

Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus acidophilus*, contra microrganismos patogênicos veiculados por alimentos¹

Antimicrobial activity of *Lactobacillus acidophilus* against foodborne pathogens

Valéria Garcia Pereira^{2*}; Raul Jorge Hernan Castro Gómez³

Resumo

Foi avaliada a atividade antimicrobiana de uma cultura probiótica comercial, o *Lactobacillus acidophilus* La5, frente ao crescimento de dois microrganismos patogênicos veiculados por alimentos, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. O antagonismo da cultura probiótica *in vitro* foi avaliado utilizando tanto a Metodologia de Multicamadas quanto a de Difusão em Ágar. Os resultados demonstraram que a substância inibidora presente no sobrenadante é extracelular e difusível. O período de incubação da bactéria láctica em caldo MRS, a 37°C em condições de aerobiose, onde se obteve a maior produção de ácido láctico (1,08 g/%) foi 72 horas, o qual demonstrou o menor valor de pH do sobrenadante (3,90), e os melhores resultados de inibição pelo método de difusão em ágar, com halos de inibição de 14,75mm e 15,0mm de diâmetro para *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente. O composto inibidor não foi sensível à ação de enzimas proteolíticas e ao congelamento, mas foi totalmente inativado quando o sobrenadante foi neutralizado com solução de NaOH 1N. Os resultados obtidos sugerem que atividade inibidora observada foi decorrente da concentração de ácido láctico e do baixo pH do meio de cultivo do microrganismo probiótico.

Palavras-chave: Atividade antimicrobiana, *Lactobacillus acidophilus*, ácido láctico, cultura probiótica

Abstract

The antimicrobial activity of a commercial probiotic culture, *Lactobacillus acidophilus* (La5), was tested against two foodborne pathogens, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The antagonistic effect of the probiotic culture *in vitro* was performed by applying both Multilayer Agar Plate and Agar Well Diffusion methods. The results indicated that the inhibitory substance present on 72 hours culture broth supernatant was extracellular and diffusible. The incubation period of the lactic acid bacteria on MRS Broth, at 37°C in aerobic conditions, for the highest lactic acid production (1,08 g/%) was 72 hours, which gave a minimum pH value of the supernatant (3,90) and the best inhibition results by the Well Diffusion Agar Assay, showing inhibition zone diameters of 14,75mm and 15,0mm for *E. coli* and *S. aureus*, respectively. The inhibitor compound was not sensitive to proteolytic enzyme and freezing, but was totally inactivated when the supernatant was neutralized with NaOH 1 N solution. The results suggest that the inhibitory activity was due to the lactic acid concentration and the low pH of the probiotic culture broth.

Key words: Antimicrobial activity, *Lactobacillus acidophilus*, lactic acid, probiotic culture

¹ Parte integrante da Tese de Doutorado do primeiro autor, em Ciência de Alimentos pelo Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos da UEL, Londrina PR, desenvolvida com recursos da CAPES.

² Médica Veterinária formada pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP) – Botucatu, Mestre em Vigilância Sanitária pela mesma Universidade, Doutora em Ciência de Alimentos pela Universidade Estadual de Londrina. E-mail: valeryts@bol.com.br ou valeryts@mailcity.com.

³ Docente do Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos da Universidade Estadual de Londrina.

* Autor para correspondência

Introdução

A maioria das bactérias são capazes de produzir uma variada gama de substâncias *in vitro*, que podem ser inibidoras tanto para tais culturas, quanto para outras bactérias. Tais substâncias incluem: toxinas, enzimas bacteriolíticas, subprodutos de via metabólica (ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio) e bacteriocinas (TAGG; DAJANI; WANNAMAKER, 1976).

Para certos microrganismos, como os probióticos, tal antagonismo se torna uma propriedade desejável, seja pela produção de substâncias antimicrobianas ou pela exclusão competitiva durante seu crescimento (LEE; SALMINEN, 1995). Fuller (1992) define a bactéria probiótica como “um suplemento microbiano vivo que afeta benéficamente um organismo hospedeiro, melhorando seu balanço microbiano intestinal”. Dentre os probióticos, as culturas mais comumente utilizadas são constituídas por microrganismos produtores de ácido lático, em particular lactobacilos e bifidobactérias, que são adicionados a produtos lácteos fermentados ou comercializados na forma liofilizada (ZIEMER; GIBSON, 1998).

Os Lactobacilos constituem um importante grupo de bactérias ácido lácticas, estando amplamente difundidos na natureza. Muitas espécies têm aplicações na indústria de alimentos sendo utilizadas como culturas iniciadoras em leites fermentados, queijos, soro de leite, entre outros (PRASAD; GHODEKER, 1991). O gênero *Lactobacillus* é, com certeza, o mais amplo dos gêneros incluídos dentro deste grupo, sendo que diversas espécies já foram relatadas por vários autores como produtoras de substâncias antimicrobianas (RACCACH; McGRATH; DAFTARIAN, 1989; EL-ZINEY et al., 1999; ZAMFIR et al., 2000). Tais substâncias ajudam na manutenção da qualidade do produto lácteo processado, suprimindo o crescimento tanto de microrganismos deteriorantes, quanto de bactérias potencialmente patogênicas (GILLILAND; SPECK, 1977; PRASAD; GHODEKER, 1991).

