

## Propriedades probióticas *in vitro* de *Lactobacillus* spp. isolados de queijos minas artesanais da Serra da Canastra - MG

[In vitro probiotic properties of *Lactobacillus* spp. isolated from Minas artisanal cheese from Serra da Canastra - MG]

C.R.G. Andrade<sup>1</sup>, M.R. Souza<sup>2</sup>, C.F.A.M. Penna<sup>2</sup>, L.B. Acurcio<sup>3</sup>, F.M. Sant'Anna<sup>1</sup>,  
R.D. Castro<sup>4</sup>, D.L.S. Oliveira<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Aluno de pós-graduação – Escola de Veterinária – UFMG – Belo Horizonte, MG

<sup>2</sup>Escola de Veterinária – UFMG – Belo Horizonte, MG

<sup>3</sup>Aluno de pós-graduação – Instituto de Ciências Biológicas – UFMG – Belo Horizonte, MG

<sup>4</sup>Aluna de graduação – Escola de Veterinária – UFMG – Belo Horizonte, MG

### RESUMO

O objetivo deste estudo foi determinar o potencial probiótico *in vitro* de *Lactobacillus* spp. isolados de queijos minas artesanais da Serra da Canastra, considerando-se o antagonismo entre amostras isoladas frente a microrganismos indicadores, a susceptibilidade a antimicrobianos, a sensibilidade ao ácido gástrico e a sensibilidade a sais biliares. Todas as bactérias ácido-lácticas testadas apresentaram resistência ao ácido gástrico (pH 2,0) e aos sais biliares (0,3%), bem como atividade antagonista contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* var. *Typhimurium*, *Enterococcus faecalis* e bactérias ácido-lácticas isoladas dos próprios queijos – *Lactobacillus plantarum* (D27) e *Lactobacillus rhamnosus* (B25). Todas as amostras foram sensíveis à eritromicina e tetraciclina e resistentes à ciprofloxacina, gentamicina, oxacilina, estreptomicina e vancomicina. *L. plantarum* (B17) apresentou melhor potencial probiótico, pois obteve resultados satisfatórios em todas as propriedades avaliadas. Mais estudos são necessários para verificar a presença e a capacidade de transmissão de genes de resistência antimicrobiana a outros microrganismos e para avaliar o potencial dos microrganismos *in vivo*. As bactérias selecionadas poderão ser utilizadas na elaboração de queijos em que sejam mantidos o sabor e a tradição do queijo minas artesanal do estado de Minas Gerais.

Palavras-chave: queijo minas artesanal, bactérias ácido-lácticas, potencial probiótico

### ABSTRACT

The aim of this study was to determine some *in vitro* probiotic features of *Lactobacillus* spp. isolated from Minas artisanal cheese from Serra da Canastra in order to select some bacteria for future production of safer cheeses keeping their natural flavor and tradition. The evaluated properties were antagonism against indicator microorganisms, antimicrobial susceptibility and also sensitivity to gastric acid and to bile salts. All lactic acid bacteria tested were resistant to gastric acid (pH 2.0) and bile salts (0.3%). Antagonistic activities were detected against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella entericavar. Typhimurium*, *Enterococcus faecalis* and other lactic bacteria isolated from the same cheese – *Lactobacillus plantarum* (D27) and *Lactobacillus rhamnosus* (B25). All samples were sensitive to the antimicrobials erythromycin, tetracycline and resistant to ciprofloxacin, gentamycin, oxacillin, streptomycin and vancomycin. *L. plantarum* (B17) presented the best probiotic potential. Further studies are needed to verify the presence and the capacity of transmission of antimicrobial resistance genes to other microorganisms and evaluate the *in vivo* probiotic potential of the selected microorganisms.

Keywords: artisanal Minas cheese, lactic acid bacteria, probiotic potential

---

Recebido em 17 de março de 2013

Aceito em 11 de fevereiro de 2014

E-mail: camilaandradekk@yahoo.com.br

## INTRODUÇÃO

O queijo minas artesanal é um dos mais antigos e tradicionais queijos produzidos no Brasil, sendo responsável pela geração de renda de um grande número de pequenos produtores rurais (Dores e Ferreira, 2012). Sua produção, na maioria das vezes, é feita de maneira tradicional nas fazendas, a partir de leite cru e, por isso, apresenta grande variabilidade na sua microbiota (Costa *et al.*, 2013). As informações sobre o queijo minas artesanal da Serra da Canastra, principalmente a respeito de sua microbiota endógena, e os fatores que podem determinar variações nessa microbiota ainda são limitados (Resende *et al.*, 2011). A seleção de microrganismos probióticos a partir desses queijos torna-se relevante para a formação de um banco de culturas lácticas desejáveis as quais possam futuramente ser utilizadas para proporcionar segurança na produção, bem como sabor aos queijos, e, assim, preservar esse patrimônio cultural.

