

FORMAÇÃO DE UMA BACTERIOTECA DE LINHAGENS DE BACTÉRIAS LÁTICAS ISOLADAS DE AMOSTRAS DE LEITE ORDENHADO DE CABRAS CRIADAS NA REGIÃO DO SEMI-ÁRIDO BAIANO

Danielza Souza da Silva de JESUS¹; Elinalva Maciel PAULO²; Isabella Santos ARAUJO³; Mahysa FERREIRA⁴

1. Bolsista PROBIC/UEFS Graduanda do curso de Engenharia de Alimentos –Universidade estadual de Feira de Santana, e-mail: danielza_jesus@hotmail.com
2. Orientador, Docente do Departamento de Ciências Biológicas-Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: elinalvamaciel@yahoo.com.br
3. Estudante de Doutorado em Biotecnologia – Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: araujo_isabella@yahoo.com.br
4. Graduanda do curso de Ciências Biológicas – Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: mahysaferreiracosta@yahoo.com.br

PALAVRAS-CHAVE: Bactérias láticas, isolamento bacteriano, semi-árido

INTRODUÇÃO

O leite de cabra é um dos alimentos mais complexos e sua importância está baseada no seu alto valor nutritivo (FONSECA et al., 2006), constituindo também uma importante fonte de bactérias ácidos láticas. As bactérias láticas (BAL) segundo o Manual Bergey's que trata da sistemática bacteriana (HOLT et al., 1989), são caracterizadas como sendo bactérias Gram-positivas, não esporuladas, catalase negativa, desprovidas de citocromos, crescimento em condições de aerobiose, microaerofilia ou anaerobiose facultativa, com temperatura variando entre 35°C a 40°C.

A microbiota predominante no leite cru geralmente inclui espécies de bactérias do ácido láctico e leveduras (LAFARGE et al, 2004).Atualmente, tem surgido uma tendência para selecionar linhagens selvagens de produtos tradicionais, a fim de que elas sejam usadas como culturas "starters" em processos de fermentação. As cepas isoladas a partir da fermentação tradicional e de ambientes considerados extremófilos são bem adaptadas para o crescimento no substrato destes ambientes, garantindo assim, uma cultura "starter" bem selecionada.

O objetivo do presente trabalho foi isolar bactérias láticas do leite de cabra proveniente da região do semi-árido baiano para formação de uma bacterioteca, visando utilizá-las em trabalhos futuros.

MATERIAL E MÉTODO

Amostras

As amostras de leite de cabra foram coletadas assepticamente durante a ordenha de animais criados em uma propriedade situada em Feira de Santana, BA e conduzidas ao laboratório de Microbiologia Aplicada a Saúde Pública, para o processamento imediato das amostras.

Isolamento (PAULO, 2010)

Foram preparadas diluições sucessivas decimais de 10^{-1} até 10^{-7} em solução tampão fosfato, pH 7,2. Todas as amostras diluídas foram semeadas em triplicatas pelo método de esgotamento de inóculo no meio Ágar MRS. Cada placa foi incubada a 35° por 72h. A incubação foi realizada em condições de microaerofilia utilizando uma jarra de anaerobiose. Após o tempo de incubação, foram retiradas 3 colônias, bem isoladas, de cada placa e semeadas em 2 mL do caldo DE MAN, ROGOSA e SHARPE - MRS (1960), incubadas na mesma temperatura de isolamento e purificadas no meio Ágar- MRS, pelo método de semeadura em estria composta com esgotamento de inóculo.

Testes preliminares para bactérias lácticas (AXELSSON, 1993)

Após isolamento foram realizados testes de catalase e coloração de Gram.

Caracterização morfo-fisiológica (CHAVES, 1999)

Para a caracterização dos isolados de bactérias lácticas foram realizados os seguintes testes: produção de gás a partir da glicose; Lactofermentação a 15° C, 35° C e 45° C; tolerância bacteriana ao cloreto de sódio em diferentes concentrações (4% 6% e 8%).

Preservação das linhagens

As linhagens de bactérias lácticas foram conservadas pelo método do congelamento (ultra-freezer - 80° C).

RESULTADO

Foram isoladas 15 colônias do leite de cabra (tabela 1).

Tabela 1. Morfologia e teste de lactofermentação em diferentes temperaturas.

ISOLADOS	MORFOLOGIA	LACTOFERMENTAÇÃO		
		15 °C	35°C	45°C
LCMH1	Cocos	-	+	+
LCMH2	Cocos	+	+	-
LCMH3	Cocos	+	+	-
LCMH4	Cocos	+	+	-
LCMH5	Cocos	+	+	-
LCMH6	Cocos	+	+	-
LCMH7	Cocos	+	+	-
LCMH8	Cocos	-	+	-
LCMH9	Cocos	-	+	-
LCMH10	Cocos	+	+	-
LCMH12	Cocos	-	+	-
LCMH13	Bacilos	+	+	-
LCMH14	Bacilos	+	+	-
LCMH15	Bacilos	+	+	-
LCMH18	Bacilos	+	+	-

No teste de produção de gás, 100% destes isolados não produziram gás (tabela 2), sendo, portanto consideradas como homofermentativas, diferentemente das heterofermentativas que produzem gás quando metabolizam a glicose.

