

## Nota prévia: Avaliação do efeito antagônico de espécies de *Lactobacillus* sobre *Listeria monocytogenes* *in vitro*

Previous notes: Evaluation of the antagonistic effect of *Lactobacillus* species on *Listeria monocytogenes* *in vitro*

### Autores | Authors

#### ✉ Larissa Batista POPPI

Universidade de São Paulo (USP)  
Escola de Engenharia de Lorena  
Departamento de Biotecnologia  
Estrada Municipal do Campinho, s/n  
CEP: 12602-810  
Lorena/SP - Brasil  
e-mail: larissapoppi@yahoo.com.br

#### Ismael Maciel de MANCILHA

Universidade Federal de Viçosa (UFV)  
Departamento de Tecnologia de Alimentos  
e-mail: mancilha@debiq.eel.usp.br

#### Antônio José Piantino FERREIRA

Universidade de São Paulo (USP)  
e-mail: af.piantino@fmvz.usp.br

#### Débora Dutra Menezes LEAL

Universidade de São Paulo (USP)  
Departamento de Biotecnologia  
e-mail: debora\_leal71@yahoo.com.br

✉ Autor Correspondente | Corresponding Author

Recebido | Received: 06/11/2006  
Aprovado | Approved: 10/12/2007

### Resumo

*Listeria monocytogenes*, agente causador da listeriose, é de grande importância para a indústria alimentícia, pois esta bactéria é capaz de proliferar-se em ambientes refrigerados, condições em que normalmente são estocados os alimentos. Os indivíduos acometidos por listeriose podem contrair infecção intra-uterina, meningite e septicemia. A incidência de listeriose é baixa, mas especial atenção lhe tem sido dada devido a sua alta taxa de mortalidade e às seqüelas deixadas nos indivíduos, uma vez que esta infecção afeta o sistema nervoso central. Tendo em vista os recentes avanços no emprego de microrganismos probióticos contra espécies patogênicas, o presente trabalho teve como objetivo verificar o efeito antagônico de espécies de *Lactobacillus* compreendendo *L. casei* subsp. *pseudoplantarum* (30b e 30c), *L. plantarum* (11fb, 22c e 41b), *L. reuteri* (18fa e 19fa) e *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* (17fb) sobre o desenvolvimento de *Listeria monocytogenes* *in vitro*. O acompanhamento da ação das possíveis substâncias inibitórias presentes no sobrenadante dos cultivos de *Lactobacillus* sobre a espécie patogênica foi conduzido por meio da técnica do ágar *spot test* e turbidimetria. Os resultados revelaram que as cepas de *Lactobacillus* testadas isoladamente, bem como o *pool* constituído pelas oito cepas, demonstraram atividade bacteriostática sobre *L. monocytogenes*.

**Palavras-chave:** *Lactobacillus*; *Listeria monocytogenes*; Probióticos.

### Summary

*Listeria monocytogenes*, an agent responsible for listeriosis, is of great importance in the food industry because of its ability to proliferate in cooled environments at temperatures normally used for food storage. Listeriosis may appear as uterine infection, meningitis and septicemia. Although listeriosis is of rather low incidence, it has received special attention because the infection affects the central nervous system, having a high mortality rate or leaving serious neurological sequels in surviving victims. With the recent advances concerning the action of probiotic microorganisms against pathogenic species, the present work aimed at studying the antagonistic effect of *L. casei* subsp. *pseudoplantarum* (30b and 30c), *L. plantarum* (11fb, 22c and 41b), *L. reuteri* (18fa and 19fa), *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* (17fb) on the development of *Listeria monocytogenes* *in vitro*, employing spot test and optical density techniques. The results showed a bacteriostatic effect exerted by the *Lactobacillus* strains on *L. monocytogenes*, tested either individually or as a pool of all the eight strains.

**Key words:** *Lactobacillus*; *Listeria monocytogenes*; Probiotics.

**Nota prévia: Avaliação do efeito antagônico de espécies de *Lactobacillus* sobre *Listeria monocytogenes* in vitro**

POPPI, L. B. et al.

**1 Introdução**

*Listeria monocytogenes*, agente causador da listeriose, foi reconhecida como patógeno animal em 1924, em Cambridge, por Murray (MENA et al., 2004; MCLAUHLIN et al., 2004), mas em 1980 com o aumento da ocorrência desta doença, que pode ser fatal, o interesse por esse microrganismo se renovou (BARBALHO et al., 2005; MCLAUHLIN et al., 2004).