O objetivo deste estudo foi determinar o potencial probiótico *in vitro* de *Lactobacillus* spp. isolados de queijos minas artesanais produzidos na região da Serra da Canastra, considerando-se o antagonismo entre amostras isoladas frente a microrganismos indicadores, a susceptibilidade a antimicrobianos, a sensibilidade ao ácido gástrico e a sensibilidade a sais biliares.

## MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi executado nos laboratórios de Genética Molecular de Protozoários Parasitas do Instituto de Ciências Biológicas e de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. Os *Lactobacillus* spp. empregados nas análises foram previamente isolados e identificados de queijos minas artesanais da Serra da Canastra por Resende *et al.* (2011).

O teste de antagonismo foi realizado em triplicata, com duas repetições para cada amostra, conforme a técnica adaptada relatada por Tagg *et al.* (1976). Foram selecionadas sete amostras de *Lactobacillus* spp., denominadas culturas produtoras, isto é, as que foram testadas quanto à capacidade antagonista contra outros microrganismos, denominados de culturas

reveladoras. Como culturas reveladoras, foram utilizadas cinco bactérias patogênicas de referência (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* var. Typhimurium e *Enterococcus faecalis*), gentilmente cedidas pelo professor Jacques Robert Nicoli, do Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, e duas amostras isoladas dos mesmos queijos minas artesanais da Serra da Canastra (*Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus rhamnosus*), isolados e identificados por Resende *et al.* (2011), com o intuito de examinar atividade inibitória entre bactérias presentes no próprio ambiente de onde foram isoladas.

O antibiograma foi realizado em duplicata, com duas repetições para cada amostra, de acordo com o método adaptado de susceptibilidade a antimicrobianos proposto por Charteris *et al.* (1998). O teste de sensibilidade ao pH gástrico foi realizado em triplicata, com duas repetições para cada amostra, de acordo com a técnica adaptada de Neumann (1991).

O teste de sensibilidade aos sais biliares foi realizado em triplicata, com duas repetições para cada amostra, de acordo com o protocolo de Costa *et al.* (2013). Os resultados foram submetidos às análises estatísticas descritivas e não paramétricas (Sampaio, 2002). A comparação entre as médias dos diferentes tratamentos realizados no teste de antagonismo foi feita de acordo com o teste de Kruskal-Wallis (Baja, 2004).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tab. 1 mostra que *L. plantarum* (B17), além de inibir as outras bactérias reveladoras, foi a única capaz de inibir *S. enterica* var. Typhimurium.

Notou-se que houve inibição, mas em menor proporção, contra as bactérias reveladoras do próprio queijo, *L. plantarum* (D27) e *L. rhamnosus* (B25). Entretanto, a amostra produtora *L. plantarum* (D16) não inibiu a reveladora *L. rhamnosus* (B25). Segundo Guedes Neto (2005), a inibição de outros microrganismos é desejável para a sobrevivência das bactérias ácido-lácticas em ambientes que apresentam microbiota diversificada e complexa, como é o caso dos queijos.

Tabela 1. Médias dos halos de inibição (mm), de duas repetições em triplicata, do teste de antagonismo *in vitro* de amostras de *Lactobacillus* spp., isolados de queijos minas artesanais da Serra da Canastra, contra bactérias reveladoras

Amostras	Bactérias reveladoras						
	EC	EF	ST	LM	SA	LP (D27)	LR (B25)
<i>L. casei</i> (A1)	34,73	16,50	0	23,59	29,55	10,90	12,29
<i>L. plantarum</i> (A21)	24,46	24,77	0	19,1	31,52	12,60	8,09
<i>L. plantarum</i> (B13)	33,54	24,71	0	32,87	36,27	7,95	9,73
<i>L. plantarum</i> (B17)	44,48	12,18	5,72	31,03	36,48	21,27	14,31
<i>L. plantarum</i> (B21)	37,01	14,68	0	30,39	28,16	20,59	8,79
<i>L. plantarum</i> (D16)	33,90	13,35	0	25,86	34,4	28,09	0
<i>L. rhamnosus</i> (A8)	40,94	27,94	0	50,87	48,07	19,33	11,61

Legenda: EC = *Escherichia coli* ATCC 25922, EF = *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, ST = *Salmonella enterica* var. Typhimurium ATCC 14028, LM = *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, SA = *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, LP = *L. plantarum*, LR = *L. rhamnosus*.

