

Utilização de diferentes meios de cultura na identificação e recuperação de bactérias lácticas

Recovery and identification of lactic acid bacteria using different culture media

Maria Eduarda Potes*¹, A. A. Marinho

¹Instituto de Ciências Agrárias Mediterrânicas (ICAM), Departamento de Sanidade Animal e Vegetal, Universidade de Évora, Apto 94, 7002-554 Évora, Portugal

Resumo: Foram isoladas várias colónias bacterianas provenientes de amostras de queijo em duas fases de maturação (3 e 45 dias) inoculadas nos meios de cultura de de Man, Rogosa e Sharpe Agar (MRSA), M17 Agar, Canamicina Esculina Azida Agar (KA₃), APT Agar e Dextrose Triptona Agar (DTA). Com base nas suas características culturais, morfológicas e bioquímicas foram identificados os diferentes géneros de bactérias lácticas (BAL).

Uma pequena percentagem (13,96%) dos isolados revelou não ser BAL. O meio KA₃ permitiu o crescimento quase exclusivo de *Enterococcus*. No meio MRSA, além de *Lactobacillus*, cresceram também *Enterococcus* e algumas não BAL, provenientes principalmente de amostras com 3 dias de maturação. O meio M17, onde cresceu a maior parte de *Lactococcus* provenientes, principalmente, de queijos com 3 dias de maturação, foi também aquele que permitiu o crescimento de maior número de não BAL. O meio DTA foi o que revelou menor selectividade, permitindo o crescimento de vários géneros de BAL provenientes das diferentes amostras, podendo a sua selectividade ser alterada por diferentes condições de incubação, como a temperatura. O meio APT, moderadamente selectivo, permitiu a proliferação de *Enterococcus* e de *Lactobacillus* em números apreciáveis.

Dos diferentes meios avaliados, o meio KA₃ foi o mais eficaz no isolamento de *Enterococcus*. O meio MRSA, mesmo permitindo o crescimento de algumas não BAL, foi útil para o isolamento de *Lactobacillus*. Apesar de o meio M17 ter consentido o crescimento de muitas não BAL, revelou-se o mais eficaz para o isolamento de *Lactococcus*.

Summary: Cheese samples from two stages of maturation (3 and 45 days) were inoculated in five different culture media, namely, de Man, Rogosa & Sharpe Agar (MRSA), M17 Agar, Kanamycin Esculine Azide Agar (KA₃), APT and Dextrose Tryptone Agar (DTA). Several colonies were identified according to their cultural, morphological and biochemical characteristic features, to discriminate different genus of lactic acid bacteria (LAB).

A small percentage (13.96%) of isolated colonies were non-LAB. In KA₃ medium, *Enterococcus* was found exclusively. In MRSA medium, besides *Lactobacillus*, *Enterococcus* and some non-LAB were also found, mainly among colonies isolated from

3 days cheese. The highest number of *Lactococcus*, mainly those collected from 3 days cheeses, and non-LAB strains were recovered from M17 medium. DTA medium was the less selective, allowing the growth of several LAB genera isolated from different samples. However, its selective capacity could be improved using different incubation conditions, like temperature. APT medium, weakly selective, allowed the growth of *Enterococcus* and *Lactobacillus* in high numbers.

We may conclude that KA₃ medium was the most efficient regarding *Enterococcus* isolation. MRSA medium, in spite of allowing the growth of some non-LAB, was useful for the isolation of *Lactobacillus*. M17 medium, regardless the growth of many non-LAB, showed to be the best of the tested media for the isolation of *Lactococcus*.

Introdução

É possível conhecermos os microrganismos presentes em diferentes habitats simulando, no laboratório, as condições em que se desenvolvem naturalmente. As suas necessidades nutricionais são asseguradas pela utilização de meios de cultura e o crescimento microbiano é facilitado pelas condições ambientais que lhes são proporcionadas, nomeadamente, temperatura e tensão de oxigénio. Para se poderem distinguir os diferentes microrganismos presentes em populações mistas, são usados meios de cultura selectivos que promovem o crescimento de determinados microrganismos, inibindo o de outros, e que são incubados sob as condições de temperatura e disponibilidade de oxigénio mais vantajosas para os microrganismos em causa.

A flora láctica é constituída por um grupo heterogéneo de bactérias, com diferentes necessidades fisiológicas, que inclui espécies pertencentes a vários géneros, entre os quais, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella* e *Lactobacillus*. Têm em comum serem Gram positivas, catalase negativas, não esporuladas, anaeróbias facultativas, adaptadas a ambientes ricos em nutrientes e produzirem

*Correspondência: mep@uevora.pt
Tel: +351 266740800, ext. 4587

ácido láctico como principal produto da fermentação dos glúcidos (Axelsson, 1993).