O gênero *Listeria* compreende seis espécies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. grayi*, *L. seeligeri*, *L. innocua* e *L. welshimeri* (BELL e KYRIAKIDES, 1998), que se encontram amplamente distribuídas na natureza, tendo sido isoladas do solo, vegetação, esgoto, água, alimentação animal, carnes frescas e congeladas, incluindo a de aves, além das fezes de humanos e animais saudáveis (MCLAUHLIN et al., 2004). Enquanto a incidência de listeriose em humanos é baixa (2-15/milhão), a mortalidade é estimada entre 20 a 40%, e os sobreviventes, particularmente aqueles que apresentaram alteração no sistema nervoso central, podem desenvolver seqüelas (MCLAUHLIN et al., 2004; MENA et al., 2004). Em indivíduos adultos a listeriose pode ocorrer sob a forma invasiva e não invasiva, sendo que os sintomas iniciais da forma invasiva são semelhantes aos da gripe, como febre, fadiga, mal-estar, náusea, cólicas, vômitos e diarreia, enquanto que a não invasiva caracteriza-se pela ocorrência de septicemia e meningite (WALLS e BUCHANAN, 2005).

No Brasil, em estudo realizado por Barbalho et al. (2005) foram encontradas amostras contaminadas por *Listeria monocytogenes* em indústrias de beneficiamento de aves, principalmente encontradas em carcaças de frangos e nas mãos e luvas dos trabalhadores em diferentes etapas do processo.

Hofer et al. (2000), utilizando técnicas fenotípicas, caracterizaram espécies e sorotipos de 3112 isolados de *Listeria* de diferentes origens, em humanos (7,9%) e animais (7,6%), bem como em alimentos (74,8%) e no meio ambiente (9,55%). Os resultados revelaram que 24,8% das cepas isoladas foram identificadas como *Listeria monocytogenes*.

Estudos referentes a medidas para se avaliar os alimentos, prevenir a contaminação por *L. monocytogenes* e prevenir o seu desenvolvimento em alimentos prontos para consumo tem mostrado que se deve: a) adequar embalagens com tratamentos listericidas; b) reduzir o tempo de prateleira e/ou; c) usar microrganismos competitivos para minimizar o crescimento da bactéria patogênica (WALLS e BUCHANAN, 2005).

Dentro deste contexto destacam-se os probióticos, que foram definidos por Guarner e Schaafsma (1998) como microrganismos vivos, que ingeridos em certa quantidade exercem efeito benéfico no hospedeiro além da nutrição básica inerente.

Os principais microrganismos que apresentam propriedades probióticas são as bactérias lácticas (FERREIRA, 2003). Segundo Servin et al. (2003), Kalantzpoulos (1997) e Jin et al. (1996), as bactérias lácticas apresentam significativo efeito inibitório sobre o crescimento e a produção de toxinas de muitas outras espécies de bactérias. Esta atividade antagônica pode ser devido à competição por nutrientes, diminuição do potencial redutor, redução do pH devida à produção de ácido láctico e ácido acético, produção de compostos inibidores como peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono e diacetil, e produção de bacteriocinas e antibióticos. Destaca-se ainda, que as bactérias probióticas causam a destruição de estruturas moleculares básicas dos ácidos nucléicos e proteínas celulares, e se aderem às células da mucosa e epitélio do intestino.

Segundo Rostagno et al. (2003), os probióticos competem com os patógenos pelos receptores celulares como, por exemplo, a glucosamina. A maioria dos microrganismos probióticos pode interagir com a membrana intestinal, formando uma parede de defesa contra os patógenos invasores, ou seja, forma uma "película biológica" que evita a aderência de microrganismos indesejáveis.

O principal metabólito produzido pelas bactérias lácticas é o ácido láctico, que pode diminuir o pH do meio, o que seria suficiente para exercer efeito de inibição sobre muitos microrganismos. A concentração de ácido láctico encontrada em muitos alimentos fermentados pode ser suficiente para impactar a estabilidade microbiológica (EARNSHAW, 1992). Segundo Nes et al. (2004) e Rosslund et al. (2005), o principal fator antimicrobiano identificado nas bactérias lácticas é a sua habilidade em produzir ácidos orgânicos e, conseqüentemente, diminuir o pH.

Frente ao exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito inibitório de espécies de *Lactobacillus* sobre *Listeria monocytogenes*, in vitro.

**2 Material e métodos****2.1 Microrganismos**

Foram avaliadas oito cepas de *Lactobacillus* isoladas de camas de frango, pertencentes à coleção de cultura do Laboratório de Ornitopatologia da FMVZ – USP, São Paulo, representadas pelas espécies *L. casei pseudoplantarum* (30b e 30c), *L. plantarum* (11fb, 22c e 41b), *L. reuteri* (18fa e 19fa) e *L. delbrueckii delbrueckii* (17fb).