Sobre este aspecto, alguns ácidos, principalmente ácido lático e acético, têm sido utilizados como

conservantes de alimentos, juntamente com a queda do pH, inibindo o crescimento de microrganismos contaminantes e patogênicos (VAN NETTEN; MOSSEL; HUIS IN'T VELD, 1997; SILVA, 1999; CASTILLO et al., 2001). Com isso, torna-se claro o grande interesse prático na continuidade das pesquisas, na identificação de culturas lácticas que possam produzir compostos antimicrobianos, levando à sua aplicação na preservação dos alimentos.

Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade inibidora *in vitro* de uma cepa de um probiótico comercial, o *Lactobacillus acidophilus* La5, e de seus metabólitos, frente ao crescimento de duas cepas de microrganismos patogênicos veiculados por alimentos: *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, bem como estudar a natureza do composto responsável por tal inibição.

Material e Métodos

Microrganismos

Como bactéria a ser testada quanto à sua atividade inibidora, foi utilizada uma cultura comercial probiótica liofilizada de *Lactobacillus acidophilus* La-5, gentilmente cedida pela Christian Hansen® (Valinhos, São Paulo). *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, isolados de casos humanos, foram gentilmente cedidas pela Prof. Dra. Tereza Cristina Rocha Moreira de Oliveira.

Condições de cultivo

A cultura probiótica foi mantida a -18°C em sua forma liofilizada. A manutenção dos microrganismos patogênicos indicadores foi feita em ágar nutriente inclinado, sob temperatura de refrigeração (10°C).

Para sua ativação, a cultura probiótica liofilizada foi inoculada em tubos de ensaio contendo 10mL de leite estéril desnatado e, posteriormente, incubada por 18-24 horas a 37°C , em aerobiose. Decorrido o período de incubação, 1mL do leite inoculado foi transferido para outro tubo contendo 10mL de leite

estéril desnatado e incubado novamente nas mesmas condições descritas anteriormente. Tal procedimento foi repetido mais uma vez para completar a ativação da cultura, antes da mesma ser transferida para o meio de cultivo onde seria analisada sua atividade inibidora. A cultura probiótica ativada foi transferida na proporção de 10% (v/v) para um Erlenmeyer contendo caldo MRS (de Man Rogosa & Sharpe) e incubada a 37°C em aerobiose (BALDUÍNO; OLIVEIRA; HAULY, 1999). Após período de incubação de 72 horas, o caldo foi centrifugado (Centrífuga Refrigerada EPPENDORF modelo 5804R) a 12.317xg por 10 minutos. O sobrenadante obtido foi então utilizado nos experimentos de inibição (PRADO et al., 2000).

Para a ativação dos microrganismos patogênicos indicadores, estes foram semeados, a partir do ágar nutriente, em tubos de ensaio contendo 5mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion), com auxílio de alça de platina, e levados à incubação em estufa a 35-37°C por 24 horas. Decorrido o período de incubação, foi feita a diluição seriada do inóculo em água peptonada 0,1%, separadamente para cada um, até a concentração desejada do microrganismo indicador para realização dos experimentos.

Inibição pelo método de multicamadas

Seguiu-se a metodologia descrita por Diep, Håvarstein e Nes (1995), com algumas modificações. As seguintes camadas de ágar foram adicionadas à cada placa de Petri: 1º) 7 mL de ágar MRS (1,4% de ágar) sem microrganismos; 2º) 7 mL de ágar MRS (0,7% de ágar) adicionado de 0,5mL do cultivo ativado de *Lactobacillus acidophilus* La5, previamente diluído em água peptonada 0,1%, até aproximadamente $1,0 \times 10^2$ UFC/mL; 3º) 7 mL de ágar BHI (0,7% de ágar) sem microrganismos. Após incubação a 37°C por 72 horas, para crescimento da bactéria láctica, foi adicionada a última camada, contendo 7 mL de ágar BHI adicionados de 50 µL de um cultivo de 24 horas do patógeno indicador, previamente diluído em água peptonada 0,1%, até

aproximadamente $1,0 \times 10^5$ UFC/mL. As placas foram incubadas a 37°C por mais 24 horas. Em caso de inibição positiva, verificava-se um halo de não desenvolvimento do microrganismo patogênico indicador, ao redor da colônia do *L. acidophilus*.

Inibição pelo método de difusão em ágar

Foi realizada seguindo a metodologia descrita por Prado et al. (2000), com algumas modificações. Foram utilizadas placas de Petri, onde foram adicionados 19 mL de ágar BHI, previamente inoculado com 1mL de cultivo de 24 horas do microrganismo patogênico indicador, em concentração de $1,0 \times 10^6$ UFC/mL. Logo após a solidificação do ágar na placa, este foi perfurado, com o auxílio de um molde metálico (estéril), formando poços de aproximadamente 5mm de diâmetro, onde foram adicionados 50µL do sobrenadante obtido do cultivo da bactéria láctica, previamente concentrado 10 vezes em Evaporador Rotativo (TECNAL TE-210) a 50°C. As placas foram levadas à geladeira (10°C) onde permaneceram por uma hora para difusão do sobrenadante no ágar e, depois, foram incubadas a 35°C por 24 horas. A inibição foi detectada pela presença de halos ao redor dos poços perfurados, onde não se verificava o crescimento dos microrganismos indicadores. As leituras dos halos de inibição foram mensuradas em milímetros, por meio de um paquímetro.