As médias dos halos de inibição para cada bactéria reveladora, das amostras de *Lactobacillus* spp., isoladas de queijos minas artesanais da Serra da Canastra, foram mais expressivas sobre *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Pode ser observado na Tab. 2 que houve diferença nas inibições no teste de antagonismo *in vitro*. *Lactobacillus* spp. isolados de queijos minas artesanais da Serra da Canastra apresentaram diferentes antagonismos contra cada bactéria reveladora.

Tabela 2. Médias dos halos de inibição (mm), de duas repetições em triplicata, do teste de antagonismo *in vitro* de amostras de *Lactobacillus* spp., isolados de queijos minas artesanais da Serra da Canastra, para cada bactéria reveladora

Reveladora	Média (mm)	Desvio-padrão	Coefficiente de variação (%)
<i>Enterococcus faecalis</i>	19,16c	6,77	35
<i>Escherichia coli</i>	35,58a	4,53	12
<i>Lactobacillus plantarum</i> (D27)	17,24c	6,13	35
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> (B25)	9,26d	2,17	23
<i>Listeria monocytogenes</i>	30,53b	10,19	33
<i>S. enterica</i> var. Typhimurium	0,81e	2,55	313
<i>Staphylococcus aureus</i>	34,92a	7,88	22

Legenda: Médias seguidas por letras distintas indicam resultados estatisticamente diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis (P<0,05).

O coeficiente de variação da bactéria reveladora *S. enterica* var. Typhimurium foi alto (313%), pois a única bactéria que a inibiu foi *Lactobacillus plantarum* (B17).

As médias dos halos de inibição para cada bactéria reveladora, das amostras de *Lactobacillus* spp. isoladas de queijos minas artesanais da Serra da Canastra, foram mais expressivas (P<0,05) sobre *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Esse fato é importante, pois essas bactérias são associadas a problemas de saúde pública no consumo de queijos minas artesanais contaminados (ICMSF, 1998). Tais resultados mostram o possível potencial de

utilização de *Lactobacillus* spp. testados para minimizar ou controlar problemas causados por bactérias patogênicas em queijos, visando melhorar a qualidade sanitária do produto.

Na Tab. 2, a média do halo de inibição também foi expressiva contra *Listeria monocytogenes*. As inibições de *Enterococcus faecalis* e *Lactobacillus plantarum* (D27) foram superiores à inibição contra *Lactobacillus rhamnosus* (B25) e *S. enterica* var. Typhimurium.

A média dos halos de inibição de todos os *Lactobacillus* spp. isolados de queijos minas artesanais da Serra da Canastra (Tab. 3) frente às

**Propriedades probióticas...**

bactérias reveladoras, patogênicas ou do próprio queijo, apresentou valores entre 17,22 e 28,39mm, e não houve variação ( $P>0,05$ ) entre a capacidade inibitória das diferentes espécies.

Tabela 3. Médias dos halos de inibição (mm), de duas repetições em triplicata, do teste de antagonismo *in vitro* de cada amostra de *Lactobacillus* spp., isolados de queijos minas artesanais da Serra da Canastra, frente às bactérias reveladoras

Amostra	Média (mm)	Desvio -padrão	Coefficiente de variação (%)
<i>L. casei</i> (A1)	18,22	11,92	65
<i>L. plantarum</i> (A21)	17,22	10,94	63
<i>L. plantarum</i> (B13)	20,72	14,62	70
<i>L. plantarum</i> (B17)	23,63	14,13	59
<i>L. plantarum</i> (B21)	19,94	13,02	65
<i>L. plantarum</i> (D16)	19,37	14,95	77
<i>L. rhamnosus</i> (A8)	28,39	19,23	67

Resultados similares do antagonismo *in vitro* de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijos artesanais frente a bactérias reveladoras também

foram encontrados por outros autores. Alexandre *et al.* (2002) demonstraram atividade antagonista de bactérias lácticas contra *S. aureus* e *L. monocytogenes*. Guedes Neto *et al.* (2005) verificaram inibição de *Lactobacillus* spp. contra *Staphylococcus* spp. e *E.coli*, e fraca inibição contra as bactérias isoladas do próprio queijo, *L. acidophilus*, *L. raffinolactis* *L. lactis*. Chioda *et al.* (2006) indicaram que *L. acidophilus* foi capaz de inibir o crescimento de *L. monocytogenes*. Costa *et al.* (2013) relataram atividade antagonista de *Lactobacillus* spp. isolados de queijos minas artesanais contra *Staphylococcus* spp., *E.coli* e *L. monocytogenes*, e pouca inibição contra microrganismos do próprio queijo, *L. rhamnosus* e *L. fermentum*. Kos *et al.* (2011) relataram atividade antagonista de *L. lactis* frente a *Staphylococcus* spp. e *E.coli*.