Devido às suas diversas exigências nutricionais, para detectar, isolar e identificar os diferentes géneros que constituem este grupo microbiano, têm sido usados variados meios de cultura que, geralmente, são ricos em nutrientes, possibilitando o crescimento de uma grande variedade de microrganismos. Este aspecto é especialmente evidente quando são inoculadas amostras muito contaminadas, verificando-se o crescimento de outros microrganismos que não são bactérias lácticas.

A utilização de inibidores nos meios de cultura nem sempre é suficientemente eficaz para impedir o crescimento de bactérias não lácticas. Por outro lado, as bactérias lácticas podem não ser todas elas tolerantes aos inibidores utilizados nos meios de cultura. Assim, torna-se, por vezes, difícil avaliar a composição da flora láctica de um alimento e detectar os diferentes microrganismos presentes, utilizando quer meios de cultura quer condições de incubação selectivos.

Assumindo que não existe um método único que satisfaça completamente todos os requisitos necessários para o isolamento, caracterização e identificação de microrganismos (Domig *et al.*, 2003), foi objectivo deste trabalho comparar a selectividade de diferentes meios de cultura utilizados no estudo da composição da flora láctica presente no queijo de Évora.

Material e métodos

Foram recolhidas amostras de queijo com 3 e 45 dias de maturação, em triplicado, em três dias consecutivos e transportadas para o laboratório imediatamente após colheita, em ambiente refrigerado.

De cada amostra, retiraram-se 10 g da massa do queijo que foram homogeneizados com 90 ml de Solução de Ringer a _ (Oxoid). A partir destas suspensões fizeram-se as diluições decimais sucessivas consideradas necessárias, também em Solução de Ringer a _ (Oxoid).

Foi feita a sementeira por incorporação, em quadruplicado, de cada uma das três diluições escolhidas, em Canamicina Esculina Azida Agar (KA₃) (Oxoid) para crescimento de *Enterococcus*; em de Man, Rogosa e Sharpe Agar (MRSA) (Oxoid) para crescimento de lactobacilos; em APT Agar (Difco) para crescimento de lactobacilos heterofermentativos e outros microrganismos exigentes; em M17 Agar (Oxoid), para crescimento de *Lactococcus*; em Dextrose Triptona Agar (DTA) (Oxoid) para crescimento de microrganismos termófilos e mesófilos de origem alimentar. Neste último foram, ainda, inoculadas mais três placas por diluição (DTA-F), destinadas a incubação a temperatura de refrigeração.

De cada meio inoculado e de cada diluição foram

incubadas três placas em condições de aerobiose e uma placa foi incubada em jarra de anaerobiose (Merck Mikrobiologie) com sistema de anaerobiose AnaerocultA (Merck Mikrobiologie). As placas com meio DTA-F apenas foram incubadas em condições de aerobiose.

Após um período de incubação de 48 horas a 30 °C para todos os meios, excepto para o meio KA₃ que foi incubado a 37 °C e o meio DTA-F que foi incubado a 10 °C durante 7 dias, foi feita a contagem das unidades formadoras de colónias (ufc).

De todos os meios semeados foram repicados 1% ou 10% das colónias de cada placa cuja contagem era, respectivamente, superior a 100 ufc ou inferior ou igual a 100 ufc, para caldo de MRS e para MRSA e incubadas a 30 °C durante 24 horas ou, caso não fosse observado crescimento, durante 48 horas.

A partir de todas as culturas que cresceram em caldo MRS foram feitos esfregaços corados pelo método de Gram. Todas as culturas que cresceram em MRSA foram sujeitas à prova da catalase (por aplicação de peróxido de hidrogénio a 30 volumes sobre uma colónia colocada numa lâmina de microscopia). As que se encontravam em cultura pura e eram Gram positivas e catalase negativas foram semeadas em caldo de MRS com 50% de glicerol (v/v) e, após incubação a 30°C durante 24 horas, foram congeladas para análise posterior.

Após descongelação, foram apreciadas as seguintes características: tipo fermentativo (crescimento em caldo de MRS, com tubo de Durham invertido, a 30 °C durante 48 horas), crescimento a 10 °C durante 7 dias e a 45 °C durante 48 horas; tolerância ao sal (crescimento em caldo de MRS com 6,5% de NaCl); grupo serológico [através de Streptococcal Grouping Kit (Oxoid)]; isómero do ácido láctico produzido a partir de glucose (por determinação enzimática utilizando D-Lactic acid/L-Lactic acid (Boehringer Mannheim), segundo o procedimento indicado pelo fabricante, em caldo de MRS sem acetato de sódio).