**2.2 Condições de manutenção e ativação dos microrganismos**

As bactérias probióticas foram mantidas liofilizadas, e durante os experimentos os microrganismos foram mantidos refrigerados a 4 °C em ágar Man, Rogosa

## Nota prévia: Avaliação do efeito antagonístico de espécies de *Lactobacillus* sobre *Listeria monocytogenes* *in vitro*

POPPI, L. B. et al.

e Sharpe (MRS) a pH 6,2 contido em placa de Petri. Para a ativação, as culturas de *Lactobacillus* foram repicadas três vezes consecutivas em tubos contendo 5 mL de caldo MRS, esterilizados a 121 °C/20 min e incubados por 18 h a 37 °C sob agitação de 40 rpm.

A cepa de *L. monocytogenes* foi conservada em ágar semi-sólido LB (Luria Bertani) sob refrigeração a 4 °C. Esta cepa foi repicada três vezes consecutivas em tubos contendo 5 mL de caldo BHI esterilizado a 121 °C/20 min e incubada em condições aeróbias a 37 °C por 18 h.

### 2.3 Obtenção de células e sobrenadantes de *Lactobacillus*

A suspensão de células das linhagens de *Lactobacillus* foi obtida através da ativação das mesmas em erlenmeyer contendo 45 mL de caldo MRS a 37 °C/18 h em *shaker* a 40 rpm e em seguida centrifugadas a 10000 x g por 10 min a 4 °C (Centrífuga 5804R, EPPENDORF). Os *pellets* obtidos foram lavados três vezes consecutivas em solução PBS (Phosphate Buffer Saline) 0,1M, pH 7,4, ressuspensos em solução de sacarose 20% e congelados a -80 °C em tubos (Eppendorf) de 1,5 mL.

A formação do *pool* de *Lactobacillus* foi realizada de duas maneiras, denominadas *pool A* (PA) e *pool B* (PB). Para a obtenção do *pool A*, cada cultura de *Lactobacillus* liofilizada foi ativada três vezes consecutivas em tubos contendo 5 mL de caldo MRS nas mesmas condições descritas anteriormente, e do último repique foram retiradas alíquotas de 4 mL, que foram transferidas para um único frasco de tampa rosqueável esterilizado. Em seguida, 10% (32 mL) de uma suspensão de células resultante desta mistura foi inoculada em frasco com tampa rosqueável contendo 288 mL de caldo MRS e incubado a 37 °C/18 h, obtendo-se o respectivo *pool A*. Para a obtenção do *pool B* as oito cepas de *Lactobacillus* foram individualmente ativadas em caldo MRS nas mesmas condições e ao final reunidas (32 mL) em um mesmo frasco previamente esterilizado. Posteriormente, as suspensões celulares correspondentes ao *pool A* e B foram centrifugadas a 10000 x g por 10 min a 4 °C, lavadas três vezes consecutivas em solução PBS 0,1M, pH 7,4, ressuspensas em solução de sacarose a 20% e congeladas a -80 °C em tubos (Eppendorf) de 1,5 mL.

Os sobrenadantes resultantes da centrifugação das respectivas suspensões celulares das cepas de *Lactobacillus*, individuais e do PA e PB, foram divididos em duas partes, sendo que uma teve o pH ajustado para 7,0 e a outra mantida a pH natural, sendo posteriormente filtrados em membranas 0,22 µm (Sartorius, Minisart High-Flow) e acondicionados em tubos (Eppendorf) de 1,5 mL a -80 °C.

### 2.4 Avaliação do efeito de células de *Lactobacillus* sobre *Listeria monocytogenes*

A detecção da atividade antimicrobiana dos microrganismos probióticos sobre *L. monocytogenes* foi avaliada empregando-se o método do ágar *spot test*, conforme descrito por Gagnon et al. (2004) com uma repetição.

A população de células das cepas de *Lactobacillus* presente no inóculo (2 µL para *Lactobacilli* e 10 mL para *L. monocytogenes*) foi de: 1,2 x 10<sup>6</sup> UFC para *Lactobacillus plantarum* (11fb), 2 x 10<sup>6</sup> UFC para *L. delbruecki delbruecki* (17fb), 4,4 x 10<sup>5</sup> UFC para *L. reuteri* (18fa), 2 x 10<sup>4</sup> UFC para *L. reuteri* (19fa), 1,8 x 10<sup>6</sup> UFC para *L. plantarum* (22c), 6,6 x 10<sup>6</sup> UFC para *L. casei pseudopantarum* (30b), 1,6 x 10<sup>7</sup> UFC para *L. casei pseudopantarum* (30c), 7,8 x 10<sup>5</sup> UFC para *L. plantarum* (41b) e 1,7 x 10<sup>6</sup> UFC para o *pool A* e 1,0 x 10<sup>8</sup> UFC para *L. monocytogenes*.

