

# DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGÔNICA DE BACTÉRIAS LÁCTICAS FRENTE ÀS LINHAGENS DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS DE DEJETOS RESIDENCIAIS

**Gisele Aparecida Andrade da Sé<sup>1</sup>; Elinalva Maciel Paulo<sup>2</sup>.**

1. Bolsista PROBIC, Graduando em Medicina, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [giseleandrade\\_fsa@hotmail.com](mailto:giseleandrade_fsa@hotmail.com)
2. Orientador, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [elinalvamaciel@yahoo.com.br](mailto:elinalvamaciel@yahoo.com.br)

**PALAVRAS-CHAVE:** bactérias lácticas, *Escherichia coli*, efluentes residenciais.

## INTRODUÇÃO

Os efluentes residenciais albergam uma série de patógenos, sobretudo os provenientes de material fecal; tais efluentes se tornam potenciais fontes/veículos de contaminação, possivelmente existindo grande concentração de cepas de *E. coli* saprófitas e patogênicas. Sendo as últimas causadoras de diarreias. Em relação à etiologia da diarreia; LIMA e DIAS (2010) informam que cerca de 20 a 30% são de origem bacteriana (*Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *E. coli* enteropatogênica e *Clostridium difficile*). Destacando entre estas a *Escherichia coli*, enteropatógeno Gram-negativo da família *Enterobacteriaceae*. A *E. coli* apresenta seis patótipos – *E. coli* enteropatogênica (EPEC), enterohemorrágica (EHEC), enterotoxigênica (ETEC), enteroagregativa (EaggEC), enteroinvasora (EIEC) e de aderência difusa (DAEC). (ALVES, 2009). As EPECs são uma das maiores causas de diarreia em crianças menores de 01 ano.

A terapia oral ou sorológica é fundamental para o controle das gastroenterites, mas também os probióticos são recomendados como tratamento adjuvante, pois reduzem em até 24hs a duração da diarreia. Tendo seu uso classificado de RECOMENDAÇÃO B; ou seja, com estudos e revisão de caso-controle ou estudo de coorte de boa qualidade. (SOCIEDADE BENEFICENTE ISRAELITA BRASILEIRA, 2013). Probiótico vem do grego e significa “para a vida”; hoje conceituado como micro-organismo vivo, que em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro. (DENIPOTE; TRINDADE e BURINI, 2010). Os gêneros de bactérias mais utilizados como probióticos são *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*. Os *Lactobacillus* pertencem ao grupo das bactérias lácticas, fazendo parte da microbiota normal do hospedeiro, conferindo diversos benefícios.

Portanto, diante do exposto, este projeto tem como finalidade confrontar *in vitro* bactérias lácticas com sorotipos de *E. coli* patogênicas isoladas de efluentes residenciais, visando desenvolver em projetos futuros, probióticos para serem administradas em crianças com esta patogenia.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho realizado durante os meses de agosto de 2015 até agosto de 2016, em Feira de Santana. A **COLETA DE AMOSTRA** foi o passo inicial para execução; obtidas de 06 locais na cidade de Feira de Santana.

Tabela 1 - Relação de Locais de Coleta

Amostra 04	Bairro CASEB – Anel de Contorno
Amostra 05	Bairro Queimadinha – Avenida José Falcão
Amostra 06	Bairro Rua Nova – Avenida de Canal
Amostra 07,08,09	Bairro Alto do Papagaio

Cada uma das amostras foi identificadas e transportadas imediatamente em meio Cary-Blair (LEW et al, 1990), sendo refrigeradas para posterior inoculação e conservação.

Para o **ISOLAMENTO DE *ESCHERICHIA COLI* (KONEMAN, 2001)** foram utilizados o caldo EC com tubo de Durham, o Agar Eosina Azul de Metileno (EMB), bem como realização das provas bioquímicas IMViC (**I**NDOLE, **M**ETHYL-RED, **V**OGES-PROSKAUER, **C**ITRATE).