Natureza do composto inibidor

Todos os testes foram realizados com o sobrenadante concentrado 10 vezes, em Evaporador Rotativo, a 50°C. A técnica utilizada foi a de inibição por Difusão em ágar. Os seguintes tratamentos foram aplicados ao sobrenadante descrito acima: 1º) Congelamento a -18°C, por 30 dias; 2º) Liofilização em Liofilizador à vácuo (LABCOMCO), sendo o conteúdo ressuspensão em água purificada estéril; 3º) Tratamento com enzima Protease de *Aspergillus saitoi* P2143 da Sigma, segundo metodologia proposta

por Bonelli (2001); 4º) Filtragem do sobrenadante em filtro Millipore utilizando membrana de 0,20µm; 5º) Aquecimento em banho-maria a 75°C por 30 minutos e a 100°C por 15 minutos; 6º) Neutralização do pH do sobrenadante de 3,90 para cerca de 6,8 – 7,0, com solução de NaOH 1N.

Cinética da produção da substância antimicrobiana (ácido lático)

A partir do crescimento da cultura probiótica em caldo MRS, a 37°C em aerobiose, alíquotas do caldo de crescimento foram recolhidas em intervalos de tempo pré-estabelecidos, e centrifugadas, como descrito em 2, para a obtenção do sobrenadante contendo o composto inibidor. Nestas alíquotas foram realizadas as determinações do teor de ácido lático por método espectrofotométrico, segundo Silva (1981) e a determinação do pH do sobrenadante pelo método potenciométrico segundo as normas analíticas do INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985).

Avaliou-se, também, a evolução da atividade inibidora do caldo de cultivo centrifugado, sobre o crescimento dos dois microrganismos indicadores. Para isso, as alíquotas do caldo de cultivo foram concentradas em Evaporador Rotativo a 50°C, até atingir a décima parte do seu volume inicial. Seguiu-se a realização dos testes de inibição *in vitro*, utilizando-se a metodologia de Difusão em ágar.

Análise estatística

Utilizou-se um delineamento inteiramente ao acaso e teste de Tukey (Programa Statistica 6.0) para $P < 0,05$. Foram comparadas as médias dos resultados obtidos quanto à inibição, verificados pela medida dos diâmetros dos halos de inibição, obtidos pelo método de Difusão em ágar.

Resultados e Discussão

Os testes realizados para verificar a atividade inibidora da cultura probiótica a partir da Metodologia de Multicamadas apresentaram resultados positivos, verificados pela inibição dos dois microrganismos indicadores utilizados, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Os halos de inibição sobre o crescimento dos microrganismos indicadores testados, ao redor das áreas correspondentes ao crescimento do *Lactobacillus acidophilus* La5, podem ser visualizados nas Figuras 1 e 2.



Figura 1. Inibição de *Escherichia coli* pelo *Lactobacillus acidophilus* La5, utilizando a metodologia de multicamada.

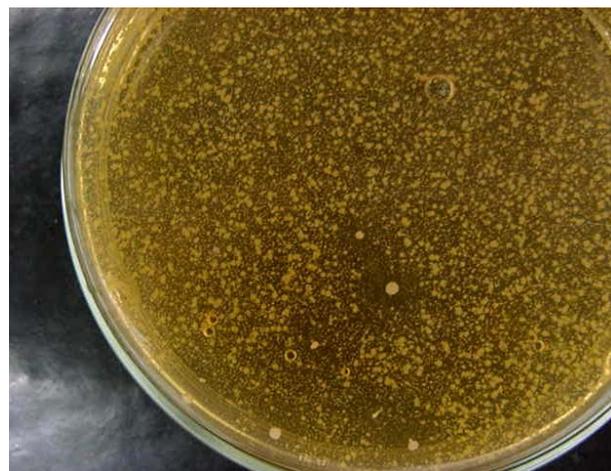


Figura 2. Inibição de *Staphylococcus aureus* pelo *Lactobacillus acidophilus* La5, utilizando a metodologia de multicamada.

Resultados semelhantes foram descritos anteriormente por Garcia (1999), onde o *L. acidophilus* La5 inibiu duas linhagens de *E. coli* de origem humana (*E. coli* 29.1 O119 e *E. coli* 64.1 OH7) e duas cepas de origem suína. Também González et al. (1993) conseguiram a inibição de *E. coli*, cultivando uma cepa de *L. acidophilus* pela metodologia de Multicamada.

Utilizando isolados de *L. acidophilus* obtidos a partir de produtos lácteos fermentados típicos da Índia, Prasad e Ghodeker (1991) conseguiram inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus*. A bactéria láctica foi primeiramente repicada no ágar MRS, para posteriormente ser adicionado o microrganismo patogênico em ágar BHI, constituindo um teste semelhante ao utilizado neste experimento. Já Fang et al. (1996) adotaram duas variáveis do Método de Multicamadas, cultivando o *L. acidophilus* em três meios de cultivo diferentes. Todas as variações demonstraram a inibição de *S. aureus* e *E. coli*.