As suspensões celulares das cepas individuais de lactobacilos e o concentrado de culturas correspondentes ao *pool A* foram descongelados à temperatura ambiente (25 °C) e inoculados (2 µL) em *spots* em placas de Petri contendo ágar MRS. O mesmo procedimento foi adotado com ágar MRS adicionado de 3 g.L<sup>-1</sup> de bicarbonato de sódio para neutralização dos ácidos produzidos pelas bactérias lácticas. As placas com os *spots* foram mantidas à temperatura ambiente por 30 min e, em seguida, foram incubadas a 37 °C por 18 a 24 h. Após este período, foram adicionados às placas 10 mL de meio BHI contendo 1% de ágar a 45 °C e 3% (v/v) de uma suspensão de *L. monocytogenes* previamente ativada e incubada a 37 °C aerobiamente por 18 h. A atividade antimicrobiana das suspensões bacterianas foram avaliadas em função do diâmetro do halo de inibição formado ao redor das colônias de lactobacilos (GAGNON et al., 2004), quanto maior o diâmetro, maior o grau de inibição exercido pelos lactobacilos.

### 2.5 Avaliação do efeito do sobrenadante da suspensão de *Lactobacillus* sobre *Listeria monocytogenes*

As culturas individuais e o *pool A* e B de *Lactobacillus* foram avaliados quanto à produção de substâncias inibitórias que se encontravam presentes no sobrenadante. Para tanto, empregou-se a metodologia proposta por Lash et al. (2002), que consiste em avaliar o crescimento celular por turbidimetria da suspensão celular da bactéria patogênica na presença dos sobrenadantes das respectivas cepas de *Lactobacillus*.

Alíquotas de 300 µL dos sobrenadantes das suspensões de células das oito cepas de *Lactobacillus* e do *pool A* e B, com e sem ajuste de pH, foram transferidas para cubetas descartáveis esterilizadas (UVETTE-

**Nota prévia: Avaliação do efeito antagonístico de espécies de *Lactobacillus* sobre *Listeria monocytogenes* in vitro**

POPPI, L. B. et al.

Eppendorf) juntamente com 300 µL da suspensão de *L. monocytogenes* e incubadas a 37 °C por 7 h. Como controle adicionou-se às cubetas 300 µL de caldo MRS com ajuste e sem ajuste de pH e 300 µL da suspensão de células da cepa patogênica. Utilizou-se como branco uma mistura de 300 µL de caldo MRS e 300 µL de caldo BHI. As cubetas foram incubadas a 37 °C e as respectivas densidades óticas foram monitoradas a 600 nm em espectrofotômetro (Biomate 3, THERMO SPECTRONIC), em intervalos de 1 h, durante 7 h. Em seguida, as culturas foram plaqueadas em ágar BHI para que se verificasse o crescimento da cepa patogênica.

**3 Resultados e discussão**

O efeito de inibição das células de *Lactobacillus* sobre *L. monocytogenes* foi avaliado e os resultados encontram-se apresentados na Tabela 1.

Nota-se que as cepas de *L. delbrueckii delbrueckii* (17fb) e *L. reuteri* (18fa) não foram capazes de inibir o crescimento de *L. monocytogenes* na presença de bicarbonato de sódio, no entanto, apresentaram efeito antagonístico na ausência deste composto. Este resultado sugere que o efeito inibitório destas cepas se deve à presença de ácidos orgânicos, principalmente o ácido láctico (NAIDU et al., 1999; OUWEHAND et al., 1999), uma vez que o bicarbonato de sódio tem a função de neutralizar os ácidos produzidos no metabolismo das bactérias lácticas. Em contrapartida, as demais cepas 11fb, 22c, 41b, 19 fa, 30b, 30c e *pool A* apresentaram efeito inibitório sobre a bactéria patogênica nas duas condições avaliadas, demonstrando, portanto, que este efeito se deve também à presença de outras substâncias além dos ácidos, como peróxido de hidrogênio e bacteriocinas (NAIDU et al., 1999; TOURÉ et al., 2003).

**Tabela 1.** Efeito de cepas de *Lactobacillus* sobre o desenvolvimento de *L. monocytogenes* em meio MRS neutralizado com bicarbonato de sódio (\*) e sem neutralização com bicarbonato de sódio (\*\*).

Espécies	Caldo MRS	
	Neutralizado*	Sem neutralização**
<i>L. plantarum</i> - 11fb	8,5 <sup>1</sup>	10,5
<i>L. plantarum</i> - 22c	11,0	13,0
<i>L. plantarum</i> - 41b	6,0	9,0
<i>L. delbrueckii delbrueckii</i> - 17fb	-	13,0
<i>L. reuteri</i> - 18fa	-	10,5
<i>L. reuteri</i> - 19fa	11,0	13,5
<i>L. casei pseudoplantarum</i> - 30b	9,5	11,0
<i>L. casei pseudoplantarum</i> - 30c	8,0	11,0
<i>Pool A</i>	11,5	13,0

<sup>1</sup>Valores do diâmetro (mm) do halo de inibição.

