



## AÇÃO ANTAGONISTA DE BACTÉRIAS LÁTICAS FRENTE AO CRESCIMENTO DE ESTIRPE PATOGENICA

---

Maria Carmela Kasnowski Holanda Duarte<sup>1</sup>, Neila Mello dos Santos Cortez<sup>2</sup>, Marco Antonio Sloboda Cortez<sup>3</sup>, Robson Maia Franco<sup>3</sup>

1. Médica Veterinária da Faculdade de Veterinária da Fundação Educacional D André Arcoverde, Valença – RJ - Brasil (melvetk@gmail.com)
2. Pós-Graduanda em Medicina Veterinária da Faculdade de Veterinária Universidade Federal Fluminense, Niterói – RJ - Brasil
3. Professor Doutor da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, Niterói – RJ - Brasil

**Recebido em: 06/05/2013 – Aprovado em: 17/06/2013 – Publicado em: 01/07/2013**

---

### RESUMO

Bactérias Ácido Láticas (BAL) são tradicionalmente utilizadas na produção de leites fermentados, contribuindo para o desenvolvimento de sabor e aroma, e com potencial em inibir o crescimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos, através da competição por nutrientes ou produção de substâncias antagonistas. No presente estudo avaliou-se *in vitro*, em placas de Petri com agar MRS, a ação antagonista de 30 repiques da cultura láctica mista *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* sobre estirpes patogênicas de *Escherichia coli*. Também foi elaborado leite fermentado com a cultura láctica mista (YF-L903 Thermophilic Yoghurt Culture Chr Hansen). Após a elaboração do produto inoculou-se, em determinadas amostras, estirpes de *E. coli* O157:H7 (E 40705-SH1 Public Health Laboratory Science). Foi observado formação de halos de inibição frente ao patógeno pelos repiques das culturas lácticas testadas, indicando a possibilidade de produção de ácidos orgânicos, bacteriocinas ou outras substâncias inibidoras de crescimento. Durante o período de 35 dias de armazenamento sob refrigeração observou-se a acidez e a viabilidade da cultura láctica mista tradicional e da estirpe patogênica inoculada. O iogurte elaborado atendeu aos padrões de qualidade no que concerne às características físico químicas avaliadas e a viabilidade da cultura láctica, que apresentou ação antagonista total sobre *E. coli* O157:H7.

**PALAVRAS-CHAVE:** cultura láctica, leite fermentado, halo de inibição, *Escherichia coli*

### ACTION ANTAGONIST LACTIC BACTERIA FRONT OF THE GROWTH OF PATHOGENIC STRAIN

#### ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB) are traditionally used in the production of fermented milks, thereby contributing to the development of flavor and aroma potential and inhibit the growth of spoilage and pathogenic microorganisms by competing for nutrients or production of antagonistic substances. In the present study we evaluated *in vitro*, in Petri dishes with agar MRS, the antagonist action of 30 peals of mixed lactic culture *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* on

pathogenic strains of *Escherichia coli*. Was also prepared milk fermented with lactic mixed culture (YF-L903 Thermophilic Yoghurt Culture Chr Hansen). After developing the product was inoculated, in certain samples, strains of *E. coli* O157: H7 (E-40705 SH1 Public Health Laboratory Science). We observed the formation of zones of inhibition against the pathogen by repetition of lactic cultures tested, indicating the possibility of producing organic acids, bacteriocins or other growth-inhibiting substances. During the 35 days of refrigerated storage was observed acidity and viability of lactic mixed traditional culture and inoculated pathogenic strain. The yogurt made met the quality standards with respect to physicochemical characteristics evaluated and viability of lactic culture, which showed full antagonist action on *E. coli* O157:H7.

**KEYWORDS:** culture lactic fermented milk, inhibition halo, *Escherichia coli*

## INTRODUÇÃO

Um dos recursos utilizados pelas indústrias para evitar que os alimentos sejam veículos de microrganismos deteriorantes e patogênicos é a bioconservação, que consiste na utilização de microrganismos inócuos, naturalmente presentes nos alimentos ou intencionalmente adicionados, com capacidade de inibir o crescimento dos considerados indesejáveis.

O processo denominado bioconservação tem crescente aplicação na indústria de laticínios, e as BAL são os microrganismos mais adequados para uso como bioconservadores devido às características antagônicas ao crescimento bacteriano. O derivado lácteo fermentado denominado iogurte é definido na legislação como o produto adicionado ou não de outras substâncias alimentícias, obtido por coagulação e diminuição do pH do leite, por fermentação láctica mediante a ação protossimbiótica de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, aos quais pode-se complementar outras bactérias ácido lácticas (BRASIL, 2007; BRASIL, 2008).