A identificação das bactérias lácticas presentes foi feita com base nas chaves de classificação de Garvie (1986a; b); Kandler e Weiss (1986); Mundt (1986); Schleifer (1987); Devriese *et al.* (1991), (1993); Axelsson (1993); Collins *et al.* (1993) e Holt *et al.* (1994).

Resultados e discussão

A partir dos diferentes meios de cultura utilizados foram isoladas 666 estirpes microbianas. Assumindo que, entre outras características, as bactérias lácticas são microrganismos Gram positivos, catalase negativos e não esporulados, constatámos que 93 estirpes (13,96%) não eram bactérias lácticas, sendo a maior parte proveniente de queijos com 3 dias de maturação (77 estirpes, ou seja, 21,57% das estirpes isoladas)

(Quadro 1). Entre as estirpes não lácticas predominavam as bactérias Gram negativas que, provavelmente, encontraram nos queijos com 3 dias de maturação, condições mais favoráveis ao seu desenvolvimento do que em queijos com 45 dias de maturação.

Quadro 1 - Classificação das colônias isoladas de queijos com 3 e 45 dias de maturação.

	3 dias	45 dias	Total
Isoladas	357	309	666
Bactérias não lácticas	77 (21,57%)	16 (5,18%)	93 (13,96%)
Bactérias lácticas	280 (78,43%)	293 (94,82%)	573 (86,04%)

Os Quadros 2 e 3 mostram o número de microrganismos isolados, utilizando diferentes meios de cultura e em condições de aerobiose e de anaerobiose, respectivamente.

Verificamos que o meio KA₃ foi, de todos os meios utilizados, o que permitiu o crescimento quase exclusivo de bactérias lácticas (96,2% e 95,8% em aerobiose e em anaerobiose, respectivamente). Este meio de cultura contém, como principais agentes selectivos,

o antibiótico canamicina associado a azida de sódio. Quase todas as bactérias lácticas são resistentes à canamicina (Mathur e Singh, 2005), nomeadamente *Enterococcus* spp (Franz *et al.*, 1999) e *Lactobacillus* spp (Danielsen e Wind, 2003) e, portanto, conseguem sobreviver em meios onde está presente este antibiótico. Por outro lado, a principal acção da azida de sódio consiste na inibição de alguns sistemas enzimáticos de transporte de electrões como a catalase e a citocromo c oxidase (Domig *et al.*, 2003). Sendo característica das bactérias lácticas a ausência destes sistemas (Axelsson, 1993), o seu crescimento não é afectado pela presença, nos meios de cultura, destes compostos que conseguem ser eficazes na eliminação de muitas bactérias aeróbias.

O meio MRSA também mostrou alguma eficácia inibindo outros tipos de microrganismos, que não sejam bactérias lácticas (Quadro 2 e 3). O citrato de amónio e o acetato de sódio presentes neste meio de cultura inibem o desenvolvimento da maior parte dos contaminantes. Como foi demonstrado por Lee *et al.* (2002), estes dois sais de ácidos orgânicos têm actividades antibacterianas diferentes, verificando-se que o

Quadro 2 - Distribuição das estirpes isoladas pelos diferentes meios de cultura, em condições de aerobiose, provenientes de queijos com 3 e 45 dias de maturação. (nº e percentagem de colônias).

aerobiose	KA ₃		MRSA		APT		M17		DTA		DTA-F	
Isoladas	105		99		111		91		120		34	
Não BAL	4 3,8%		10 10%		16 14,4%		24 26,4%		20 16,7%		4 11,8%	
BAL	101 96,2%		89 90%		95 85,6%		67 73,6%		100 83,3%		30 88,2%	
Fase de maturação	3 dias	45 dias	3 dias	45 dias	3 dias	45 dias	3 dias	45 dias	3 dias	45 dias	3 dias	45 dias
Isoladas	70	35	50	49	51	60	37	54	81	39	19	15
Não BAL	3 4,3%	1 2,9%	8 16,0%	2 4,0%	11 21,6%	5 8,3%	19 51,4%	5 9,3%	19 23,5%	1 2,6%	3 15,8%	1 6,7%
BAL	67 95,7%	34 97,1%	42 84%	47 96%	40 78,4%	55 91,7%	18 48,6%	49 90,7%	62 76,5%	38 97,4%	16 84,2%	14 93,3%

BAL Bactérias lácticas; KA₃ Canamicina, esclulina, azida de sódio Agar; MRSA De Man, Rogosa e Sharpe Agar; DTA Dextrose Triptona Agar; DTA-F Dextrose Triptona Agar incubado a 10 °C durante 7 dias.