Resultados semelhantes foram observados por Fernandes et al. (2003), que constataram que *L. acidophilus* UO001 e *L. gasserii* UO002 inibiram o desenvolvimento de bactérias patogênicas como *L. monocytogenes*. Os pesquisadores verificaram que os ácidos orgânicos, provavelmente o ácido láctico, produzidos pelo metabolismo homofermentativo das espécies de *Lactobacillus* estudadas foram os responsáveis pelo efeito antagonístico observado.

Em pesquisa realizada no Brasil, De Martinis et al. (2003) avaliaram vinte amostras de produtos cárneos quanto à presença de bactérias lácticas produtoras de substâncias antimicrobianas, utilizando a metodologia do ágar *spot test*. Os autores verificaram que *Leuconostoc* sp. e *L. sakei* foram capazes de inibir o crescimento de nove cepas de *L. monocytogenes*, e sugeriram que este efeito foi produzido por bacteriocinas, uma vez que o efeito de ácidos e peróxido de hidrogênio foi eliminado por neutralização e adição de catalase, respectivamente.

Elegado et al. (2004) estudaram a capacidade de *Lactobacillus plantarum* BS em inibir bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella typhimurium* e *Listeria monocytogenes* pela metodologia do ágar *spot test*, e relataram que apenas a cepa de *L. monocytogenes* teve seu desenvolvimento inibido. Entretanto, os pesquisadores verificaram efeito diferenciado quando o extrato de bacteriocina semi-purificado foi utilizado, e concluíram que as bactérias patogênicas não foram inibidas quando em contato com a suspensão de *L. plantarum* BS devido provavelmente à quantidade insuficiente da bacteriocina.

Visando verificar a produção de substâncias antimicrobianas pelas cepas de *Lactobacillus* e constatar sua atuação sobre *L. monocytogenes*, o sobrenadante das cepas de *Lactobacillus* foi confrontado com as suspensões celulares da bactéria patogênica em questão, e o crescimento monitorado por turbidimetria em intervalos de 1 h durante 7 h, cujos resultados encontram-se apresentados nas Tabelas 2 e 3.

Segundo Lash et al. (2005), o método de análise utilizado, que envolve o acompanhamento do crescimento celular, é mais sensível quando comparado com a técnica do ágar *spot test* e a difusão em poços, cujo diâmetro do halo é o indicador de inibição, pois analisa a atividade antibacteriana diretamente entre os sobrenadantes de *Lactobacillus* e a cultura teste em meio líquido, garantindo assim um resultado mais preciso.

Verifica-se na Tabela 2, que os sobrenadantes cujos valores de pH foram ajustados para 7,0 não exerceram efeito inibitório sobre *L. monocytogenes*, entretanto, na Tabela 1 observa-se comportamento diferenciado, em que a *L. monocytogenes* foi confrontada com os inóculos de *Lactobacillus* pela metodologia do ágar *spot test* na presença de bicarbonato de sódio. Todas as cepas de

**Nota prévia: Avaliação do efeito antagônico de espécies de *Lactobacillus* sobre *Listeria monocytogenes* in vitro**

POPPI, L. B. et al.

**Tabela 2.** Crescimento de *L. monocytogenes* na presença dos sobrenadantes das suspensões de células de *Lactobacillus* a pH 7,0.

Sobrenadantes	Tempo (h)							
	0	1	2	3	4	5	6	7
<i>L. plantarum</i> – 11fb	0,057*	0,115	0,316	0,470	0,529	0,537	0,574	0,659
<i>L. plantarum</i> – 22c	0,061	0,108	0,294	0,410	0,440	0,474	0,498	0,553
<i>L. plantarum</i> – 41b	0,054	0,102	0,284	0,413	0,454	0,496	0,492	0,530
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> - 17fb	0,055	0,102	0,278	0,420	0,484	0,476	0,515	0,560
<i>L. reuteri</i> - 18fa	0,066	0,107	0,287	0,398	0,449	0,479	0,515	0,577
<i>L. reuteri</i> - 19fa	0,057	0,101	0,255	0,341	0,374	0,391	0,433	0,484
<i>L. casei</i> subsp. <i>pseudopantarum</i> - 30b	0,061	0,112	0,275	0,423	0,417	0,489	0,518	0,584
<i>L. casei</i> subsp. <i>pseudopantarum</i> - 30c	0,053	0,098	0,272	0,443	0,492	0,501	0,587	0,661
Pool A	0,058	0,105	0,295	0,362	0,391	0,416	0,463	0,519
Pool B	0,102	0,423	0,894	0,967	0,959	0,974	0,982	0,975
Controle	0,033	0,077	0,241	0,440	0,465	0,576	0,662	0,742

\*Densidade ótica (600 nm).

**Tabela 3.** Crescimento de *L. monocytogenes* na presença dos sobrenadantes das suspensões de células de *Lactobacillus* a pH natural.