As Bactérias Ácido Lácticas (BAL) pertencem ao grupo de bactérias Gram positivas, bastonetes curvos e curtos, às vezes na forma de cocos ou bacilos, geralmente imóveis, não formadoras de esporos, são estritamente fermentativas, anaeróbicas, porém aerotolerantes, e geralmente catalase negativas (KANDLER & WEISS, 1986).

Os microrganismos componentes da microbiota fermentadora são denominados de cultivos iniciadores ou “starters”, reconhecidos como “Generally Recognized As Safe” (GRAS), constituindo um preparo de culturas selecionadas, de grande número de células de pelo menos um microrganismo, com vistas a ser acrescentado a matéria prima e promover de maneira controlada o processo de fermentação e a padronização do produto final (OLIVEIRA, et al., 2002; LEROY; VUYST, 2004).

As BAL compõem a microbiota normal que se desenvolve após o processamento de alguns alimentos e cujas atividades metabólicas contribuem para as características sensoriais desejáveis nos produtos e para inibir ou retardar a multiplicação de bactérias deteriorantes e patogênicas. Normalmente, agem por exclusão competitiva e síntese de substâncias antagonistas como ácidos orgânicos, diacetil, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas (ALEXANDRE et al., 2002; MARTINIS et al., 2003; FONTES et al., 2005; GUERRA & BERNADO, 2005; CHESCA et al., 2009).

Os principais metabólitos produzidos pelas bactérias lácticas são os ácidos orgânicos, destacando-se o ácido láctico que pode diminuir o pH do meio, o que

seria suficiente para exercer efeito de inibição sobre muitos microrganismos (COGAN & ACCOLAS, 1990; REDONDO, 2008).

É notório que os alimentos possam ser veículos de microrganismos capazes de reduzir a validade do produto, assim como transmitir agentes etiológicos de determinadas enfermidades ao consumidor.

*Escherichia coli* é a espécie predominante entre os diversos microrganismos anaeróbios facultativos que fazem parte da microbiota intestinal de animais de sangue quente. O significado da presença em alimentos deve ser avaliado por indicar contaminação microbiana de origem fecal, portanto condições higiênicas insatisfatórias, e eventual presença de enteropatógenos. Outro aspecto a ser considerado é que diversas estirpes são comprovadamente patogênicas para o homem e animais, dentre essas a *E. coli* O157:H7, implicada como agente etiológico da colite hemorrágica e síndrome urêmica hemolítica (FRANCO & LANDGRAF, 2005).

O presente trabalho teve como objetivos avaliar *in vitro* a ação antagonista da cultura mista de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* frente ao microrganismo patogênico *Escherichia coli*, assim como, elaborar iogurte com cultura láctica mista tradicional, analisar a viabilidade dos microrganismos e acidez durante o período de armazenamento, de acordo com a legislação; avaliar as características físico química do produto final; inocular estirpes patogênicas de *Escherichia coli* O157:H7 e observar a ação antagonista da cultura láctica frente ao patógeno indicador.

## MATERIAL E METODOS

O estudo foi realizado nos laboratórios de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal e de Tecnologia de Leite e Derivados, do Depto de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Veterinária, da Universidade Federal Fluminense (UFF)-Niterói/RJ. Foi avaliada *in vitro* a atividade antagonista da cultura láctica mista de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* (YF-L903 Thermophilic Yoghurt Culture Chr Hansen) frente ao crescimento de estirpe patogênica *E. coli* O157:H7 (E 40705-SH1 Public Health Laboratory Science), utilizada como cultura indicadora. Os testes de inibição foram realizados três vezes semeando-se em duplicata, de acordo com modificações nas técnicas de TAGG et al., (1976) e ROMEIRO (2005). A cultura láctica mista foi ativada em tubos contendo leite desnatado reconstituído a 10% esterilizado e posteriormente em caldo MRS (Man Rugosa Shape; Acumedia 7543A), incubados ambos a 37°C por 48 horas em jarras de anaerobiose (Anaerobac). Após ativação, foram confeccionados esfregaços e realizada a coloração de Gram para posterior bacterioscopia e observação das características dos cultivos; assim como realizada a prova da catalase.

As culturas ativadas foram semeadas, quantidade de 30µL, em cinco poços equidistantes em placas contendo ágar MRS e incubadas a 37°C em estufa bacteriológica por 48 horas em anaerobiose. Após o período de incubação, as placas foram invertidas e adicionado a cada tampa papel de filtro esterilizado embebido com 1mL de clorofórmio por 20 minutos para inativação das culturas. A cepa indicadora de *E. coli* foi previamente ativada em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI /Acumedia 7116A) a 37°C por 24 horas e também observada quanto as características em microscopia de imersão após confecção de lâminas coradas pelo método de Gram. Inoculou-se 0,1 mL de cada cepa indicadora em tubos contendo BHI semi-sólido que foram vertidos sobre a superfície das placas de ágar MRS com

as culturas lácticas inativadas; método denominado de semeadura sobrecamada. As placas foram incubadas a 37°C por 72 horas em aerobiose.