Tabela 2. Características fisiológicas dos isolados de BAL isoladas do leite de cabra.

ISOLADOS	PRODUÇÃO DE GÁS	HALOTOLERÂNCIA		
		4%	6%	8%
LCMH1	-	++	+	+
LCMH2	-	++	+	+
LCMH3	-	++	++	+
LCMH4	-	+	++	++
LCMH5	-	+	+	+
LCMH6	-	+	+	+
LCMH7	-	+	+	+
LCMH8	-	+	+	+
LCMH9	-	+	+	+
LCMH10	-	++	++	+
LCMH12	-	++	+	+
LCMH13	-	+++	+++	++
LCMH14	-	+++	+++	+++
LCMH15	-	+++	+++	+++
LCMH18	-	+++	+++	++

+ Pouco crescimento, ++ Médio crescimento, +++ Grande crescimento, - Resultados negativos

Os isolados foram inoculados no meio Nitrato acrescido de meio MRS e incubados a 35° C. Após a adição de alfa-naftol e ácido sufânico, observou-se resultado negativo para todo, característica esta, típica das bactérias láticas.

A produção da amônia, a partir da arginina, foi observada, inoculando culturas ativas no caldo descarboxilado FALKOW. Incubando por 48 horas a 37°C, obtendo resultado positivo para as amostras LCMH 1, LCMH 2 , LCMH 4 ,LCMH 5 ,LCMH 6 , LCMH 7 , LCMH 8 , LCMH 9 , LCMH 10, observado pela permanência da cor violeta e negativa para as amostras LCMH 3, LCMH 12, LCMH 13, LCMH 14, LCMH 15, LCMH 18, observada pela coloração amarela. Para o teste da fermentação de carboidratos preparou-se uma suspensão dos isolados, inoculando 5 µL em uma placa de microdiluição, adicionada de 100 µL de caldo MRS modificado e 10 µL do açúcar teste. Incubados a 35°C durante 48h.

Tabela 3. Teste de fermentação de açúcares

Açúcar	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	13	14	15	18
A	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-
E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
G	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

LEGENDA: A=MANITOL, B = ARGININA, C = TREALOSE, D = ARABINOSE, E = LACTOSE, F = SORBITOL, G = ESCULINA, H = AMIDO

De acordo com os testes fenotípicos realizados foram encontrados o gênero *Leuconostoc* (LCMH 1, LCMH 2 , LCMH 4 ,LCMH 5 ,LCMH 6 , LCMH 7 , LCMH 8 , LCMH 9 , LCMH 10, LCMH 3, LCMH 12), e o gênero *Lactobacillus* (LCMH 13, LCMH 14, LCMH 15, LCMH 18), porém é necessário a realização do teste genotípico para uma identificação mais segura.

CONCLUSÃO

As 15 cepas isoladas de bactérias lácticas do leite de cabra, foram classificadas como sendo do gênero *Leuconostoc* e *Lactobacillus*. Estas cepas possuem características favoráveis ao seu uso como Culturas “starter”. A elevada resistência a diferentes concentrações de NaCl, e o crescimento a diferentes temperaturas (15°C, 35°C, 45°C) é indicativo de capacidade de sobrevivência a estas condições e da sua facilidade de adaptação ao meio e possibilidade de serem usadas em processos fermentativos de alimentos que impliquem variações térmicas.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S.; VONWRIGHT, A. Lactic acid bacteria . New York: Marcel Dekker, , p.1 -63, 1993.
- CHAVES, A. H. et al. Isolamento de *Lactobacillus acidophilus* a Partir de Fezes de Bezerros. Rev. bras. zootec., v.28,n.5, p.1086-1092, 1999.
- LAFARGE, V. et al. Raw Cow Milk Bacterial Population Shifts Attributable to Refrigeration. Applied Environmental Microbiology, v. 70, n. 9, p. 5644-5650, 2004.
- DE MAN, J.C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M.E. A medium for cultivation of lactobacilli. J. Appl. Bacteriol., 23,130-135, 1960.
- FONSECA, C. R. et al. Armazenamento do leite de cabra cru em diferentes temperaturas por diferentes períodos e influência na qualidade microbiológica, físico-química e sensorial do produto pasteurizado. 2006. Tese de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade de São Paulo, 2006.
- HOLT, J. Get al. 1989. Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology, Baltimore: Willians and Wilkins, v. 4, 1989.
- PAULO, E. P. Produção de exopolissacarídeos (EPS) por bactérias lácticas visando microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* La-5 pelo processo de Spray drying. 2010. Tese 212f. (Doutorado em Biotecnologia), Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2010.