Quadro 3 - Distribuição das estirpes isoladas pelos diferentes meios de cultura, em condições de anaerobiose, provenientes de queijos com 3 e 45 dias de maturação. (nº e percentagem de colônias)

anaerobiose	KA ₃		MRSA		APT		M17		DTA	
Isoladas	24		19		17		26		20	
Não BAL	1 4,2%		2 10,5%		3 17,6%		6 23%		3 15%	
BAL	23 95,8%		17 89,5%		14 82,4%		20 77%		17 85%	
Fase maturação	3 dias	45 dias	3 dias	45 dias	3 dias	45 dias	3 dias	45 dias	3 dias	45 dias
Isoladas	9	15	10	9	10	7	12	14	8	12
Não BAL	1 11,1%	0	2 20%	0	3 30%	0	5 41,7%	1 7,1%	3 37,5%	0
BAL	8 88,9%	15 100%	8 80%	9 100%	7 70%	7 100%	7 58,3%	13 92,9%	5 62,5%	12 100%

BAL Bactérias Lácticas; KA₃ Canamicina, esclulina, azida de sódio Agar; MRSA De Man, Rogosa e Sharpe Agar; DTA Dextrose Triptona Agar; DTA-F Dextrose Triptona Agar incubado a 10 °C durante 7 dias.

citrato afecta predominantemente os microrganismos Gram positivos enquanto que o acetato atinge principalmente os Gram negativos.

Por outro lado, o meio M17 foi aquele em que cresceu uma percentagem mais baixa de bactérias lácticas, quer em aerobiose (73,6%) quer em anaerobiose (77%), observando-se que os outros meios de cultura revelaram uma selectividade intermédia, relativamente ao crescimento deste grupo bacteriano. Vários autores (Poulet *et al.*, 1993; Tornadizo *et al.*, 1995; Freitas *et al.*, 1996) consideram o meio M17 moderadamente selectivo, permitindo o crescimento de outras bactérias, que não apenas as lácticas, provavelmente em consequência da sua riqueza em nutrientes e da ausência de substâncias inibidoras.

Pela observação do Quadro 2, podemos verificar que se formou um menor número de colónias quando o meio DTA foi incubado à temperatura de 10 °C (DTA-F), comparando com o mesmo meio submetido à temperatura de incubação de 30 °C. Sendo um meio de cultura indicado para o crescimento de microrganismos mesófilos e termófilos, verificámos que a temperatura de incubação pode ter exercido algum efeito selectivo relativamente à flora contaminante que poderá estar presente nestas amostras, na medida em que a percentagem de BAL que cresceu em DTA-F (88,2%) foi superior à que cresceu no meio DTA (83,3%).

Nos meios DTA e APT proliferou uma percentagem relativamente elevada de bactérias não lácticas isoladas de amostras de queijo com 3 dias de maturação, quer em aerobiose quer em anaerobiose, traduzindo a menor selectividade destes meios em comparação com os meios KA₃ e MRSA.

As 573 estirpes de bactérias lácticas isoladas, provenientes de amostras de queijo com 3 e 45 dias de maturação (280 e 293 estirpes, respectivamente), foram avaliadas com a intenção de as classificar quanto ao género. O Quadro 4 mostra a sua distribuição por alguns dos diferentes géneros que constituem este grupo microbiano.

Não foi possível classificar 67 estirpes (11,7%). Das restantes 506 estirpes (247 de amostras de queijo com 3 dias de maturação e 259 de amostras de queijo com 45 dias de maturação), a maior parte (400 estirpes

correspondendo a 69,8% das bactérias lácticas isoladas) foi classificada como pertencente ao género *Enterococcus* (Quadro 4). Esta classificação teve como critério o facto de se tratarem de cocos Gram positivos, não esporulados, catalase negativos, homofermentativos, produzirem predominantemente ácido L-láctico, com capacidade de crescimento a 10 °C, 45 °C e a 6,5% de NaCl e pertencerem ao grupo D de Lancefield (Mundt, 1986; Axelsson, 1993; Devriese *et al.*, 1993; Holt *et al.*, 1994; Leclerc *et al.*, 1996; Cogan *et al.*, 1997; Flahaut *et al.*, 1997)

O segundo género mais abundante foi *Lactobacillus* (69 estirpes), sendo 30 estirpes (10,7%) isoladas de amostras de queijo com 3 dias de maturação e 39 (13,3%) originárias de queijos com 45 dias de maturação. São bacilos Gram positivos, não esporulados, catalase negativos e imóveis e com grande variabilidade metabólica (Kandler e Weiss 1986; Schleifer, 1987; Gürakan *et al.*, 1995; Gancel *et al.*, 1997).