Todas as amostras de *Lactobacillus* spp. isolados de queijos minas artesanais da Serra da Canastra apresentaram resistência aos antimicrobianos vancomicina, estreptomicina, oxacilina, gentamicina e ciprofloxacina (Tab. 4).

Tabela 4. Médias dos halos de inibição (mm) da sensibilidade a antimicrobianos, de duas repetições em duplicata, de amostras de *Lactobacillus* spp., isolados de queijos minas artesanais da Serra da Canastra

Amostra	Antimicrobiano									
	CAZ	DA	CIP	E	GN	OX	PEN	S	TE	VA
<i>L. casei</i> (A1)	4,29 R	30,14 S	10,26 R	27,87 S	10,86 R	10,57 R	19,64 R	3,34 R	34,76 S	8,08 R
<i>L. plantarum</i> (A21)	25,39 S	10,26 MS	0,0 R	25,03 S	0,0 R	0,0 R	11,83 R	0,0 R	15,90 MS	0,0 R
<i>L. plantarum</i> (B13)	23,11 S	40,07 S	0,0 R	30,72 S	12,47 R	0,0 R	11,69 R	0,0 R	22,84 S	0,0 R
<i>L. plantarum</i> (B17)	25,21 S	12 S	0,0 R	28,51 S	8,24 R	2,22 R	9,16 R	0,0 R	19,59 S	0,0 R
<i>L. plantarum</i> (B21)	12,20 R	19,84 S	0,0 R	31,55 S	5,00 R	2,67 R	13,44 R	0,0 R	26,11 S	0,0 R
<i>L. plantarum</i> (D16)	12,55 R	20,32 S	0,0 R	34,58 S	10,34 R	0,0 R	12,61 R	0,0 R	26,23 S	0,0 R
<i>L. rhamnosus</i> (A8)	3,80 R	25,83 S	11,44 R	35,69 S	10,44 R	4,47 R	20,85 MS	2,59 R	36,51 S	0,0 R

Legenda: ceftazidima - CAZ (30µg), clindamicina - DA (2µg), ciprofloxacina - CIP (5µg), eritromicina - E (15µg), gentamicina - GN (10µg), oxacilina - OX (1µg), penicilina - PEN (10U), estreptomicina - S (30µg), tetraciclina - TE (30µg), vancomicina - VA (30µg). R = resistente; MS = moderadamente sensível; S = sensível.

A resistência de *Lactobacillus* spp. à vancomicina é uma característica comum, sendo associada a esse gênero, portanto pode haver resistência intrínseca a esse antimicrobiano (Zhou, 2005). Outros trabalhos (Herrerose *et al.*, 2005; Acúrcio, 2011; Costa *et al.*, 2013) também relataram alta resistência de *Lactobacillus* à vancomicina.

Todas as amostras de *Lactobacillus* spp. isolados de queijos minas artesanais da Serra da Canastra analisadas neste trabalho foram sensíveis ao antimicrobiano eritromicina. *L. plantarum* (A21) foi a única amostra que não foi sensível ao antimicrobiano clindamicina, tendo sido moderadamente sensível, e apenas *L. plantarum*

(A21) não foi sensível ao antimicrobiano tetraciclina, sendo moderadamente sensível.

Em geral, as amostras de bactérias ácido-láticas foram resistentes a vários antimicrobianos analisados. As amostras que obtiveram menor número de resistência a antimicrobianos foram *L. plantarum* (B13) e *L. plantarum* (B17), pois apresentaram sensibilidade aos antimicrobianos ceftazidima, clindamicina, eritromicina, tetraciclina. As amostras que obtiveram maior número de resistência a antimicrobianos foram *L. casei* (A1), *L. plantarum* (B21) e *L. plantarum* (D16), pois apresentaram sensibilidade somente aos antimicrobianos clindamicina, eritromicina e tetraciclina.

