja um teste já padronizado pelo nosso grupo de pesquisa, os resultados obtidos neste trabalho não mostraram-se satisfatórios. O teste anterior apresentou bons resultados, porém os isolados RQ2, RQ3, e RG2, RG3 não inibiram o crescimento de *L. monocytogenes*. Esperava-se a formação de um halo de inibição ao redor do poço formado no ágar.

Para alguns isolados teste, observamos um halo não muito nítido ao redor do poço, requerendo assim novos testes para confirmar os resultados encontrados neste experimento. Devido às restrições de isolamento

imposta pela Covid-19, não conseguimos finalizar esses dados; contudo, os isolados estão armazenados em freezer para serem testados posteriormente.

4 CONCLUSÃO

Os ensaios realizados nesse trabalho confirmaram o isolamento de bactérias provenientes de rejuvelac, e apresentaram potencial inibição de bactérias patogênicas veiculadas por alimentos. O CFS contendo a bacteriocina não apresentou inibição dos microrganismos testados, necessitando de mais estudos e padronização da metodologia.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo. À UTFPR pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

Cleveland, F.; Montville, T.J.; Nes, I.F.; Chikindas, M.L. Bacteriocins: Safe, Natural. Antimicrobials for Food Preservation. **Int. J. Food Microbiol**, n. 71, p. 1–20, 2001.

Furlaneto-Maia, L. et al. Antimicrobial activity of enterocins against *Listeria sp.* and other food spoilage bacteria. **Biotechnology Letters**, n. 42, p. 797–806, 2020.

Henning C. et al. Isolation and Taxonomic Identity of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria from Retail Foods and Animal Sources. **Microorganisms**. n. 3, p. 80–93, Mar 2015.

Kavisoglu, S. e Çoşkun, F. Determination Of The Level Of Knowledge Of Consumers About Food Additives. *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, n. 10, p. 53-56, 2016.

Mokoena MP. Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review. **Molecules**, n. 26, p. 22-28, 2017

Schueler, Janaina; et al. Milhocina como fonte proteica para produção de bacteriocina por *Enterococcus*, **Research, Society and Development**, v. 10, e1110212206, 2021.