O iogurte foi elaborado respeitando-se as devidas práticas higiênicas de fabricação e utilizando-se como matéria prima o leite UHT integral, previamente analisado quanto a contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas, pesquisa de *Salmonella* spp., pesquisa de *S. aureus* e pesquisa de *E. coli* empregando-se o teste rápido Rida<sup>®</sup> Count, seguindo a metodologia do fabricante. Realizou-se também a pesquisa de resíduos de antimicrobianos com o teste Eclipse (CAP-LAB), mensurou-se o pH e a acidez, com peagômetro e pelo método de Dornic respectivamente, e a crioscopia com auxílio de crioscópio eletrônico (MC5400). Os resultados obtidos atenderam ao padrão estipulado pelo regulamento técnico de identidade e qualidade do produto (BRASIL, 1997); confirmando a qualidade desejável da matéria prima para elaboração do iogurte.

A cultura láctica mista de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* (YF-L903 Thermophilic Yoghurt Culture Chr Hansen) foi diluída em 500 mililitros (mL) de leite em pó desnatado reconstituído esterilizado e imediatamente usada em percentagem de inoculação de 50UI DVS para 500 litros de leite. Após adição da cultura e homogeneização, o produto foi envasado em garrafas plásticas do tipo pet (Emball<sup>®</sup>) de 250 mL, previamente esterilizadas em autoclave, e incubado em estufa a temperatura de 45°C durante o tempo necessário para atingir pH correspondente a 4,5.

A princípio a acidez do produto foi mensurada de hora em hora pelo método de Dornic e com auxílio de peagômetro, seguindo a metodologia preconizada pela Instrução Normativa nº 68, para acompanhar o processo de fermentação (BRASIL, 2006). Após alcançar a acidez desejada, as garrafas foram retiradas da estufa e classificadas em amostras controle (25 garrafas), contendo apenas o inóculo da cultura láctica mista, e amostras indicadoras (25 garrafas) inoculadas com a estirpe patogênica *E. coli* O157:H7 (E 40705-SH1 Public Health Laboratory Science). O microrganismo indicador foi semeado para ativação em ágar Nutriente e incubado em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. A cultura foi transferida para solução salina esterilizada com auxílio de alça de platina até que a concentração alcançasse a escala 1,0 de MacFarland. Inoculou-se suspensão de um mililitro da estirpe de *E. coli*, pós-fermentação, em 250 mL de iogurte, totalizando 25 garrafas de iogurte contendo o microrganismo patogênico indicador.

A amostra controle foi analisada quanto ao teor de gordura pelo método de Gerber e teor de proteína pelo método de Kjeldahl, de acordo com metodologia preconizada na Instrução Normativa nº68 (BRASIL, 2006).

As amostras controle e indicadora foram armazenadas em refrigeração a 5°C durante um período de 35 dias para realização das análises microbiológicas e avaliação da acidez nos dias 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 14, 18, 21, 22, 23, 28 e 35.

O pH e a acidez titulável foram mensurados nas amostras controles, nos dias de armazenamento determinados. O pH foi medido com auxílio de peagômetro Quimis (Modelo Q400HM) em 10 mL de amostra retirados das garrafas. O eletrodo do pH foi calibrado com solução tampão (Merck<sup>®</sup>) de pH 4,0 e 7,0. A acidez titulável foi monitorada pesando-se 10 mg da amostra e adicionando-se 10 mL de água destilada aquecida e isenta de gás carbônico (60°C). Após homogeneização, adicionou-se à amostra cinco gotas do indicador fenolftaleína e titulou-se com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 N sob agitação, até ponto final detectável pelo aparecimento de coloração rósea persistente por aproximadamente 30 segundos (BRASIL, 2006). A quantidade de NaOH em mL foi registrada e convertida

em gramas de ácido láctico.

As análises bacteriológicas foram realizadas nas amostras controle e indicadora nos dias de armazenamento determinados, procedendo-se previamente as diluições seriadas em solução salina peptonada 0,1% até  $10^{12}$ .

Nas amostras controle foi realizado a contagem de bactérias ácido lácticas em ágar Man Rugosa Shape (MRS, Acumedia 7543A) por semeadura em profundidade e em dupla camada. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 72 horas.

Nas amostras indicadoras as contagens foram realizadas após semeadura em profundidade de 1 mL das amostras diluídas do produto com o microrganismo *E. coli* O157 em ágar Mac Conckey Sorbitol (Acumedia 7320 A). As placas semeadas foram incubadas em aerobiose em estufa bacteriológica a 37°C por 48 horas.