Seguiram-se *Lactococcus* sp. (16 estirpes, sendo 13 (4,6%) provenientes de queijos com 3 dias de maturação e 3 (1%) oriundas de queijos com 45 dias de maturação), que são cocos Gram positivos, catalase negativos, homofermentativos, produtores de ácido L-láctico, com crescimento a 10 °C mas não a 45 °C, nem em presença de 6,5% de NaCl (Mundt, 1986; Schleifer, 1987; Axelsson, 1993; Holt *et al.*, 1994).

Relativamente aos outros três géneros incluídos no grupo das bactérias lácticas, *Pediococcus*, *Leuconostoc* e *Weissella*, a sua expressão foi reduzida em ambas as fases de maturação consideradas (cerca de 1,2% para cada género) (Quadro 4).

A principal característica do género *Pediococcus* é a sua formação em tétradas, pares ou cadeias curtas. Além disso, são cocos Gram positivos, catalase negativos, homofermentativos, produtores de ácido DL- ou L-láctico, com temperaturas de crescimento óptimas entre 25 °C e 40 °C, podendo algumas espécies crescer a 10 °C ou a 45 °C (Garvie, 1986a; Bhowmik e Marth, 1990; Axelsson, 1993; Holt *et al.*, 1994).

O género *Leuconostoc* é constituído por microrganismos Gram positivos, de forma cocoide irregular, heterofermentativos, que produzem predominantemente ácido D-láctico a partir da glucose, crescem a 10 °C mas não a 45 °C e não hidrolisam a arginina

Quadro 4 - Distribuição por géneros das estirpes de bactérias lácticas isoladas de queijos, nas duas fases de maturação consideradas (3 e 45 dias). (nº e percentagem de colónias)

Géneros	Queijo com 3 dias de maturação	Queijo com 45 dias de maturação	Total
Isoladas	280	293	573
Identificadas	247 (88,2%)	259 (88,4%)	506 (88,3%)
<i>Enterococcus</i>	194 (69,3%)	206 (70,3%)	400 (69,8%)
<i>Lactobacillus</i>	30 (10,7%)	39 (13,3%)	69 (12%)
<i>Lactococcus</i>	13 (4,6%)	3 (1,0%)	16 (2,8%)
<i>Pediococcus</i>	3 (1,1%)	4 (1,4%)	7 (1,25%)
<i>Leuconostoc</i>	3 (1,1%)	4 (1,4%)	7 (1,25%)
<i>Weissella</i>	4 (1,4%)	3 (1,0%)	7 (1,2%)

(Garvie, 1986b; Axelsson, 1993; Holt *et al.*, 1994; Thunell, 1995).

O género *Weissella* é constituído por microrganismos Gram positivos, catalase negativos, de forma cocoide ou de bacilo pequeno, com extremidades arredondadas, simples, em pares ou formando pequenas cadeias, heterofermentativos, geralmente produtores de ácido DL-láctico (excepto *W. paramesenteroides* e *W. hellenica*, que produzem ácido D-láctico) com crescimento a 10 °C mas não a 45 °C (Collins *et al.*, 1993).

Os Quadros 5 e 6 mostram a frequência com que os vários géneros de bactérias lácticas provenientes de queijos com 3 e 45 dias de maturação, respectivamente, foram isolados a partir dos diferentes meios de cultura utilizados.

O género *Enterococcus* foi isolado a partir de todos os meios de cultura utilizados e em todas as condições de incubação (aerobiose e anaerobiose), devido não só à sua abundância nas amostras analisadas, mas também pelo facto de nenhum destes meios se mostrar totalmente selectivo relativamente a estes microrganismos,

tal como foi constatado por Pouillet *et al.* (1993), Tornadijo *et al.* (1995) e López-Díaz *et al.* (2000).