Amostras de *Lactobacillus* spp. resistentes à tetraciclina e à eritromicina foram descritas anteriormente (Azevedo et al., 2000; Temmerman et al., 2002; Klare et al., 2007), contrapondo com os resultados do presente experimento. Em concordância com esses dados, Charteris et al. (1998) relataram que 100% das amostras de *Lactobacillus* spp. foram sensíveis à tetraciclina, 97,82% foram sensíveis à eritromicina, e a maioria das amostras foram resistentes à gentamicina, estreptomicina e ciprofloxacina. Temmerman et al. (2002) observaram resistência das amostras de *Lactobacillus* spp. à penicilina. Hummel et al. (2007) verificaram a resistência a antimicrobianos em 40 culturas de fermento láctico e cinco culturas probióticas. As culturas foram sensíveis à tetraciclina e eritromicina, e resistentes à gentamicina, estreptomicina e ciprofloxacina. Herrerros et al. (2005) também encontraram altas taxas de resistência à vancomicina e à oxacilina em cepas isoladas de queijo artesanal espanhol. Zhou (2005) demonstrou que bactérias ácido-láticas foram sensíveis aos antimicrobianos eritromicina e tetraciclina, e resistentes à vancomicina, gentamicina e estreptomicina. Belletti et al. (2009) encontraram alta porcentagem de *Lactobacillus* spp. resistentes à gentamicina, penicilina, oxacilina e vancomicina e sensíveis à clindamicina, eritromicina e tetraciclina. Um dos critérios de seleção para culturas probióticas é ser resistente ao pH baixo (Quwehand et al., 1999), uma vez que, para atingir o intestino delgado, os microrganismos precisam resistir às

condições ácidas no estômago (Chou e Weimer, 1999).

Gilliland et al. (1984) preconizaram que, para uma bactéria ácido-lática ser resistente ao ácido gástrico, essa teria que alcançar absorvância de 0,3 após duas horas de incubação, em valores de pH na faixa de 1,5 a 4,0.

Conforme a Tab. 5, considerando-se somente a absorvância máxima alcançada, todas as amostras de bactérias ácido-láticas isoladas de queijos minas artesanais da Serra da Canastra foram tolerantes ao ácido gástrico em pH 2,0 (Costa et al., 2013), pois apresentaram absorvância maior que 0,3.

Tabela 5. Absorvância máxima alcançada, em duas repetições em triplicata, por amostras de *Lactobacillus* spp., isolados de queijos minas artesanais da Serra da Canastra, após três horas de incubação a 37°C em pH 7,0 (controle) e pH 2,0 (ácido gástrico)

Amostra	Absorvância máxima	
	pH 2,0	pH 7,0
<i>L. casei</i> (A1)	0,754	0,768
<i>L. plantarum</i> (A21)	0,584	0,674
<i>L. plantarum</i> (B13)	0,753	0,770
<i>L. plantarum</i> (B17)	0,685	0,579
<i>L. plantarum</i> (B21)	0,632	0,711
<i>L. plantarum</i> (D16)	0,612	0,682
<i>L. rhamnosus</i> (A8)	0,895	0,922

Segundo Dunne et al. (1999), *Lactobacillus* spp. são mais tolerantes a condições ácidas que outras bactérias lácticas. Os resultados da Tab. 6 indicam que as amostras de *Lactobacillus* spp. suportaram o ácido gástrico ao pH 2,0.

Como as bactérias ácido-láticas testadas no presente trabalho foram isoladas de um ambiente em que predomina a acidez, pois em todo o processo de produção de queijos o pH baixo é frequente, era esperado que esses microrganismos fossem adaptados às condições de estresse gerado pela elevada acidez (Resende et al., 2011; Costa et al., 2013).

Resultados similares da sensibilidade *in vitro* ao pH gástrico de bactérias ácido-láticas também foram encontrados por outros autores. Chou e Weimer (1999) relataram tolerância de amostras de *L. acidophilus* ao pH 3,5. Araújo et al. (2009) indicaram que as culturas de *Lactobacillus*

*delbrueckii* UFV H2b20 extraídas de queijo tipo *cottage* exibiram resistência a baixos valores de pH. Costa *et al.* (2013) relataram tolerância ao pH 2,0 por todas as amostras de *Lactobacillus* spp. isoladas de queijos artesanais da Serra da Canastra. Meira (2010) relatou tolerância ao pH 3,0 e ao pH 4,0 de bactérias ácido-lácticas isoladas de leite e queijo de ovelha. Tambekar e Bhutada (2010) observaram *Lactobacillus* spp. tolerantes ao ácido gástrico (pH 2,0). Shruthy *et al.* (2011) verificaram tolerância ao ácido gástrico (pH 3,5) da maioria dos *Lactobacillus* spp. de amostra de coalhada.