Todas as análises foram realizadas em duplicata e os resultados correspondem a média das contagens. Os dados bacteriológicos foram convertidos para log UFC/mL e avaliados estatisticamente através da análise de regressão.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos resultados obtidos na presente pesquisa, no que concerne aos 30 repiques *in vitro* da cultura láctica mista tradicional (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*) analisados sobre a *E. coli*, 3,3% (um) houve formação de halo de 10 mm e 16,6% (cinco) com halos de 12 mm de diâmetro.

Os resultados deste experimento estão em concordância com os de NETO et al., (2005) que demonstraram a ação antagonista de bactérias ácido lácticas e identificaram que *Lactobacillus* spp. foi o que mais proporcionou inibição de microrganismos patogênicos testados, como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *E. coli*.

Resultados similares também foram descritos por BALDUINO et al., (1999), que observaram a formação de halos de inibição medindo 7 e 8 mm para *E. coli*, e CHIODA et al., (2007) que identificaram a inibição de *Escherichia coli* BIA26 por todas as cepas de *Lactobacillus* spp. testadas, pela presença de halos variando de 9,0 a 15,0 mm de diâmetro. PEREIRA & GOMÉZ (2007) avaliaram a ação de *Lactobacillus* sp. sobre *Escherichia coli* identificaram a produção de uma substância extracelular e difusível ocasionando o aparecimento de halos de inibição de 14,75 e 15,0 mm de diâmetro respectivamente.

Os achados desta pesquisa, também são equiparados aos de ALEXANDRE et al., (2002) que analisaram a atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo minas artesanal e observaram que das 192 cepas isoladas 25% foram capazes de inibir o crescimento *in vitro* de microrganismos indicadores, dentre os quais *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. Porém, diferente dos repiques formadores de halo de inibição frente a *E. coli* analisados neste estudo, os autores anteriormente citados, observaram que nenhuma das cepas isoladas foi capaz de inibir este microrganismo.

No presente trabalho não foi avaliada a natureza das substâncias antagonistas produzidas pelas culturas lácticas, porém as atividades inibitórias verificadas foram justificadas, em literatura específica, pela difusão de substâncias inibidoras no ágar que impediram o crescimento das culturas patogênicas indicadoras, conforme relato de PEREIRA & GÓMEZ (2007).

Na elaboração do iogurte, a fermentação do produto teve a duração de quatro horas, quando atingiu o valor de pH correspondente a 4,5 e acidez a 0,7g ácido

lático/100mL de amostra, representado nas Figuras 1 e 2, e em conformidade com o especificado pela legislação (BRASIL, 2007).

Valor similar de pH (4,4) foi encontrado por ESTRADA et al., (1999) ao elaborarem leite fermentado com cultura “starter” de iogurte, porém com o período de fermentação de oito horas e o decréscimo da acidez para 0,98 g ácido láctico/100mL.

Após o período de fermentação e estocagem, os teores de proteína e gordura do produto final foram respectivamente 3,1% e 3,2%, correspondendo aos padrões de identidade do produto estabelecidos no regulamento vigente (BRASIL, 2007).

No decorrer do período de armazenamento sob refrigeração houve aumento da acidez com redução do pH do iogurte. O pH final do produto foi de 4,2 e acidez titulável de 1,08 g ácido láctico/100 mL de amostra, apresentando variações que podem ser observadas nas Figuras 3 e 4. Os valores médios de acidez, expressados em ácido láctico, encontravam-se na faixa estabelecida pela legislação brasileira em vigor correspondente a acidez mínima de 0,6g de ácido láctico/100 g de produto e máxima de 1,5g de ácido láctico/100 g de produto (BRASIL, 2007).

A redução do pH e o conseqüente aumento da acidez ocorreram pela formação de ácidos orgânicos, principalmente ácido láctico, a partir da fermentação de carboidratos pelas bactérias lácticas. O *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, utilizado no presente experimento, é citado na literatura como o responsável pelo fenômeno denominado pós acidificação que favorece ao aumento de acidez durante o armazenamento sob refrigeração; dependendo da acidez inicial do produto, da temperatura de estocagem, do poder acidificante da cultura e da manutenção da galactosidase (TAMINE & ROBINSON, 1991; DAVE & SHAH, 1998; KAILASAPATHY, 2006).

A faixa de pH verificada nesta pesquisa encontra-se no limite mencionado por RODAS et al., (2001), que ao analisarem iogurtes de diferentes marcas, verificaram que todas encontravam-se entre 3,6 e 4,2, no qual o crescimento das bactérias lácticas normalmente não é prejudicado. Resultados similares foram citados por BARRANTES et al., (2004) que observaram valores entre 3,6 e 4,0 nos iogurtes avaliados; e por SOAVE & LACERDA (2007) que obtiveram pH entre 4,0 e 4,7 em bebidas lácteas elaboradas com cultura láctica mista tradicional; considerando a acidez, importante fator para controlar o crescimento de microrganismos patogênicos.