No teste de Multicamadas, utilizado neste trabalho para verificar o antagonismo entre a cultura probiótica e os microrganismos indicadores, as culturas são separadas umas das outras por uma camada de ágar semi-sólido, o que impede o contato direto entre elas. Desta forma, qualquer substância inibidora deve difundir-se no ágar para exercer seu efeito sobre a bactéria indicadora, ou seja, deve ser extracelular e difusível (GONZÁLEZ et al., 1993; GARCIA, 1999).

A utilização da Metodologia de Difusão em ágar demonstrou a manutenção da atividade antimicrobiana sobre os microrganismos indicadores, mesmo após a separação por centrifugação, da biomassa contida no caldo de cultivo da cultura probiótica. A concentração do sobrenadante foi necessária uma vez que a inibição ocorria de forma pouco evidente quando o mesmo era utilizado após a centrifugação somente, isto porque a inibição de um microrganismo depende da concentração da substância inibidora presente. Estes resultados reforçam as afirmações de Barefoot e Nettles (1993) de que a probabilidade de se observar atividade

antimicrobiana é potencialmente maior utilizando-se ágar, em lugar de meio líquido, devido à produção contínua, localizada e concentrada ao redor das células. Outros autores já haviam relatado que somente conseguiram evidenciar atividade inibidora por parte do *L. acidophilus* quando este foi semeado em placa, e não quando foi utilizado o sobrenadante livre de células (BAREFOOT; KLAENHAMMER, 1983; TOBA; YOSHIOKA; ITOH, 1991; FANG et al., 1996). Da mesma forma os estudos de Bogovic-Matijasic e Rogelj (1998) com bacteriocinas produzidas por uma cepa de *Lactobacillus acidophilus*, demonstraram que a produção deste antimicrobiano em caldo MRS é, em geral, muito sutil, devendo o sobrenadante ser concentrado para detecção do antagonismo pretendido.

Com o objetivo de descartar possíveis hipóteses quanto à natureza do princípio inibidor produzido pelo *Lactobacillus acidophilus* La5 durante seu crescimento em caldo MRS, e verificar a estabilidade deste composto frente a condições de temperatura diversas, vários tratamentos foram realizados no sobrenadante. Segundo a análise estatística, somente o congelamento e o tratamento do sobrenadante concentrado com a enzima proteolítica levaram a resultados que não diferiram significativamente ($P < 0,05$) dos resultados obtidos com o sobrenadante controle (Tabela 1). Isso nos permite considerar que a temperatura de congelamento e o tempo de armazenamento utilizados não afetaram a capacidade inibidora do agente antimicrobiano presente no sobrenadante do caldo de cultivo da bactéria láctica, e descarta a possibilidade de um composto de origem protéica ser responsável pela atividade inibidora. Diversas são as enzimas proteolíticas utilizadas pelos pesquisadores no intuito de evidenciar a atuação de bacteriocinas ou compostos semelhantes às mesmas. Quanto à sensibilidade das bacteriocinas às enzimas, tanto existem moléculas sensíveis a várias delas, como podem existir substâncias resistentes a uma ou outra enzima (BAREFOOT; KLAENHAMMER, 1983; FARIAS; RUIZ HOLGADO; SESMA, 1994). Porém, a concentração da Protease utilizada em nosso

experimento (50mg/mL) foi bastante alta, quando comparada aos valores normalmente apresentados na literatura: 0,5mg/mL (BAREFOOT; KLAENHAMMER, 1983); 0,4mg/mL (JUVEN;

SCHVED; LINDNER, 1992), não deixando dúvidas sobre a não atuação desta enzima sobre o composto inibidor produzido pelo *L. acidophilus* La5.

Tabela 1. Inibição de *S. aureus* e *E. coli* pelo sobrenadante obtido do caldo de cultivo de *Lactobacillus acidophilus* La5, após tratamentos realizados para determinação da natureza do composto inibidor.

Tratamentos	Diâmetro do halo de inibição (média, mm)*	
	<i>E. coli</i>	<i>S.aureus</i>
Neutralização	0,0 e	0,0 e
Enzima proteolítica**	15,43 a	15,37 a
Liofilização	15,12 ab	13,43 b
Congelamento	14,93 ab	15,12 a
Filtragem	12,68 c	13,18 bc
75° C / 30 minutos	11,18 d	9,62 d
100° C / 15 minutos	13,75 bc	12,37 c
Controle	15,44 a	15,50 a

* Médias (n=4) na mesma coluna com letras iguais não são significativamente diferentes; $P < 0,05$. Diâmetro inicial do poço (orifício) no ágar = 5 mm.

** protease de *Aspergillus saitoi* P2143 da Sigma, 50mg/mL, a 37°C/1hora.

O processo de liofilização remove metabólitos de H_2O_2 (peróxido de hidrogênio), um produto do metabolismo das bactérias lácticas que pode ser responsável pela inibição de outros microrganismos (PRADO et al., 2000). Também é prática comum a utilização da enzima catalase para inativar a ação do peróxido de hidrogênio em meios de cultivo para bactérias lácticas (TOBA; YOSHIOKA; ITOH, 1991; JUVEN; SCHVED; LINDNER, 1992). Porém, de acordo com relatos de outros pesquisadores, tal composto é rapidamente degradado em caldo MRS, não podendo nem mesmo ser detectado, sendo impossível atribuir a inibição observada à ação deste metabólito (RODRIGUEZ et al., 1997).