Tabela 6. Percentual de inibição por ácido gástrico (pH 2,0), de duas repetições em triplicata, sobre amostras de *Lactobacillus* spp., isolados de queijos minas artesanais da Serra da Canastra, após três horas de incubação a 37°C em ácido gástrico (pH 2,0)

Amostra	Percentual de inibição (%)
<i>L. casei</i> (A1)	-1,55
<i>L. plantarum</i> (A21)	13,49
<i>L. plantarum</i> (B13)	3,58
<i>L. plantarum</i> (B17)	-19,88
<i>L. plantarum</i> (B21)	13,84
<i>L. plantarum</i> (D16)	12,99
<i>L. rhamnosus</i> (A8)	10,92

Considerando-se somente a absorvância máxima alcançada, todas as amostras de *Lactobacillus* spp. isolados de queijos minas artesanais da Serra da Canastra (Tab. 7) foram tolerantes aos sais biliares com 0,3% de *Oxgall* (BD), pois apresentaram absorvância maior que 0,3.

Tabela 7. Absorvância máxima alcançada, em duas repetições em triplicata, por amostras de *Lactobacillus* spp., isolados de queijos minas artesanais da Serra da Canastra, após 12h de incubação a 37°C, na presença de 0,3% de sais biliares

Amostra	Absorvância máxima	
	Sais biliares 0,3%	Controle
<i>L. casei</i> (A1)	1,031	0,905
<i>L. plantarum</i> (A21)	1,057	0,876
<i>L. plantarum</i> (B13)	0,712	0,964
<i>L. plantarum</i> (B17)	1,016	0,836
<i>L. plantarum</i> (B21)	0,977	0,760
<i>L. plantarum</i> (D16)	0,985	0,857
<i>L. rhamnosus</i> (A8)	1,016	1,017

Segundo Gilliland *et al.* (1984), quando a absorvância de 0,3 é atingida por uma bactéria ácido-láctica, após oito horas de incubação em meio adicionado de 0,3% de *Oxgall*, essa pode ser considerada tolerante aos sais biliares.

Como mostra a Tab. 8, todas as amostras de *Lactobacillus* spp. isolados de queijos minas artesanais da Serra da Canastra avaliadas foram tolerantes por apresentarem menos de 40% de inibição ao *Oxgall* (BD) 0,3%.

Tabela 8. Percentual de inibição por sais biliares (*Oxgall*, BD, 0,3%), de duas repetições em triplicata, sobre amostras de *Lactobacillus* spp., isolados de queijos minas artesanais da Serra da Canastra, em 12h de incubação a 37°C

Amostra	Percentual de inibição (%)
<i>L. casei</i> (A1)	2,33
<i>L. plantarum</i> (A21)	-9,51
<i>L. plantarum</i> (B13)	37,61
<i>L. plantarum</i> (B17)	-3,15
<i>L. plantarum</i> (B21)	-11,85
<i>L. plantarum</i> (D16)	-0,04
<i>L. rhamnosus</i> (A8)	14,41

Segundo Acúrcio (2011), uma amostra é considerada tolerante aos sais biliares, *Oxgall* 0,3%, se houver um percentual de inibição menor que 40%.

Resultados similares da sensibilidade *in vitro* de bactérias ácido-lácticas aos sais biliares também foram encontrados por outros autores. Chou e Weimer (1999) mostraram tolerância de amostras de *L. acidophilus* aos sais biliares a 0,2%. Araújo *et al.* (2009) indicaram que culturas *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 extraídas de queijo tipo *cottage* exibiram resistência satisfatória a altas concentrações de sais biliares. Meira (2010) revelou tolerância aos sais biliares a 0,3% de bactérias ácido-lácticas de leite e queijo de ovelha. Tambekar e Bhutada (2010) demonstraram que *Lactobacillus* spp. apresentaram tolerância aos sais biliares a 2%. Shruthy *et al.* (2011) verificaram tolerância aos sais biliares (0,3%) da maioria dos *Lactobacillus* spp. pertencentes à coalhada.