A relação entre contagens de células bacterianas (Y) e tempo de armazenamento (X) do produto foi estudada através da análise de regressão sugerindo a formação de uma reta no gráfico, sendo avaliada pelas equações lineares representadas na Tabela 1.

**TABELA 1:** Equação linear de regressão entre a relação entre contagens de células bacterianas e tempo de armazenamento

AMOSTRA	MODELO DE EQUAÇÃO	DE R <sup>2</sup>	Pi>F
C	Y=14,84-0,51X	0,84	0,0001
I1	Y=9,82-0,76X	0,78	0,0001
I2	Y=10,56-0,67X	0,92	0,0001
I3	Y=9,18-0,30X	0,86	0,0001

C= amostra controle (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *S. thermophilus*); I1= Amostra Indicadora 1 (*E. coli* O157:H7); I2= Amostra Indicadora 2 (*S. aureus*); I3= Amostra Indicadora 3 (*L. monocytogenes*).

Y= contagem de células bacterianas

X= tempo em dias de armazenamento do iogurte

Durante o período de 35 dias de estocagem do iogurte, as contagens de UFC correspondentes a cultura láctica mista de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* variaram entre 14 log a 7,4 log UFC/mL, como representado no gráfico da Figura 5. Apesar da redução na concentração bacteriana durante o armazenamento, os valores encontrados estão associados a manutenção da viabilidade dos microrganismos no iogurte, desejável durante todo o período, e em conformidade com o estipulado pela legislação que determina que os microrganismos “starter” devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto durante o prazo comercial, apresentando uma contagem de bactérias lácticas totais de no mínimo  $10^7$  UFC/g (BRASIL, 2007).

Para garantir a viabilidade da cultura láctica pelo prazo comercial, as empresas fornecedoras têm por hábito trabalhar com concentrações liofilizadas mais elevadas do que o exigido por lei, e também a orientação de manutenção do produto final em temperatura de refrigeração é primordial; visto que pode ocorrer a pós acidificação. Esse procedimento técnico justifica a concentração inicial de bactérias lácticas utilizada no presente trabalho e o resultado obtido no prazo final de estocagem.

A redução de BAL viáveis observada neste experimento foi detectada de maneira similar por PEREZ et al., (2007) que afirmaram que a contagem tende a variar até o final do período de estocagem do iogurte, na maioria dos casos declinando. Nos achados das análises de MIGUEL & ROSSI (2003) ocorreu redução da ordem de dois ciclos logarítmicos ao longo do período de seis meses de estocagem do sorvete de iogurte, tanto para cocos quanto para bacilos, sem apresentar aspectos negativos que descaracterizassem o produto; este comportamento também foi observado no presente trabalho, entretanto com redução de sete ciclos logarítmicos.

Por sua vez, a avaliação da atividade antagonista diretamente no produto elaborado apresentou os seguintes resultados. Nas amostras indicadoras a população inicial da cultura patogênica foi de 8,3 log UFC/mL e as contagens foram gradativamente decrescendo a partir do terceiro dia de armazenamento.

A *Escherichia coli* (I1) sobreviveu no iogurte até o sexto dia de estocagem, com contagens variando de 8,3 log a 3,0 log UFC/mL; não sendo detectável a partir do sétimo dia.

A atividade antimicrobiana direta produzida pela microbiota estudada nesta pesquisa pode ser devida a vários fatores como, por exemplo, a produção de ácidos orgânicos, de peróxido de hidrogênio, de diacetil, de dióxido de carbono, de acetaldeído e de bacteriocinas, entre outros (FRANCO et al., 2006; FERNANDES et al., 2008). Também, tem influência o fato de as estirpes de bactérias lácticas e o microrganismo indicador patogênico se desenvolverem ao mesmo tempo, proporcionando a inibição por competição pelos nutrientes presentes no meio.

Entretanto, como observou-se neste experimento a variação de acidez, inclusive a fase de pós acidificação, provavelmente devido a formação de ácido láctico originado do metabolismo da microbiota láctica utilizada, foi um dos fatores que mais favoreceu a ação antagonista frente a estirpe patogênica indicadora.

Trabalho similar foi desenvolvido por BARRANTES et al., (2004) que analisaram o comportamento de *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* O157:H7 inoculadas em iogurte, porém, obtiveram resultados diferentes aos desta pesquisa, uma vez que verificaram o desaparecimento de *L. monocytogenes* no vigésimo dia de armazenamento e a viabilidade de *E. coli* O157:H7 durante os 28 dias .