A análise dos dados demonstra que o processo de liofilização atuou no sobrenadante, alterando significativamente ($P < 0,05$) sua capacidade inibidora, porém somente nos testes realizados com *S. aureus*, demonstrando uma variação quanto à sensibilidade

das duas cepas de microrganismos patogênicos testadas, com relação ao composto inibidor.

O sobrenadante contendo o composto inibidor foi sensível às duas temperaturas e períodos de tempo diferentes, utilizados para testar a sua estabilidade às condições de aquecimento, apresentando uma maior sensibilidade a uma temperatura mais baixa e por maior tempo de exposição (75°C por 30 minutos), demonstrando halos de inibição iguais a 11,18 e 9,62mm de diâmetro para *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente. Quando a temperatura usada foi mais alta, mas por menor tempo de exposição (100°C por 15 minutos) a inibição foi significativamente maior ($P < 0,05$) que na temperatura usada anteriormente, com halos de inibição iguais a 13,75 e 12,37mm de diâmetro para *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente. Com relação à perda da atividade inibidora do composto, pode-se concluir que, o tempo de exposição à temperatura elevada, foi mais influente que a diferença de temperatura em si, considerando

o gradiente de temperatura utilizado. Segundo estudos de outros pesquisadores, as bacteriocinas produzidas por cepas de *L. acidophilus* são, em geral, resistentes aos tratamentos térmicos mais severos, apresentando um comportamento diferente do que foi observado neste experimento (BAREFOOT; KLAENHAMMER, 1983; CHUMCHALOVÁ; JOSEPHSEN; PLOCKOVÁ, 1998). Também o processo de filtração teve um efeito sobre o composto inibidor, reduzindo de forma significativa a inibição verificada sobre os dois microrganismos indicadores, mas não eliminou a ação do agente antimicrobiano, confirmando a sua origem extracelular. Para Fang et al. (1996) fatores antibacterianos produzidos durante o crescimento do *L. acidophilus* em caldo, podem ter vida-útil curta ou serem removidos pelo processo de filtração.

O sobrenadante concentrado foi sensível à neutralização com solução de NaOH 1N, perdendo totalmente sua capacidade inibidora, demonstrando que a atividade antimicrobiana verificada no experimento, foi decorrente da presença de ácidos, levando à queda do pH do meio. Durante o crescimento das bactérias ácido lácticas ocorre a queda do pH, que torna o ambiente bastante ácido, principalmente devido a produção de ácidos como o láctico. Estes são fatores que podem determinar a inibição de outros microrganismos.

Os resultados obtidos a partir do crescimento de *L. acidophilus* em caldo MRS, a 37°C em aerobiose, demonstraram um valor mínimo de pH do sobrenadante, em torno de 3,90, após 72 horas de incubação. A máxima produção de ácido láctico verificada, também ocorreu após o mesmo período de cultivo, chegando a 1,08 g% (120 mMol) de ácido láctico no sobrenadante. Na Figura 3 podem ser visualizados os valores de pH e produção de ácido láctico segundo o período de incubação da bactéria láctica.

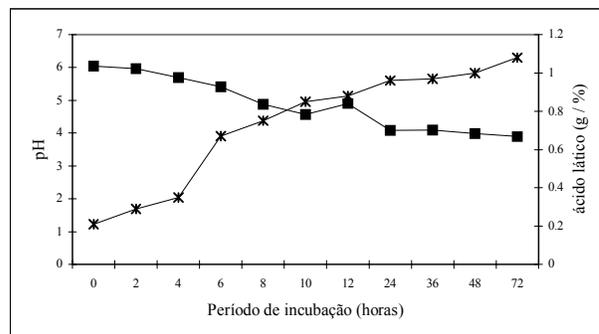


Figura 3. Perfil metabólico do *Lactobacillus acidophilus* La5, durante seu crescimento em caldo MRS a 37°C, em aerobiose. ■, valores de pH; *, produção de ácido láctico (g/%).

Estes resultados estão de acordo com os descritos por Østlie, Helland e Narvhus (2003), utilizando leite UHT (Ultra High Temperature) para cultivar o *L. acidophilus* La5 em condições de aerobiose. Também foram necessárias 72 horas de incubação da cultura probiótica para alcançar os menores valores de pH do leite (3,9), e a maior produção de ácido láctico (1,20g%).

Crescendo também em condições de aerobiose, a cepa de *L. acidophilus* utilizada por Chick, Shin e Ustunol (2001) foi capaz de reproduzir resultados bastante semelhantes aos encontrados neste trabalho (pH 3,79 – 3,92; ácido láctico entre 117 e 135 mM), porém em um período bem menor, apenas 24 horas de incubação da bactéria láctica em leite.