Sobrenadantes	Tempo (h)							
	0	1	2	3	4	5	6	7
<i>L. plantarum</i> – 11fb	0,020*	0,016	0,019	0,016	0,021	0,029	0,026	0,031
<i>L. plantarum</i> – 22c	0,029	0,022	0,032	0,029	0,031	0,025	0,023	0,039
<i>L. plantarum</i> – 41b	0,035	0,025	0,031	0,029	0,031	0,031	0,031	0,031
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> - 17fb	0,023	0,017	0,024	0,022	0,022	0,032	0,028	0,032
<i>L. reuteri</i> - 18fa	0,031	0,022	0,027	0,023	0,025	0,021	0,025	0,028
<i>L. reuteri</i> - 19fa	0,026	0,024	0,032	0,029	0,028	0,016	0,021	0,022
<i>L. casei</i> subsp. <i>pseudopantarum</i> - 30b	0,027	0,020	0,026	0,020	0,020	0,015	0,015	0,021
<i>L. casei</i> subsp. <i>pseudopantarum</i> - 30c	0,027	0,018	0,021	0,021	0,018	0,017	0,021	0,024
Pool A	0,119	0,123	0,168	0,138	0,151	0,147	0,153	0,122
Pool B	0,030	0,020	0,026	0,021	0,020	0,019	0,021	0,030
Controle	0,033	0,077	0,241	0,440	0,465	0,576	0,662	0,742

\*Densidade ótica (600 nm).

*Lactobacillus* inibiram o microrganismo patogênico com exceção das cepas *L. delbrueckii delbrueckii* (17fb) e *L. reuteri* (18fa), sugerindo que os ácidos produzidos não foram totalmente neutralizados pelo bicarbonato de sódio.

Pode-se observar ainda, que a *L. monocytogenes* quando em contato com o sobrenadante referente ao pool B apresentou valores de densidade ótica maiores em relação ao controle, demonstrando haver um estímulo da bactéria patogênica pelo sobrenadante avaliado. Este estímulo provavelmente ocorreu em função de aminoácidos presentes no meio, produzidos pelos *Lactobacillus* (LEE, 2005), tendo em vista a metodologia empregada para a formação deste pool de células.

Os sobrenadantes resultantes do cultivo de *Lactobacillus*, cujo pH não foi ajustado (Tabela 3), exerceram maior efeito de inibição sobre o desenvolvimento de *L. monocytogenes*, entretanto, não foi observado efeito bactericida, uma vez que após 7 h de contato das células de *L. monocytogenes* e dos respectivos sobrenadantes,

estas apresentaram crescimento quando plaqueadas em ágar BHI.

No entanto, Herreiros et al. (2005) avaliaram a atividade antagônica de bactérias lácticas isoladas de queijo produzido na Espanha sobre *L. monocytogenes* e outras bactérias patogênicas, utilizando a metodologia de difusão em ágar (*well diffusion*), e verificaram que todas as cepas de bactérias lácticas, dentre elas, *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis*, *L. casei* subsp. *casei*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus* subsp. *cremosis*, *Leuconostoc mesenteroide* subsp. *dextranicum* e *Leuconostoc mesenteroide* subsp. *mesenteroide* não apresentaram efeito de inibição sobre *Listeria monocytogenes* e outros patógenos testados.

Por outro lado, Bredholt et al. (1999) isolaram cepas de *Lactobacillus sakei* em amostras de carne que foram testadas na prevenção de contaminação por *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* O157:H7 em presunto, cujos resultados demonstraram que as bactérias lácticas foram capazes de inibir o crescimento dos microrga-

**Nota prévia: Avaliação do efeito antagonístico de espécies de *Lactobacillus* sobre *Listeria monocytogenes* in vitro**

POPPI, L. B. et al.

nismos patogênicos. Dentre as cinco cepas testadas, apenas uma produziu bacteriocina, e o efeito de inibição causado por essa cepa não diferiu das demais, portanto, o efeito observado, segundo os autores, parece não ter sido provocado por bacteriocinas. Conclui-se ainda, que a disputa por nutrientes e o aumento na concentração de ácido láctico podem ter favorecido o desenvolvimento das bactérias ácido lácticas no presunto.

Tyopponen et al. (2003) estudaram o efeito de bioproteção promovido por espécies de *Lactobacillus rhamnosus* E-97800, *L. rhamnosus* LC-750, *L. plantarum* ALC01 e *Pediococcus pentosaceus* RM2000 sobre *Listeria monocytogenes* em embutidos. Os resultados demonstraram que as cepas bioprotetoras preveniram o crescimento de *L. monocytogenes* e este fator resultou em produtos livres deste patógeno na fase final de maturação do produto.