Considerando-se todos os testes *in vitro* realizados para seleção de culturas potencialmente probióticas, percebe-se que houve grande resistência dos *Lactobacillus* spp.

isolados de queijos minas artesanais da Serra da Canastra frente aos antimicrobianos testados. Entretanto, ainda é necessário testar a presença e a capacidade de transmissão dos genes de resistência aos antimicrobianos para uma caracterização probiótica mais completa das bactérias candidatas a probióticos.

A amostra *L. plantarum* (B17) chama atenção, pois foi a única que inibiu a bactéria reveladora patogênica *S. enterica* var. Thyphimurium (Tab. 1); além disso, obteve o menor valor de inibição por ácido gástrico ao pH 2,0 (Tab. 7) e o terceiro menor valor de inibição por sais biliares 0,3% (Tab. 8).

No teste de antagonismo *in vitro* entre amostras de *Lactobacillus* spp. contra bactérias reveladoras, no teste de sensibilidade ao pH gástrico (2,0) e no teste de sensibilidade aos sais biliares (0,3% de *Oxgall*), todos os *Lactobacillus* spp. testados apresentaram comportamento favorável.

Os microrganismos probióticos devem ser resistentes ou tolerantes aos desafios ao longo do trato gastrointestinal, como o pH ácido do estômago e a secreção de sais biliares ao longo do intestino delgado, para que possam persistir e se estabelecer ao longo do trato digestivo, além de apresentarem uma forte atividade antagonista contra bactérias enteropatogênicas.

Nesse sentido, embora todas as amostras de *Lactobacillus* spp. analisadas neste trabalho tenham apresentado capacidade de inibir todas ou quase todas as bactérias patogênicas no teste de antagonismo, bem como boa tolerância aos sais biliares e ao ácido gástrico, a amostra *L. plantarum* (B17) demonstrou ser a bactéria testada que obteve o melhor potencial probiótico; assim, é candidata a compor novas culturas lácticas ou fermentos lácticos a serem utilizados para produção de produtos contendo microrganismos probióticos, de forma a auxiliar na segurança alimentar e na preservação da microbiota original de queijos artesanais de Minas Gerais. No entanto, para que essa amostra seja considerada probiótica, testes *in vivo* ainda são necessários.

## CONCLUSÕES

As amostras de *Lactobacillus* spp. isoladas de queijos minas artesanais da Serra da Canastra atenderam a alguns critérios de seleção *in vitro* de probióticos. Elas apresentaram atividade antagonista *in vitro* contra bactérias de interesse em saúde pública, tolerância ao ácido gástrico e aos sais biliares e sensibilidade a antimicrobianos. De todos os microrganismos analisados neste trabalho, *L. plantarum* (B17) demonstrou melhor potencial probiótico *in vitro*, pois obteve resultados satisfatórios em todas as propriedades avaliadas, embora as outras bactérias avaliadas também tenham apresentado características desejáveis. Os resultados do presente trabalho indicam a possibilidade de as bactérias ácido-lácticas adquirirem resistência a antimicrobianos, o que causa uma grande preocupação, tendo em vista que os genes que conferem resistência podem ser transferidos de uma bactéria a outra. Mais estudos devem ser feitos para confirmar a presença e a capacidade de transmissão dos genes de resistência a antimicrobianos e verificar o potencial dos microrganismos probióticos *in vivo*.

## REFERÊNCIAS

- ACÚRCIO, L.B. *Isolamento, enumeração, identificação molecular e avaliação de propriedades probióticas de Enterococcus isolados de leite de ovelha*. 2011. 79f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- ALEXANDRE, D.P.; SILVA, M.R.; SOUZA, M.R. *et al.* Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo-de-minas artesanal do Serro (MG) frente a microrganismos indicadores. *Arq. Bras. Med.Vet. Zootec.*, v.54, p.424-428, 2002.
- ARAÚJO, E.A.; CARVALHO, A.; LEANDRO, E.S. *et al.* Produção de queijo tipo cottage simbiótico e estudo de sobrevivência das células probióticas quando expostas a diferentes estresses. *Pesq. Agropec. Trop.*, v.39, p.11-118, 2009.
- AZEVEDO, P.A.; PERIN, C.; BECKER, F.L. *et al.* Isolamento e caracterização de *Lactococcus garvieae*. *Rev. AMRIGS*, v.44, p.81-84, 2000.