Zamfir et al. (2000) monitoraram a produção de bacteriocinas pelo *L. acidophilus* IBB 801, durante seu crescimento em aerobiose em caldo MRS. O valor mínimo de pH do meio de cultivo, alcançado em seus estudos, foi de 4,4, após 14 horas de incubação do microrganismo. Quanto à produção de ácido láctico, esta variou bastante com relação às condições de cultivo. Sem o monitoramento do pH, o máximo produzido foi 11 g/L (1,1 g/%) após 24 horas de incubação. No entanto, quando o pH do meio foi mantido no valor de 6,0, a máxima produção ocorreu com apenas 13 horas de incubação, chegando a valores superiores aos encontrados neste experimento, 20 g/L (2,0 g/%).

Ogawa et al. (2001) obtiveram valores de pH e ácido láctico bastante semelhantes aos deste trabalho, após somente 14 horas de incubação da bactéria láctica, porém cultivando-a em anaerobiose e em um meio de cultivo formulado pelos pesquisadores.

A relação entre a concentração de oxigênio no meio e o metabolismo da bactéria probiótica, já foi estudada por outros pesquisadores (MELZOCH; KONOPÁSKOVÁ, 1993; TALWALKAR; KAILASAPATHY, 2003). Sabe-se que as condições de aerobiose podem alterar as concentrações finais dos principais metabólitos produzidos durante seu crescimento, mas afirma-se também, que tal influência difere de acordo com a cepa testada.

Pode-se observar neste experimento que a maior inibição, alcançada pelo método de difusão em ágar, ocorreu com o sobrenadante obtido a partir de 72 horas de incubação do *L. acidophilus* La5 em caldo MRS, a 37°C, em aerobiose, demonstrando halos de inibição de 14,75mm e 15,0mm de diâmetro para *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente. Em seus experimentos, Varadaraj et al. (1993) somente

conseguiram a inibição de *S. aureus* e não de *E. coli*, obtendo para o primeiro zonas de inibição entre 7 e 9mm de diâmetro.

A análise estatística dos dados obtidos quanto à inibição pelo método de difusão em ágar, pode ser observada na Tabela 2. Somente com 10 horas de incubação da bactéria láctica em caldo MRS, obteve-se um sobrenadante concentrado capaz de inibir *E. coli*. Por outro lado, a inibição de *S. aureus* ocorreu com o sobrenadante obtido a partir de 12 horas de incubação. A análise dos dados aponta que não houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre os valores de inibição obtidos com 48 e 72 horas de incubação, para ambos os microrganismos indicadores. Porém, fica evidente que o período de maior produção de ácido láctico e menor valor de pH do sobrenadante verificados, coincidem com a maior inibição dos microrganismos patogênicos, demonstrando, para este experimento, que o período de 72 horas de incubação do *L. acidophilus* La5 em caldo MRS, a 37°C em condições de aerobiose, foi o que apresentou os melhores resultados.

Tabela 2. Efeito do período de incubação do *Lactobacillus acidophilus* La5, sobre a inibição de *S. aureus* e *E. coli*, utilizando a metodologia de difusão em ágar.

Incubação (horas)	Diâmetro do halo de inibição (média, mm)*					
	10	12	24	36	48	72
<i>E. coli</i>	9,87 c	10,25 c	11,0 c	12,75 b	13,5 ab	14,75 a
<i>S. aureus</i>	-----	8,75 c	10,12 c	12,5 b	13,75 ab	15,0 a

* Médias (n=4) na mesma linha com letras iguais não são significativamente diferentes; $P < 0,05$. Diâmetro inicial do poço (orifício) no ágar = 5 mm.

Outros autores já haviam relatado a necessidade de um período de incubação da bactéria láctica mais extenso para exibir sua atividade antimicrobiana, confirmando os resultados obtidos neste experimento. González et al. (1993) observaram, em seus experimentos, a necessidade de um período de incubação do microrganismo de 48 horas para a liberação do composto antibiótico. Para os autores, a substância inibidora é um produto normal do metabolismo do lactobacilo, existindo uma

concentração crítica da substância, abaixo da qual o patógeno é capaz de crescer.

A quantidade de ácido láctico necessária para produzir os melhores resultados de inibição, verificados para ambos os indicadores testados foi de 4,4 g/% (488,45 mM), já que o sobrenadante precisou ser concentrado em relação ao seu volume inicial. Porém, para *E. coli*, os primeiros sinais de inibição foram observados com concentrações de aproximadamente 4,0g/% (444,05 mM) de ácido

lático no sobrenadante concentrado, obtido à partir de 10 horas de incubação da cultura probiótica. Para a inibição de *S. aureus*, foram necessários cerca de 4,08g/% (452,93 mM) de ácido lático, obtidos após 12 horas de incubação da bactéria láctica. A quantidade de ácido lático presente no sobrenadante concentrado foi determinada por método espectrofotométrico, segundo Silva (1981).

Os resultados descritos acima diferem bastante daqueles relatados anteriormente por Ogawa et al. (2001). Os autores cultivaram uma cepa de *E. coli* O157:H7 (89020087) em conjunto com *L. acidophilus* (YIT0070) em meio de cultivo líquido. Sob condições de anaerobiose foram necessários cerca de 110 mM de ácido lático para inibir tal cepa. Quando o ácido lático foi adicionado ao meio de cultivo contendo apenas *E. coli*, somente 70mM de ácido lático foram suficientes para inibir completamente o microrganismo.