Do exposto, pode-se concluir que as cepas de *Lactobacillus* avaliadas neste estudo apresentaram efeito antagonístico sobre *L. monocytogenes*, devido provavelmente à produção de ácidos orgânicos, preenchendo um dos requisitos necessários para a caracterização de bactérias lácticas com potencial probiótico, entretanto, outras propriedades destas cepas deverão ser analisadas em estudos posteriores.

#### ■ 4 Conclusões

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que a cepa *L. reuteri* (19fa) apresentou o maior efeito de inibição, independente da presença de bicarbonato de sódio sobre *L. monocytogenes*. Os sobrenadantes cujos valores de pH foram ajustados para 7,0 não causaram efeito de inibição sobre *Listeria monocytogenes*. Os sobrenadantes *in natura* dos respectivos cultivos de *Lactobacillus* exerceram efeito de inibição sobre *Listeria monocytogenes*. As cepas de *Lactobacillus* avaliadas neste estudo apresentaram efeito antagonístico sobre *L. monocytogenes*, devido provavelmente à produção de ácidos orgânicos, entretanto, outras propriedades deverão ser analisadas em estudos posteriores.

#### Referências

BARBALHO, T. C. F.; ALMEIDA, P. F.; ALMEIDA, R. C. C.; HOFER, E. Prevalence of *Listeria* spp at a poultry processing plant in Brazil and a phages test for rapid confirmation of suspect colonies. **Food Control**, Amsterdam, v. 16, n. 3, p. 211-216, 2005.

BARBOSA, H. R.; TORRES, B. B. **Microbiologia Básica**. 1. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1999. 196 p.

BELL, C.; KYRIAKIDES, A. **Listeria: A practical approach to the organism and its control in foods**. 1.ed. London: Chapman & Hall, 1998. 150 p.

BREDHOLT, S.; NESBAKEN, T.; HOLCK, A. Protective cultures inhibit growth of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in cooked, sliced, vacuum- and gas- packaged meat. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 53, n. 1, p. 43-52, 1999.

DE MARTINIS, E. C. P.; ALVES, V. E.; FRANCO, B. D. G. M. Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat products. **Food Review International**, Amsterdam, v. 18, n. 2-3, p. 191-208, 2002.

DE MARTINIS, E. C. P.; FREITAS, F. Z. Screening of lactic acid bacteria from Brazilian meats for bacteriocin formation. **Food Control**, Amsterdam, v. 14, n. 3, p. 197-200, 2003.

EARNSHAW, R. G. The antimicrobial action of lactic acid bacteria: natural food preservation systems. In: WOOD, B. J. B. **The lactic acid bacteria – The lactic acid bacteria in health and disease**. v. 1. London: Elsevier Applied Science, 1992, p. 211-232.

ELEGADO, F. B.; GUERRA, M. A. R. V.; MACAYAN, R. A.; MENDOZA, H. A.; LIRAZAN, M. B. Spectrum of bacteriocin activity of *Lactobacillus plantarum* BS and fingerprint by RAPD-PCR. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 95, n. 1, p. 11-18, 2004.

FERNÁNDEZ, M. F.; BORIS, S.; BARBÉS, C. Probiotics properties of humana *Lactobacilli* strains to be used in the gastrointestinal tract. **Journal of Applied Microbiology**, London, v. 94, n. 3, p. 449-455, 2003.

FERREIRA, C. L. F. Grupo de Bactérias Lácticas – Caracterização e aplicação tecnológica de bactérias probióticas. In: FERREIRA, C. L. F. **Prebióticos e Probióticos: Atualização e Prospecção**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2003. p. 7-34.

GAGNON, M.; KHEADR, E. E.; BLAY, G. L.; FLISS, I. In vitro inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 by bifidobacterial strains of human origin. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 92, n. 1, p. 69-78, 2004.

GIANNUZZI, L.; ZARITZKY, N. E. Effect of Ascorbic Acid in Comparison to Citric and Lactic Acid on *Listeria monocytogenes* Inhibition at Refrigeration Temperatures. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technology**, Zürich, v. 29, n. 3, p. 278-285, 1996.

GUARNER, F.; SCHAAFSMA, G. J. Probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 39, n. 3, p. 237-238, 1998.

HERREROS, M. A.; SANDOVAL, H.; GONZÁLEZ, L.; CASTRO, J. M.; FRESNO, J. M.; TORNADIJO, M. E. Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from armada cheese (a Spanish goat's milk cheese). **Food Microbiology**, Amsterdam, v. 22, n. 5, p. 455-459, 2005.

HOFER, E.; RIBEIRO, R.; FEITOSA, D. P. Species and serovars of the genus *Listeria* isolated from different sources in Brazil

**Nota prévia: Avaliação do efeito antagonístico de espécies de *Lactobacillus* sobre *Listeria monocytogenes* in vitro**

POPPI, L. B. et al.

from 1971 to 1997. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, n. 5, p. 615-620, 2000.