Por sua vez, CALDERÓN et al., (2007) observaram a redução da população de *E. coli* O157:H7 em níveis não detectáveis, em iogurte tradicional sem adição de

probiótico, em 20 dias de armazenamento.

Dados semelhantes foram obtidos por GOVARIS et al., (2002) que relataram a inibição do crescimento de *E. coli* O157:H7 em iogurte de leite de ovelha, iogurte de leite de vaca e iogurte de soro de leite contaminados pós fermentação após 17, 14 e 12 dias de estocagem respectivamente.

Os achados desta pesquisa são equiparáveis ao de BASTOS (2009) que avaliou a sobrevivência de *E. coli* O157:H7 em iogurtes elaborados com cultura láctica mista tradicional, contaminados pós fermentação e observou, durante os 30 dias de estocagem sob refrigeração, permanência das contagens de *Lactobacillus* spp. e *Streptococcus* spp. entre 8-9 log UFC/mL e o patógeno foi inibido a partir do quinto dia de estocagem.

A diversidade de resultados encontrados na literatura e comparados com o presente estudo é explicada pela existência de fatores que interferem diretamente na capacidade antagonista das BAL como o estágio de contaminação, a dose do inóculo contaminante, o tipo de cepa, a ácido resistência, a quantidade e o tipo de bactéria ácido láctica utilizada, a composição do meio, entre outros (HSIN-Y & CHOU, 2001; KASIMOGLU & AKGÜN, 2004; MUFANDAEDZA et al., 2006; NASCIMENTO, 2007).

Além disso, convém salientar que para que ocorra a inibição do crescimento bacteriano, um conjunto de fatores intrínsecos e extrínsecos exerce influência determinando a estabilidade microbiológica e o prazo comercial do produto, e consistindo no denominado conceito dos obstáculos tecnológicos (FRANCO & LANDGRAF, 2005).

Os fatores anteriormente mencionados, que podem ter influenciado nos resultados obtidos nesta pesquisa, foram ressaltados nos trabalhos de HSIN-YI & CHOU (2001) que avaliaram a sobrevivência de dois diferentes tipos de estirpe de *E. coli* O157:H7, com características ácido adaptada e não ácido adaptada, em iogurte comercial inoculado com 6,0 log UFC/mL. Ambas as estirpes foram inibidas durante a estocagem a 7,0°C, entretanto, um tipo não foi detectável a partir do quarto e quinto dias para células ácido adaptadas e não ácido adaptadas, respectivamente; enquanto a outra estirpe apresentou-se mais resistente sendo inibida após o sétimo dia, independente da característica de adaptação ao meio ácido. KASIMOGLU & AKGÜN (2004) estudaram concentrações diferentes do inóculo de *E. coli* O157:H7, correspondentes a 10<sup>2</sup>, 10<sup>4</sup> e 10<sup>6</sup> UFC/mL, em iogurte com contagens de bactérias ácido lácticas em torno de 10<sup>9</sup> UFC/mL e observaram o efeito inibitório em 48 horas de armazenamento para 10<sup>2</sup> e 10<sup>4</sup> UFC/mL e 72 horas para 10<sup>6</sup> UFC/mL.

A atividade antagonista apresentada pelas bactérias lácticas, encontrada na pesquisa realizada, é considerada característica desejável em uma cultura probiótica; conferindo grande relevância para aplicações em alimentos.

## CONCLUSÕES

Após análise dos resultados encontrados neste experimento conclui-se que determinadas culturas lácticas são capazes de inibir o crescimento de estirpes patogênicas, entretanto cepas da mesma espécie podem apresentar variações na formação de halos pela diferente quantidade e variação de substâncias antimicrobianas produzidas, conferindo especificidade. O iogurte elaborado manteve as características físico-químicas e a viabilidade das BAL em conformidade aos padrões determinados na legislação vigente durante o prazo de 35 dias de estocagem sob refrigeração. No que concerne a ação antagonista das BAL, obteve-se inibição total do crescimento de *E. coli* O157:H7 a partir do sétimo dia de



armazenamento, comprovando a capacidade conservadora das BAL. A atividade antagonista observada sobre estirpes patogênicas, pode constituir uma das vantagens do uso de culturas lácticas na produção de alimentos.

## REFERÊNCIAS

ALEXANDRE, D. P.; SILVA, M.R.; SOUZA, M.R.; SANTOS, W.L.M. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo-de-minas artesanal do Serro (MG) frente a microorganismos indicadores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v. 54, n.4, jul/ago. 2002.

BALDUINO, R.; OLIVEIRA, A.S.; HAULY, M.C.O. Cultura láctica mista com potencial de aplicação como cultura iniciadora em produtos cárneos. **Ciência e Tecnologia Alimentar**, Campinas, v.19, n.3, sept./dec. 1999.