Por outro lado, o meio KA₃ é considerado como bastante selectivo, permitindo, quase exclusivamente, o crescimento de enterococos e inibindo o desenvolvimento de bactérias Gram negativas e de algumas bactérias lácticas, incluindo os lactobacilos (Benkerroum *et al.*, 1993; Tornadijo *et al.*, 1995; Flahaut *et al.*, 1997; López-Díaz *et al.*, 2000). No entanto, Weiss *et al.* (2005) verificaram que este meio permite também o crescimento de algumas estirpes de lactobacilos e de pediococos, propondo a utilização de um meio de BÍlis Esculina Azida (BEA) para o controlo oficial dos enterococos probióticos autorizados como aditivos alimentares.

O género *Lactobacillus* foi predominantemente isolado a partir do meio MRSA, quer em condições de aerobiose quer em anaerobiose, embora também tenha sido frequente o seu isolamento a partir do meio APT, principalmente em amostras com 45 dias de maturação (Quadro 6). Apesar do meio MRSA ter sido

Quadro 5 - Distribuição dos diferentes géneros de bactérias lácticas provenientes de queijos com 3 dias de maturação, pelos diferentes meios de cultura utilizados para o seu isolamento.

	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Weissella</i>	NI	Total
MRSA	24	15				1	2	40
M17	10		6	1		1	2	20
KA ₃	53						14	67
DTA	47	2	2	2	2	1	6	62
APT	30	6					4	40
DTA-F	12	1			1		2	16
MRSA-A	1	5					2	8
M17-A	1		4			1	1	7
KA ₃ -A	7						1	8
APT-A	5	1					1	7
DTA-A	4		1					5
TOTAL	194	30	13	3	3	4	33	280

MRSA De Man, Rogosa e Sharpe Agar; KA₃ Canamicina Esculina Azida de Sódio Agar;

DTA Dextrose Triptona Agar; DTA-F Dextrose Triptona Agar incubado a 10 °C durante 7 dias; NI Não Identificadas. O sufixo-A significa que os respectivos meios foram incubados em condições de anaerobiose.

Quadro 6 - Distribuição dos diferentes géneros de bactérias lácticas provenientes de queijos com 45 dias de maturação, pelos diferentes meios de cultura utilizados para o seu isolamento.

	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Weissella</i>	NI	Total
MRSA	25	14			2		6	47
M17	38	4	1			1	6	50
KA ₃	31						3	34
DTA	32	2			1		3	38
APT	33	13		1			8	55
DTA-F	6	1		1	1	2	3	14
MRSA-A	6	2					1	9
M17-A	7	1	2				2	12
KA ₃ -A	15							15
APT-A	4	1					2	7
DTA-A	9	1		2				12
TOTAL	206	39	3	4	4	3	34	293

MRSA De Man, Rogosa e Sharpe Agar; KA₃ Canamicina Esculina Azida de Sódio Agar;

DTA Dextrose Triptona Agar; DTA-F Dextrose Triptona Agar incubado a 10 °C durante 7 dias; NI Não Identificadas. O sufixo-A significa que foram incubadas em condições de anaerobiose.

desenhado com o intuito de facilitar o crescimento de *Lactobacillus* spp (de Man *et al.*, 1960) e ainda actualmente ser considerado como especialmente adequado ao crescimento de *Lactobacillus* (Thamaraj e Shah, 2003), o meio APT também pode ser usado para o isolamento de lactobacilos, nomeadamente lactobacilos heterofermentativos e outros requerendo elevados teores de tiamina (BD, 2003).

Provavelmente, a enorme variabilidade metabólica que caracteriza as diferentes espécies pertencentes ao género *Lactobacillus* permite o seu crescimento em diversos substratos. Birollo *et al.* (2000), comparando a adequação de três meios de cultura, MRSA, M17 Agar e Skim Milk Agar, para contagens de bactérias lácticas presentes em iogurte concluíram que as contagens obtidas em MRSA eram significativamente inferiores às obtidas em Skim Milk Agar, sugerindo a utilização deste meio em vez de MRSA e M-17. Tal como refere Roy (2001), relativamente às bifidobactérias, não existe um meio padrão para a detecção destes microrganismos, sendo preferível a utilização de substratos que satisfaçam as necessidades da maior parte dos microrganismos que se sabe estarem presentes. Por outro lado, também deve ser considerada a origem das estirpes isoladas (Domig *et al.*, 2003) pelo que com o mesmo meio de cultura podemos obter resultados variáveis dependendo do alimento analisado.