As culturas de prova bioquímica positiva, foram encaminhadas para 02 diferentes processos, a **PRESERVAÇÃO DAS LINHAGENS (PAULO, 2010)** e na **ATIVACÃO** os isolados de *E. coli* foram inoculados no caldo BHI Processo similar de ativação foi feito com 03 diferentes culturas de *Lactobacillus*, rotuladas da seguinte forma:

Tabela 2 – Bactérias lácticas testadas para antagonismo

<i>Lactobacillus paracasei</i>	Disco 01
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Disco 02
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Disco 04

Dando seguimento ao trabalho as amostras identificadas positivamente seguiram para **TESTE DE ANTAGONISMO**. Para avaliar a atividade antagonista das amostras, dois métodos foram utilizados o método de difusão em disco (PAULO, 2001) e a técnica de cultura mista.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Inoculação em Caldo EC/ EMB

As amostras dos 06 diferentes locais foram inoculadas em caldo EC todas as amostras se mostram positivas; com turvação do meio e/ou produção de gás. Posteriormente as amostras foram então inoculadas em meio ágar EMB (Eosin Methylene Blue), um utilizado para isolar e diferenciar bacilos entéricos Gram negativos, por conter corantes eosina e azul-de-metileno e também agir como inibidor das bactérias Gram-positivas. As colônias de *Escherichia coli* podem apresentar reflexo verde metálico e bom crescimento com culturas de grande dimensão. Apresentaram verde metálica as amostras 04, 05, 06,08 e 09. A amostra 07 bom crescimento, mas sem a característica do verde metálico.

### Provas Bioquímicas

#### Prova do Indol

Determinar a capacidade de o organismo degradar triptofano, assim mostraram-se positivas as culturas 04, 05, 06, 07, 08 e 09.

#### Prova do Vermelho de metila

Mostraram-se positivas as amostras 05, 07 e 09; já as amostras 04, 06 e 08 foram negativas. Determina-se a capacidade dos microrganismos em oxidar a glicose com produção e manutenção de concentrações altas de produtos finais ácidos.

#### Prova de Voges-Proskauer

Também efetuada no meio MR - VP (Methyl Red, Voges - Proskauer), determina-se a capacidade do micro-organismo fabricar produtos finais não ácidos ou neutros, como acetilmetilcarbinol. Se formação de cor rosa/vermelha na cultura, 15 minutos após a adição do reagente a prova é positiva. Se não há formação dessa cor a prova é negativa. As culturas negativas foram (04, 05, 06, 07, 08 e 09).

#### Prova da utilização do citrato

Diferencia microrganismos que usem o citrato como única fonte de carbono. A positividade é demonstrada pela presença de crescimento na superfície inclinada e

coloração azul. O que não é visto nas culturas negativas. Todas as culturas mostraram-se negativas (04, 05, 06, 07, 08 e 09).

Assim após realização das provas IMViC; as **amostras 05, 07 e 09** foram as que apresentaram maior compatibilidade com *E. coli*.

### Teste de Antagonismo

Utilizado para determinar a sensibilidade bacteriana in vitro frente a agentes antimicrobianos ou de outras substâncias.

No método de difusão em disco (PAULO, 2010); os halos foram medidos em milímetros com paquímetro. O halo de inibição representa a área sem crescimento detectável a olho nu, estes halos foram comparados com o halo do antibiótico controle. Na **AMOSTRA 05**, o antibiótico com halo de inibição de 14 mm, não houve formação de halo de inibição em nenhum dos *Lactobacillus* rotulados como 04 e 01, mas o *Lactobacillus* rotulado como 02 apresentou discreto halo de inibição de 2 mm. Na **AMOSTRA 07**, nenhum dos *Lactobacillus* mostraram halo de inibição. O disco controle halo de 29 mm. E por fim na **AMOSTRA 09**, também não houve inibição.

Em resumo, no teste de antagonismo em disco apenas no disco 02 (*Lactobacillus plantarum*) houve formação de halo de inibição de 2 mm, que quando comparado com o antibiótico controle, mostra-se não efetivo.



Figura 01 – Teste Antagonismo em Disco – Amostra 05

Já no método de cultura mista, o controle positivo que consistiu no isolado de *E. coli* (AMOSTRA 07), apresentou crescimento; e o controle negativo que consistiu em isolado de *Lactobacillus acidophilus* (04) não apresentou crescimento. Ou seja, na inoculação da mistura (*E. coli* e *Lactobacillus*) em meio Ágar nutriente só poderia haver crescimento de *E. coli*.