Utilizando um sanitizante preparado à base de ácido lático, Lopes (1998) conseguiu inibir *E. coli* ATCC 11229 e *S. aureus* ATCC 6538, com eficácia bactericida de 99,999% em 30 segundos. O ácido lático foi utilizado na concentração de 94,76 mM, com um surfactante (sódio capril lactilato) a 1,25 mM.

Diante do exposto, pode-se considerar que o *Lactobacillus acidophilus* utilizado, produziu uma substância com efeito antimicrobiano sobre os microrganismos patogênicos indicadores testados que, é extracelular e difusível, apresenta um comportamento ácido e, devido às características metabólicas da bactéria láctica, trata-se, provavelmente, de ácido lático.

A inibição de microrganismos potencialmente patogênicos por metabólitos obtidos a partir do crescimento de *Lactobacillus acidophilus*, já foi descrita em estudos anteriores de González et al. (1993), Fang et al. (1996) e Ogawa et al. (2001). A ação do ácido lático foi apontada por eles como o principal mecanismo de inibição.

Muitos estudos já demonstraram que os resultados dos efeitos dos antimicrobianos *in vitro* não permitem

concluir sobre sua efetividade em produtos alimentícios (DAVIDSON; PARISH, 1989). Vê-se, portanto, a necessidade de estudos futuros sobre os efeitos da interação desses compostos com os componentes do alimento e a potencialização dos seus efeitos por outros antimicrobianos de alimentos.

Conclusões

1. A cepa de *Lactobacillus acidophilus* produziu uma substância extracelular e difusível, que apresentou ação inibidora sobre as cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* utilizadas;

2. A máxima atividade inibidora foi verificada após um período de incubação da bactéria láctica de 72 horas a 37°C, em caldo MRS, em aerobiose, demonstrando serem estas as melhores condições de cultivo para a produção do composto antimicrobiano;

3. A atividade inibidora observada foi, provavelmente, decorrente do baixo pH e da ação do ácido lático presente no sobrenadante concentrado, obtido a partir do crescimento do *Lactobacillus acidophilus* La5.

Agradecimentos

À CAPES, pelo apoio financeiro. À Christian Hansen, pela cepa de *Lactobacillus acidophilus* La5 utilizada nos experimentos. À Prof. Dra. Tereza Cristina Rocha Moreira de Oliveira, pelas cepas dos microrganismos patogênicos indicadores.

Referências

- BALDUÍNO, R.; OLIVEIRA, A. S.; HAULY, M. C. O. Cultura láctica mista com potencial de aplicação como cultura iniciadora em produtos cárneos. *Ciência e Tecnologia Alimentos*, Campinas, v.19, n.3, p.356-362, 1999.
- BAREFOOT, S. F.; KLAENHAMMER, T. R. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.45, n.6, p.1808-1815, 1983.

- BAREFOOT, S. F.; NETTLES, C. G. Antibiosis revisited: bacteriocins produced by dairy starter cultures. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v.76, n.8, p.2366-2379, 1993.
- BOGOVIC-MATIJASIC, B.; ROGELJ, I. Bacteriocin complex of *Lactobacillus acidophilus* LF221: production studies in MRS media at different pH values and effect against *Lactobacillus helveticus* ATCC 15009. *Process Biochemistry*, London, v.33, n.3, p.345-352, 1998.
- BONELLI, R. R. *Extração e caracterização de uma substância antimicrobiana produzida por Bacillus amyloliquefaciens*. 2001. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- CASTILLO, A.; LUCIA, L. M.; ROBERSON, D. B.; STEVENSON, T. H.; MERCADO, I.; ACUFF, G. R. Lactic acid sprays reduce bacterial pathogens on cold beef carcass surfaces and in subsequently produced ground beef. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v.64, n.1, p.58-62, 2001.
- CHICK, H.; SHIN, H. S.; USTUNOL, Z. Growth and acid production by lactic acid bacteria and bifidobacteria – growth in skim milk containing honey. *Journal of Food Science*, Chicago, v.66, n.3, p.478-481, 2001.
- CHUMCHALOVÁ, J.; JOSEPHSEN, J.; PLOCKOVÁ, M. The antimicrobial activity of acidocin CH5 in MRS broth and milk with added NaCl, NaNO₃ and lysozyme. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v.43, n.1-2, p.33-38, 1998.
- DAVIDSON, P. M.; PARISH, M. E. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food Technology*, Chicago, v.43, n.1, p.148-155, 1989.
- DIEP, D. B.; HÅVARSTEIN, L. S.; NES, I. F. A bacteriocin-like peptide induces bacteriocin synthesis in *Lactobacillus plantarum* C11. *Molecular Microbiology*, Oxford, v.18, n.4, p.631-639, 1995.
- EL-ZINEY, M. G.; VAN DEN TEMPEL, T.; DEBEVERE, J.; JAKOBSEN, M. Application of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* 12002 for meat decontamination and preservation. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v.62, n.3, p.257-261, 1999.
- FANG, W.; SHI, M.; HUANG, L.; CHEN, J.; WANG, Y. Antagonism of lactic acid bacteria towards *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* on agar plates and milk. *Veterinary Research*, Paris, v.27, n.1, p.3-12, 1996.
- FARIAS, M. E.; RUIZ HOLGADO, A. A. P.; SESMA, F. Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from regional cheeses: inhibition of foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v.57, n.11, p.1013-1015, 1994.
- FULLER, R. History and development of probiotics. In: _____. *Probiotics: the scientific basis*. 2.ed. London: Chapman & Hall, 1992. Cap.1.
- GARCIA, S. *Isolamento e caracterização de bactérias lácticas para uso como probiótico*. 1999. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- GILLILAND, S. E.; SPECK, M. L. Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and foodborne pathogens in associative culture. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v.40, n.12, p.820-823, 1977.
- GONZÁLEZ, S. N.; APELLA, M. C.; ROMERO, N. C.; DE MACÍAS, M. E. N.; OLIVER, G. Inhibition of enteropathogens by lactobacilli strains used in fermented milk. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v.56, n.9, p.773-776, 1993.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. *Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. 3 ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1985.
- JUVEN, B. J.; SCHVED, F.; LINDNER, P. Antagonistic compounds produced by a chicken intestinal strain of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v.55, n.3, p.157-161, 1992.
- LEE, Y. K.; SALMINEN, S. The coming of age of probiotics. *Trends in Food Science & Technology*, Oxford, v.6, n.7, p.241-245, jul. 1995.
- LOPES, J. A. Susceptibility of antibiotic-resistant and antibiotic-sensitive foodborne pathogens to acid anionic sanitizers. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v.61, n.10, p.1390-1395, 1998.
- MELZUCH, K.; KONOPÁSKOVÁ, L. Lactic acid production by aggregated continuous cultures of *Lactobacillus acidophilus* under aerobic conditions. *Biotechnology Letters*, Dordrecht, v.15, n.5, p.517-520, 1993.
- OGAWA, M.; SHIMIZU, K.; NOMOTO, K.; TANAKA, R.; HAMABATA, T.; YAMASAKI, S.; TAKEDA, T.; TAKEDA, Y. Inhibition of in vitro growth of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 by probiotic *Lactobacillus* strains due to production of lactic acid. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v.68, n.1-2, p.135-140, 2001.
- ØSTLIE, H. M.; HELLAND, M. H.; NARVHUS, J. A. Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria in milk. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v.87, n.1-2, p.17-27, 2003.