- BAJA, R. *Programa SAEG 8.1 – Manual do usuário*. Viçosa: Fundação Artur Bernardes, 2004. 114 p.
- BELLETTI, N.; GATTI, M.; BOTTARI, B. *et al.* Antibiotic Resistance of Lactobacilli isolated from two Italian hard cheeses. *Jour. Food Protect.*, v.72, p.2162–2169, 2009.
- CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.; MORELLI, L. *et al.* Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *Jour. Food Protect.*, v.61, p.1636-1643, 1998.
- CHIODA, T.P.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; GARCIA, G.R. *et al.* Inibição do crescimento de *Listeria monocytogenes* em queijo Minas Frescal elaborado com cultura de *Lactobacillus acidophilus*. *Rev. Port. Clin.Vet.*, v.101, p.121-124, 2006.
- CHOU, L.S.; WEIMER, B. Isolation and characterization of acid and bile tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.*, v.82, p.23-31, 1999.
- COSTA, H.H.S.; SOUZA, M.R.; ACURCIO, L.B. *et al.* Potencial probiótico *in vitro* de bactérias ácido-láticas isoladas de queijo-de-minas artesanal da Serra da Canastra, MG. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.65, p.1858-1866, 2013.
- DORES, M.T.; FERREIRA, C.L.L.F. Queijo Minas Artesanal, tradição centenária: ameaças e desafios. *Rev. Bras. Agro.Sust.*, v.2, p.26-34, 2012.
- DUNNE, C.; MURPHY, L.; FLYNN, S. *et al.* Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. *Anton. Van Leeuw.*, v.76, p.279-292, 1999.
- GILLILAND, S.E.; STANLEY, T.E.; BUSH, L.J. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. *Jour. Dairy Sci.*, v.67, p.3045-3051, 1984.
- GUEDES NETO, L.G.; SOUZA, M.R.; NUNES, A.C. *et al.* Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-láticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente amicroorganismos indicadores. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.57, p.245-250, 2005.
- HERREROS, M.A.; SANDOVAL H.; GONZÁLEZ, L. Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goat's milk cheese). *Jour. Food Microbiol.*, v.22, p.455-459, 2005.
- HUMMEL, A.S.; HERTEL, C.; HOLZAPFEL, W.H. *et al.* Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.73, p.730-739, 2007.
- ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. *Microorganisms in food: Characteristics of microbial pathogens*. London: Blackie Acad. Prof., 1998.
- KLARE, I.; KONSTABEL, C.; WERNER, G. *et al.* Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. *Jour. Antimicro. Chemother.*, v.59, p.900–912, 2007.
- KOS, B.; BEGANOVIC, J.; JURASIC, L. *et al.* Coculture-inducible bacteriocin biosynthesis of different probiotic strains by dairy starter culture *Lactococcus lactis*. *Mljekarstvo*, v.61, p.273-282, 2011.
- MEIRA, S.M.M.; HELFER, V.E.; VELHO, R.V. *et al.* Identificação e resistência a barreiras biológicas de bactérias láticas isoladas de leite e queijo de ovelha. *Braz. Jour. Food Technol.*, n.12, p.75-80, 2010.
- NEUMANN, E. *Comportamento “in vitro” de estirpes de Lactobacillus acidophilus sensível e resistente à bacteriocina sob condições do trato digestivo*. 1991. 86f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- QUWEHAND, A.C.; KIRJAVAINEN, P.V.; SHORTT, C. *et al.* Probiotics: Mechanisms and established effects. *Inter. Dairy Jour.*, v.9, p.43-52, 1999.
- RESENDE, M.F.S.; COSTA, H.H.S.; ANDRADE, E.H.P. *et al.* Queijo de minas artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude das queijarias nas populações de bactérias ácido-láticas. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.63, p.1563-1573, 2011.



SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2002. 265p.

SHRUTHY, V.V.; PAVITHRA, M.; GOWRI, S. *et al.* Probiotic potentials among lactic acid bacteria isolated from curd. *Inter. J. Res. Ayurveda Pharm.*, v.2, p.602-609, 2011.

TAGG, J.R.; DAJANI, A.S.; WANNAMAKER, L.W. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bact. Rev.*, v.40, p.722-756, 1976.

TAMBEKAR, D.H.; BHUTADA, S.A. Acid and bile tolerance, antibacterial activity, antibiotic resistance and bacteriocins activity of probiotic *Lactobacillus* species. *Rec. Res. Sci. Technol.*, v.2, p.94-98, 2010.

TEMMERMAN, R.; POT, B.; HUYS, G. *et al.* Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Inter. J. Food Microbiol.*, v.81, p.1-10, 2002.

ZHOU, J.S. Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *Inter. J. Food Microbiol.*, v.98, p.211-217, 2005.