BARRANTES, X.; RAILEY, D.; ARIAS, M.L.; CHAVES, C. Evaluación del efecto de cultivos probióticos adicionados a yogurt comercial, sobre poblaciones conocidas de *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157:H7. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v.54, n.3, sep. 2004.

BASTOS, P.A.M.B. **Sobrevivência de *Escherichia coli* O157:H7 em iogurtes. Bom Jesus do Itabapoana**. Tese (Doutorado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense. Bom Jesus do Itabapoana - R.J., 2009. 83p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, p. 8, 12 de dez. 2006. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007. Padrões de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 24 de out. 2007. Seção 1, pt. 5.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 370, de 04 de setembro de 1997. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite UHT (UAT). **Diário Oficial da União**, Brasília. 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento Industrial de Inspeção Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 07/07/1952, revisado em 08/07/2008. Seção 1.

CALDERON, O; PADILLA, C.; CHAVES, C.; VILLALOBOS, L.; ARIAS, M.L. Evaluación del efecto del cultivo probiótico *Lactobacillus rhamnosus* adicionado a yogurt natural y con probióticos comerciales sobre poblaciones de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*, **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**. Caracas, v.57, n.1, mar. 2007.

CHESCA, A.C.; CASTRO, H.K.; SILVEIRA, M.; D'ANGELIS, C.E.M. Atividade Antimicrobiana de Bactérias Lácticas Isoladas de Queijos de Baixa Umidade Frente a *Staphylococcus aureus* ATCC6538 e *Listeria monocytogenes* ATCC7644. **Higiene Alimentar**. São Paulo, v.23, n.174/175, p.123-128, jul/ago. 2009.

CHIODA, T.P.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; GARCIA, G.R.; PIGATTO, C.P.; RIBEIRO, C.A.M.; RAGAZZANI, A.V.F.. Inibição do crescimento de *Escherichia coli* isolada de Queijo "Minas Frescal" por *Lactobacillus acidophilus*. **Ciência Rural**, Universidade Federal de Santa Maria, v.37, n.2, p.583-585, mar-abr. 2007.

COGAN, T.M.; ACCOLAS, J.P. Starter Cultures: Types, Metabolism and Bacteriophage. IN: ROBINSON, R.K. **Dairy Microbiology**. The Microbiology of Milk. 2 ed. USA: Elsevier Science Publishing, 1990. 301p., v. 1. p.77-114.

DAVE, R.I.; SHAH, N.P. Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria on yogurt. **Journal of Dairy Science**. Elsevier, v.81, n.11, p.2804-2816, nov.1998.

ESTRADA, A.Z.; MENDOZA, R.S.; LA GARZA, L.M.; FERADO, J.O. Behavior of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* in milk fermented with a yogurt starter culture. **Revista Latinoamericana de Microbiología**. Asociación Latinoamericana de Microbiología. v. 42, p. 5-10, 1999.

FERNANDES, C.E.; BENTO, R.A.; STAMFORD, T.L.M. Probióticos: aspectos fisiológicos, terapêuticos e tecnológicos. **Higiene Alimentar**. São Paulo, v.22, n.163, p.16-21, jul/ago. 2008.

FONTES, E.A.F.; PIRES, A.C.S.; ARAÚJO, E.A. Método Alternativo para Enumeração de Bactérias Lácticas. In: **Anais Eletrônicos do XXII Congresso Nacional de Laticínios**. A inserção do Brasil no mercado internacional de lácteos. Juiz de Fora, 18 a 21 de julho, 2005.

FRANCO, B.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu. 2005. 182p.

FRANCO, R.M.; OLIVEIRA, L.A.T.; CARVALHO, J.C.A.P. Probióticos - Revisão. **Higiene Alimentar**. São Paulo, v.20, n.142, p.22-33, jul. 2006.

GOVARIS, A.; KOIDIS, P.; PAPTAEODOROU, K. Behaviour of *Escherichia coli* O157:H7 in sour milk, cows' milk yogurt and ewes' milk yogurt. **Journal of Dairy Research**. Cambridge University Press, v. 69, n.4, p. 655-660. 2002.

GUERRA, M.M; BERNARDO, F.M.A. Influência da microflora de cura na ocorrência de *Listeria* spp. em queijos tradicionais. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinária**. Lisboa: Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias, v.100, n.555-556, p.185-188. 2005.

HSIN-YI, C.; CHOU, C-C. Acid adaptation and temperature effect on the survival of *E. coli* O157:H7 in acidic fruit juice and lactic fermented milk product. **International Journal of Food Microbiol.** v.70, n.1-2, p.189-195, out. 2001.

KAILASAPATHY, K. Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. **LWT- Food Science and Technology**. Oxford, v. 39, n. 10, p.1221-1227, 2006.