- PRADO, C. S.; SANTOS, W. L. M.; CARVALHO, C. R.; MOREIRA, E. C.; COSTA, J. O. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas de embutidos curados frente a *Listeria monocytogenes*. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v.52, n.4, p.417-423, 2000.
- PRASAD, M. M.; GHODEKER, D. R. Antimicrobial activity of lactobacilli isolated from fermented milk products. *Cultured Dairy Products Journal*, Washington, v.26, n.2, p.22-28, 1991
- RACCACH, M.; McGRATH, R.; DAFTARIAN, H. Antibiosis of some lactic acid bacteria including *Lactobacillus acidophilus* toward *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v.9, n.1, p.25-32, 1989.
- RODRIGUEZ, J. M.; MARTINEZ, M. I.; SUÁREZ, A. M.; MARTÍNEZ, J. M.; HERNÁNDEZ, P. E. Research note: unsuitability of the MRS medium for the screening of hydrogen peroxide-producing lactic bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, Oxford, v.25, n.1, p.73-74, jul. 1997.
- SILVA, D. J. Determinação do pH, da acidez titulável e do ácido láctico da silagem. In: _____. *Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos*. Viçosa: UFV/Imprensa Universitária, 1981. p.110-114.
- SILVA, J. A. Sanitização da carne bovina com ácidos orgânicos – Parte I. *Higiene Alimentar*, São Paulo, v.13, n.60, p.55-62, 1999.
- TAGG, J. R.; DAJANI, A. S.; WANNAMAKER, L. W. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriological Reviews*, Washington, v.40, n.3, p.722-756, 1976.
- TALWALKAR, A.; KAILASAPATHY, K. Metabolic and biochemical responses of probiotic bacteria to oxygen. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v.86, n.8, p.2537-2546, 2003.
- TOBA, T.; YOSHIOKA, E.; ITOH, T. Acidophilucin A, a new heat-labile bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* LAPT 1060. *Letters in Applied Microbiology*, Oxford, v.12, n.4, p.106-108, 1991.
- VANNETTEN, P.; MOSSEL, D. A. A.; HUIS IN'T VELD, J. H. J. Microbial changes on freshly slaughtered pork carcasses due to “hot” lactic acid decontamination. *Journal of Food Safety*, Trumbull, v.17, p.89-111, 1997.
- VARADARAJ, M. C.; DEVI, N.; KESHAVA, N.; MANJREKAR, S. P. Antimicrobial activity of neutralized extracellular culture filtrates of lactic acid bacteria isolated from a cultured Indian milk product (‘Dahi’). *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v.20, n.4, p.259-267, 1993.
- ZAMFIR, M.; CALLEWAERT, R.; CORNEA, P. C.; De VUYST, L. Production kinetics of acidophilin 801, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801. *FEMS: Microbiology Letters*, Amsterdam, v.190, n.2, p.305-308, sep. 2000.
- ZIEMER, C. J.; GIBSON, G. R. An Overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. *International Dairy Journal*, Barking, v.8, n.5-6, p.473-479, may/jun. 1998.