O género *Lactococcus*, proveniente principalmente de amostras de queijo com 3 dias de maturação, foi isolado a partir do meio M17, considerado o mais apropriado para o isolamento de bactérias pertencentes a este género (Tornadijo *et al.*, 1995; Corroller *et al.*, 1998; Lopez Diaz *et al.*, 2000), provavelmente devido à sua riqueza em nutrientes essenciais para o crescimento destes microrganismos que têm acentuadas deficiências em várias vias bio-sintéticas (vanNiel e Hahn-Hägerdal, 1999).

Relativamente aos outros três géneros também encontrados (*Pediococcus*, *Leuconostoc* e *Weissella*), embora em menor número, distribuíram-se pelos meios MRSA, M17 e DTA.

Conclusões

Em consequência da grande heterogeneidade metabólica que caracteriza quase todos os géneros bacterianos que constituem o grande grupo das bactérias lácticas, é difícil estabelecer meios de cultura padrão e únicos que sejam adequados ao crescimento selectivo de cada género. Segundo Domig *et al.*, (2003) esta dificuldade é ainda acentuada se considerarmos as diferentes matrizes de origem da amostra e a microflora contaminante.

No entanto, relativamente aos meios de cultura utilizados no isolamento das estirpes de bactérias lácticas provenientes de queijo, constatámos que o meio KA₃ foi o que revelou maior selectividade. Além de ter evi-

denciado o crescimento de uma reduzida percentagem de bactérias não lácticas, permitiu, exclusivamente, o isolamento de enterococos. Estes microrganismos, resistentes à canamicina, sobreviveram neste meio de cultura ao contrário de outros géneros de microrganismos sensíveis. Aliás, os enterococos cresceram em todos os meios de cultura utilizados, provavelmente devido à sua capacidade de adaptação a condições de crescimento menos favoráveis. Mesmo que nos meios de cultura utilizados se desenvolvam condições de crescimento desfavoráveis, como por exemplo maior acidez, os enterococos têm capacidade para sobreviver uma vez que toleram valores de pH 4,4 (Axelsson, 1993).

Os meios MRSA e APT revelaram uma selectividade moderada, permitindo ambos o crescimento de algumas bactérias não lácticas, tendo também sido possível isolar a partir destes meios o maior número de enterococos e de lactobacilos presentes nas amostras. Quanto aos meios M17 e DTA foram os que se mostraram menos selectivos, ao permitir o desenvolvimento quer de uma percentagem elevada de bactérias não lácticas quer de quase todos os géneros de bactérias lácticas detectados. Contudo, foram os únicos que permitiram o crescimento de lactococos, sendo por isso úteis para esta finalidade.

Bibliografia

- Axelsson LT (1993). Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In "Lactic Acid Bacteria". Ed. S. Salminen, A. von Wright. Marcel Dekker Inc., 1-63.
- BD (2003). Manual of Microbiological Culture Media. Difco & BBL Manual. Becton, Dickinson and Company.
- Benkerroum N, Misbah M, Sandine WE, Elaraki AT (1993). Development and use of a selective medium for isolation of *Leuconostoc* spp. from vegetables and dairy products. Appl. Environm. Microbiol., 59, 607-609.
- Bhowmik T e Marth EH (1990). Role of *Micrococcus* and *Pediococcus* in Cheese Ripening: A Review. J. Dairy Sci., 73, 859-866.
- Birollo GA, Reinheimer JA, Vinderola CG (2000). Viability of lactic acid microflora in different types of yoghurt. Food Res. Int., 33, 799-805.
- Cogan TM, Barbosa M, Beuvier E, Bianchi-Salvadori B, Cocconcelli PS, Fernandes I, Gomez J, Kalantzopoulos G, Ledda A, Medina M, Rea MC, Rodriguez E (1997). Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. J. Dairy Res., 64, 409-421.
- Collins MD, Samelis J, Metaxopoulos J, Wallbanks S (1993). Taxonomic studies on some *Leuconostoc*-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. J. Appl. Bact., 75, 595-603.
- Corroller D, Mangin, I, Desmaures N, Gueguen M (1998). An ecological study of lactococci isolated from raw milk in the Camembert cheese registered designation of origin area. Appl. Environ. Microbiol., 64, 4729-4735.
- Danielsen M e Wind A (2003). Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. Int. J. Food Microbiol., 82, 1-11.