KANDLER, OTTO; WEISS, NORBERT. Genus *Lactobacillus*. In: SNEATH, P.H.A. et al. Regular, Nonsporing Gram Positive Rods. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: William & Wilkins. USA. v.2, cap. 14, p. 1208-1260. 1986.

KASIMOGLU, A.; AKGÜN, S. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in the processing and post-processing stages of acidophilus yogurt. **International Journal of Food Science & Technology**. v.39, n. 5, p.563-568, mai. 2004.

LEROY, F.; DE VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science & Technology**. Elsevier, v.15, n.2, p.67-78, feb. 2004.

MARTINIS, E.C.P.; SANTAROSA, P.R.; FREITAS, F.Z. Caracterização preliminar de bacteriocinas produzidas por seis cepas de bactérias lácticas isoladas de produtos cárneos embalados à vácuo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.23, n.2, mai/ago. 2003.

MIGUEL, D.P.; ROSSI, E.A. Viabilidade de Bactérias Ácido Lácticas em sorvetes de logurte Durante o Período de Estocagem. **Alimentos e Nutrição - Brazilian Journal of Food and Nutrition**. Araraquara, v.14, n.1, p.93-96. 2003.

MUFANDAEDZA, J.; VILJOEN, B.C.; FERESU, S.B.; GADAGA, T.H. Antimicrobial properties of lactic acid bacteria and yeast-LAB cultures isolated from traditional fermented milk against pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis* strains. **International Journal of Food Microbiology**. Elsevier, v.108, n.1, p.147-152, abr. 2006.

NASCIMENTO, M.S. **Caracterização da Atividade Antimicrobiana e Tecnológica de Três Culturas Bacteriocigênicas e Avaliação de sua Eficiência no controle de *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* em Queijo Minas Frescal**. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, São Paulo, 2007. 115p.

NETO, L.G.G.; SOUZA, M.R.; NUNES, A.C.; NICOLI, J.R.; SANTOS, W.L.M. Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a microrganismos indicadores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.57, supl. 2, p.245-250, 2005.

OLIVEIRA, M.N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J.H.A.; SAAD, S.M.I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas - Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. São Paulo, v. 38, n. 1, jan./mar., p.1-21, 2002.

PEREIRA, V.G.; GOMÉZ, R.J.H. Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus acidophilus*, contra microrganismos patogênicos veiculados por alimentos. **Semina:**

**Ciências Agrárias.** Londrina: Universidade Estadual de Londrina, v.28, n. 2, p. 229-240, abr./jun. 2007.

PEREZ, K.J.; GUARIENTI, C.; BERTOLIN, T.E.; COSTA, J.A.V.; COLLA, L.M. Viabilidade de Bactérias Lácticas em Iogurte Adicionado de Biomassa da Microalga *Spirulina platensis* Durante o Armazenamento Refrigerado. **Alimentos e Nutrição - Brazilian Journal of Food and Nutrition.** Araraquara, v.18, n.1, p.77-82, jan./mar. 2007.

REDONDO, M.C. **Avaliação in vitro de características probióticas do Enterococcus faecium CRL183 e do Lactobacillus helveticus ssp jugurti 416.** Araraquara. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho. Araraquara, 2008. 71p.

RODAS, M.A.B.; RODRIGUES, R. M. M. S.; SAKUMA, H.; TAVARES, L. Z.; SGARBI, C. R.; LOPES, W. C. C. Caracterização físico química, histológica e viabilidade de bactérias lácticas em iogurtes com frutas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos – Food Science and Technology.** Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia, v.21, n.3, p. 304-309, set-dez. 2001.

ROMEIRO, R.S. **Constatação da Produção de Bacteriocinas por Isolamentos de Bactérias Fitopatogênicas.** Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fitopatologia. MG. Brasil. 2005. Disponível em: [www.ufv.br/dfp/bac/uni15.pdf](http://www.ufv.br/dfp/bac/uni15.pdf). Acesso em: 12 de abril 2012.

SOAVE, P.B.; LACERDA, THM. Acompanhamento da Vida Útil de Bebidas Lácteas: Influência do Soro do Queijo e Culturas Contendo Organismos Probióticos. In: **15º Congresso de Iniciação Científica.** V Amostra Acadêmica UNIMEP. Piracicaba, out, 2007, p.1-9.

TAGG, J.R.; DAJANI, A.S; WANNAMAKER, L.M. Bacteriocin of Gram-positive bacteria. **Bacteriological Review.** American Society Microbiology, v.40, n.3, p. 722-756, set. 1976.

TAMINE, A.Y.; ROBINSON, R.K. **Yogur: Ciencia y tecnología.** Zaragoza: Editorial Acribia. Espanha. 1991. 368p.