JIN, L. Z.; HO, Y. W.; ABDULLAH, N.; ALI, M. A.; JALALUDIN, S. Antagonistic effects of intestinal *Lactobacillus* isolates on pathogens of chicken. **Letters in Applied Microbiology**, London, v. 23, n. 2, p. 67-71, 1996.

KALANTZOPOULOS, G. Fermented products with probiotic qualities. **Anaerobe**, Amsterdam, v. 3, n. 2-3, p. 185-190, 1997.

KOUTSOUMANIS, K. P.; SOFOS, J. N. Comparative acid stress response of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium after habituation at different pH conditions. **Letters in Applied Microbiology**, London, v. 38, n. 4, p. 321-326, 2004.

LASH, B. W.; GOURAMA, H.; MYSLIWIEC, T. H. Microscale assay for screening of inhibitory activity of *Lactobacillus*. **BioTechniques**, London, v. 33, n. 6, p. 1224-1228, 2002.

LASH, B. W.; MYSLIWIEC, T. H.; GOURAMA, H.; MYSLIWIEC, T. H. Detection and partial characterization of a broad-range bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014). **Food Microbiology**, Amsterdam, v. 22, n. 2-3, p. 199-204, 2005.

LEE, K. Comparison of fermentative capacities of lactobacilli in single and mixed culture in industrial media. **Process Biochemistry**, Amsterdam, v. 40, n. 5, p. 1559-1564, 2005.

MCLAUCHILIN, J.; MITCHELL, R. T.; SMERDON, W. J.; JEWELL, K. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterization for use in microbiological risk assessment of foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 92, n. 1, p. 15-33, 2004.

MENA, C.; ALMEIDA, G.; CARNEIRO, L.; TEIXEIRA, P.; HOGG, T.; GIBBS, P. A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in different foods products commercialized in Portugal. **Food Microbiology**, Amsterdam, v. 21, n. 2, p. 213-216, 2004.

NAIDU, A. S.; BIDLACK, W. R.; CLEMENS, R. A probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, London, v. 38, n. 1, p. 13-126, 1999.

NAVARRO, L.; ZARAZAGA, M.; SÁENZ, J.; RUIZ-LARREA, F.; TORRES, C. Bacteriocin production of by lactic acid bacteria isolated from Rioja red wines. **Journal of Applied Microbiology**, London, v. 88, n. 1, p. 44-51, 2000.

NES, I. F.; JOHNSBORG, O. Exploration of antimicrobial potencial in LAB by genomics. **Current Opinion in Biotechnology**, Amsterdam, v. 15, n. 2, p. 100-104, 2004.

OUWEHAND, A. C.; KIRJAVAINEN, P. V.; SHORTT, C.; SALMINEN, S. Probiotics: mechanisms and established effects. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 9, n. 1, p. 43-52, 1999.

PHAN-THANH, L.; MAHOUI, F.; ALIGE, F. Acid responses of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 55, n. 2, p. 121-126, 2002.

ROSSLAND, E.; LANGSRUD, T.; GRANUM, P. E.; SORHAUG, T. Production of antimicrobial metabolites by strains of *Lactobacillus* or *Lactococcus* co-cultured with *Bacillus cereus* in milk. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 98, n. 2, p. 193-200, 2005.

ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; FERES, F. A.; TOLEDO, R. S. Utilização de probióticos e prebióticos em aves. Em FERREIRA, C. L. F. **Prebióticos e Probióticos: Atualização e Prospecção**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2003. p. 181-202.

SERVIN, A. L.; COCONIER, M. Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, Amsterdam, v. 17, n. 5, p. 741-754, 2003.

TIMMERMAN, H. M.; KONING, C. J. M.; MULDER, L.; ROMBOUTS, F. M.; BEYNEN, A. C. Monostrain, multistain and multispecies probiotics – A comparison of functionality and efficacy. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 96, n. 3, p. 219-233, 2004.

TODOROV, S. D.; DICKS, L. M. T. *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria. **Enzyme and Microbial Technology**, Amsterdam, v. 36, n. 2-3, p. 318-326, 2005.

TOURÉ, R.; KHEADR, E.; LACROIX, C.; MORONI, O.; FLISS, I. Production of antibacterial substances by bifidobacterial isolates from infant stool active against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Microbiology**, London, v. 95, n. 5, p. 1058-1069, 2003.

TYOPPONEM, S.; MARKKUKA, A.; PETAJA, E.; SUIHKO, M. L.; MATTILA-SANDHOLM, T. Survival of *Listeria monocytogenes* in North European type dry sausages fermented by bioprotective meat starter cultures. **Food Control**, Amsterdam, v. 14, n. 3, p. 181-185, 2003.

WALLS, I.; BUCHANAN, R. L. Use of food safety objectives as a tool for reducing foodborne listeriosis. **Food Control**, Amsterdam, v. 16, n. 9, p. 795-799, 2005.