Figura 02 – Teste Antagonismo Mistura Mistura 05.1

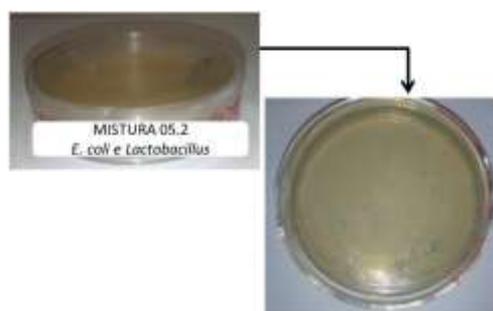


Figura 03 – Teste Antagonismo Mistura Mistura 05.2



Figura 04 – Teste Antagonismo Mistura Mistura 05.4

Dessa forma, a AMOSTRA 05 de *E.coli* mostrou-se sensível às 03 espécies de *Lactobacillus*, tendo em vista que as inoculações de suas misturas não apresentaram crescimento. Em contra partida as AMOSTRAS 07 e AMOSTRAS 09 não apresentaram sensibilidade, pois as inoculações de suas misturas mostram crescimento. Em resumo, a presença de antagonismo nos diferentes métodos e com as diferentes culturas está expresso na tabela abaixo.

Tabela 4 – Resultado Teste Antagonismo

		Antagonismo	
		Positivo	Negativo
Método do Disco	Amostra		
	Amostra 05	+ <i>Lactobacillus plantarum</i>	
	Amostra 07		-
	Amostra 09		-
Método Cultura Mista	Mistura 05.1	+ <i>Lactobacillus paracasei</i>	
	Mistura 05.2	+ <i>Lactobacillus plantarum</i>	
	Mistura 05.4	+ <i>Lactobacillus acidophilus</i>	
	Mistura 07.1/ 07.2/ 07.4		-
	Mistura 09.1/ 09.2/ 09.4		-

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Concluindo os *Lactobacillus* apresentaram antagonismo positivo apenas para AMOSTRA 05 de *E. coli*, o que pode significar diferentes virulências entre as cepas de *E. coli* encontradas nas amostras 05, 07 e 09. Assim, mais estudos *in vitro* necessitam ser realizados para identificação dos possíveis fatores de virulência da *E. coli*, além de teste adicionais de antagonismo dos *Lactobacillus* contra *E.coli* e até mesmo avaliação do sinergismo dos *Lactobacillus* com antibióticos. O que poderia demonstrar a importância do uso de probióticos como terapia adjuvante no tratamento de gastroenterites de etiologia bacteriana por *Escherichia coli*. Com intuito de não apenas repor a microbiota intestinal, mas também atuar como um antagonista do crescimento da *Escherichia coli*.

## REFERÊNCIAS

- DENIPOTE, F.G.; TRINTADE, E.B.S.N.; BURINI, R.C. Probióticos e prebióticos na atenção primária ao câncer de cólon. *Arquivo de Gastroenterologia*. São Paulo, vol.47, n.1, pp.93-98, jan-mar 2010.
- KONEMAN, E. W., ALLEN, S. D., JANDA, W. M., SCHRECKENBERGER, P. C., WINN, W. C. *Diagnóstico Microbiológico*. 6ª. Edição. Editora Guanabara Koogan. 2008.
- LABORCLIN PRODUTOS PARA LABORATÓRIOS LTDA. *Manual para Antibiograma*. Acesso: 29 jul de 2016. Disponível em: <[http://www.interlabdist.com.br/dados/noticias/pdf\\_190.pdf](http://www.interlabdist.com.br/dados/noticias/pdf_190.pdf)>
- LIMA, R. M.; DIAS, J. A. Gastroenterite Aguda. *Nascer e Crescer Revista do Hospital de Crianças Maria Pia*. (?) vol.19, n.2, pp.85-90, 2010.
- MURRAY, P. R ROSENTHAL, K. S., PFALLER, M. A. *Microbiologia Médica* / Patrick R. Murray,; [tradução Carlos Pelleschi Taborda... et al.]. – Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.
- PAULO, E. M. 2010. *Produção de exopolissacarídeos (EPS) por bactérias lácticas visando microencapsulação de Lactobacillus acidophilus La-5 pelo processo de Spray drying*. 2010. Tese 212f. (Doutorado em Biotecnologia), Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.
- SOCIEDADE BENEFICENTE ISRAELITA BRASILEIRA. *Diarreia aguda em crianças e adolescentes – Diretrizes para o diagnóstico e tratamento*. 2013.