- Devriese LA, Collins MD, Wirth R (1991). The Genus *Enterococcus*. In "The Prokaryotes. A Handbook on the biology of bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications". 2nd Ed. Ed A. Balows, H.G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, K.H. Schleifer, 2(66), 1465-1481.
- Devriese LA, Pot B, Collins MD (1993). Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species group. *J. Appl. Bact.*, 75, 399-408.
- deMan JC, Rogosa M, Sharpe ME (1960). A Medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bact.*, 23, 130-135.
- Domig KJ, Mayer HK, Kneifel W (2003). Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* spp. I – Media for isolation and enumeration. *Int. J. Food Microbiol.*, 88, 147-164.
- Flahaut S, Boutibonnes P, Auffray Y (1997). Les Entérocoques dans L'Environnement Proche de L'Homme. *Can. J. Microbiol.*, 43, 699-708.
- Franz CMAP, Holzappel WH, Stiles ME (1999). Enterococci at the crossroads of food safety. *Int. J. Food Microbiol.*, 47, 1-47.
- Freitas AC, Pais C, Malcata FX, Hogg TA (1996). Microbiological characterization of Picante da Beira Baixa Cheese. *J. Food Protect.*, 59, 155-160.
- Gancel F, Dzierzinski F, Tailliez R (1997). Identification and Characterization of *Lactobacillus* Species Isolated from Fillets of Vacuum-packed Smoked and Salted Herring (*Clupea harengus*). *J. Appl. Bact.*, 82, 722-728.
- Garvie EI (1986a). Genus *Pediococcus*. In "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology". Vol 2 - Section 12 - Gram-Positive Cocci. Ed. N.R. Krieg, J.G. Holt. Williams & Wilkins, 1075-1079.
- Garvie EI (1986b). Genus *Leuconostoc*. In "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology". Vol 2 - Section 12 - Gram-Positive Cocci. Ed. N.R. Krieg, J.G. Holt. Williams & Wilkins, 1071-1075.
- Gürakan GC, Bozoglu TF, Weiss N (1995). Identification of *Lactobacillus* strains from Turkish-style dry fermented sausages. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.*, 28, 139-144.
- Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST (1994). Group 17 – Gram-positive cocci. In "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", 9th Edition. Ed. By Hensyl, W.R. Williams and Wilkins, USA, 527-558.
- Kandler O e Weiss N (1986). Genus *Lactobacillus*. In "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology". Vol 2 - Section 14 - Regular, Nonsporing Gram-Positive Rods, Ed. N.R. Krieg, J.G. Holt. Williams & Wilkins, 1209-1234.
- Leclerc H, Devriese LA, Mossel DAA (1996). Taxonomical changes in intestinal (faecal) enterococci and streptococci: Consequences on their uses as indicators of faecal contamination in drinking water. *J. Appl. Bact.*, 81, 459-466.
- Lee Y-L, Cesario T, Owens J, Shanbrom E, Thrupp LD (2002). Antibacterial activity of citrate and acetate. *Nutr.*, 18, 665-666.
- López-Díaz TM, Alonso C, García-López ML, Moreno B (2000). Lactic acid bacteria isolated from a hand-made blue cheese. *Food Microbiol.*, 17, 23-32.
- Mathur S e Singh R (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria – a review. *Int.J.Food Microbiol.*, 105, 281-295.
- Mundt JO (1986). Enterococci. In "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology". Vol 2 - Section 12 - Gram-Positive Cocci, Ed. N.R. Krieg, J.G. Holt. Williams & Wilkins, 1063-1065.
- Poullet B, Huertas M, Sánchez A, Cáceres P, Larriba G (1993). Main lactic acid bacteria isolated during ripening of César de Cáceres cheese. *J. Dairy Res.*, 60, 123-127.
- Roy D (2001). Media for the isolation and enumeration of bifidobacteria in dairy products. *Int. J. Food Microbiol.*, 69, 167-182.
- Schleifer KH (1987). Recent changes in the taxonomy of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 46, 201-203.
- Tharmaraj N e Shah NP (2003). Selective enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, Bifidobacteria, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and Propionibacteria. *J. Dairy Sci.*, 86, 2288-2296.
- Thunell RK (1995). Taxonomy of *Leuconostoc*. *J. Dairy Sci.*, 78, 2514-2522.
- Tornadijo ME, Fresno JM, Bernardo A, Martín Sarmiento R, Carballo J (1995). Microbiological changes throughout the manufacturing and ripening of a Spanish goat's raw milk cheese (Armada Variety). *Lait*, 75, 551-570.
- van Niel EWJ, Hahn-Hägerdal B (1999). Nutrient requirements of lactococci in defined growth media. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52, 617-627.
- Weiss A, Domig KJ, Kneifel W (2005). Comparison of selective media for the enumeration of probiotic enterococci from animal feed. *Food Technol. Biotechnol.*, 43, 147-155.