

IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS PROVENIENTES DE SUSHI COMERCIALIZADOS NA CIDADE DE PELOTAS/ RS

HELENA REISSIG SOARES VITOLA¹; TASSIANA RAMIRES²; MARIANA ALMEIDA IGLESIAS²; ADRIANA SOUTO PEREIRA NÚNCIO²; WLADIMIR PADILHA DA SILVA²; ÂNGELA MARIA FIORENTINI³

¹Universidade Federal de Pelotas – helena_rsv@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – tassianaramires@gmail.com; maryanaiglesias@hotmail.com; adrianaspn@hotmail.com; isabelaschneid@gmail.com; vladimir.padilha2011@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – angefiore@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

As bactérias ácido-láticas (BAL) possuem a capacidade de sintetizar ácidos orgânicos e, entre eles, o ácido lático é o principal produto de seu metabolismo, além de uma ampla produção de outros metabólitos que afetam desde as propriedades nutricionais, sensoriais até mesmo tecnológicas dos produtos alimentícios fermentados pelas mesmas (DABA & ELKHATEEB, 2020). Por tais razões, esses microrganismos vêm sendo amplamente utilizados como culturas iniciadoras, como probióticos e na bioconservação de alimentos, devido ao seu metabolismo versátil (RODRÍGEZ et al., 2019).

Por constituírem um grupo ubíquo, essas bactérias são encontradas na natureza em nichos de origem animal, vegetal, solo, água e tratos gastrointestinais de humanos e animais. Estudos sobre a diversidade microbiana de nichos inexplorados levam ao isolamento de uma gama de novas espécies, que podem apresentar distintas propriedades tecnológicas e/ ou de influência benéfica para a saúde do hospedeiro (OLOFSSON et al., 2014).

Encontra-se descrito na literatura que BAL podem estar presentes na microbiota intestinal normal de peixes. Gêneros como *Lactobacillus* spp., *Carnobacterium* spp., *Leuconostoc* spp., *Lactococcus* spp., *Vagococcus* spp. estão entre os microrganismos isolados de peixes, amplamente consumidos nas difundidas culinárias ocidentais como trutas e salmão (FRANÇOISE, 2010).

Alimentos prontos para o consumo (RTEF) são caracterizados como "qualquer alimento que é, normalmente, consumido em seu estado cru ou qualquer outro alimento, incluindo um alimento processado, para o qual é razoavelmente previsível que o alimento será consumido sem processamento adicional que minimizar significativamente os riscos biológicos" (FDA, 2017). Pertencentes a esta classificação, comidas tradicionais japonesas, como sushi e sashimi, são alimentos elaborados a partir de arroz cozido frio e vinagre que é moldado em pedaços pequenos e coberto com peixe cru ou cozido, ou no formato de rolo com peixe, vegetais ou ovo e frequentemente embrulhado em algas marinhas (MOURITSEN, 2009).

No presente estudo objetivou-se isolar, caracterizar e identificar bactérias ácido-láticas provenientes de sushi, comercializados na cidade de Pelotas/RS.

2. METODOLOGIA

2.1 Isolamento, seleção e caracterização

Amostras de sushi tipo Niguri (com salmão e arroz) foram coletadas em sete restaurantes especializados em culinária japonesa na cidade de Pelotas (RS/ Brasil), identificados pelos números de um a sete. As coletas ocorreram no período de janeiro/ fevereiro (2016), sendo realizadas duas coletas por mês. As amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas até o início das análises.

Para o isolamento e caracterização das bactérias ácido-láticas (BAL), seguiu-se a metodologia proposta por LIMA et al. (2009), onde diluições seriadas decimais foram semeadas em ágar de Man Rogosa e Sharpe (MRS) e incubadas em condições de anaerobiose por 48h a 37 °C. Cinquenta colônias características de BAL foram selecionadas aleatoriamente, submetendo-as aos testes de coloração de Gram, presença ou ausência da enzima catalase.

2.2 Parâmetros de segurança microbiológica

A produção da enzima DNase foi determinada de acordo com KATEETE et al. (2010). O aparecimento de zonas transparentes ao redor das colônias denotaria um resultado positivo para a produção da enzima. Como controle positivo foi utilizado *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

A atividade da enzima proteolítica (gelatinase) foi determinada, de acordo com PEREIRA et al. (2009). O resultado foi observado a partir do estado físico do meio de cultura. Como controles positivos e negativos foram utilizados *S. aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* NCTC 12900, respectivamente.

A presença de hemolisinas foi determinada de acordo com EATON & GASSON (2001). Como controle positivo, foi utilizada *Listeria monocytogenes* ATCC 7644. A reação hemolítica foi avaliada através do aparecimento de halos verdes o que denotaria lise parcial das hemácias (α -hemólise) ou pelo aparecimento de halos transparentes que denotaria lise total das hemácias (β -hemólise).

2.3 Identificação molecular

A extração do DNA dos isolados ocorreu através da mistura dos *pellets* de células dos isolados, com 100µL de tampão de cloreto de sódio Tris-EDTA (STES), pérolas de vidro e 150 µL de fenol clorofórmio 1:1 (v/v). Agitou-se a mistura por 1 min em vórtex e após, centrifugou-se a 13.000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi coletado em micro-tubo e precipitado com etanol absoluto (2 vezes o volume do sobrenadante) e (0,1 vez o volume do sobrenadante) de cloreto de sódio 5 M.

Estocou-se a mistura à - 20 °C por 1h, seguido por centrifugação 13.000 rpm por 20 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado duas vezes com 125 µL de álcool 70%. A incubação do micro-tubo invertido para completa secagem da amostra ocorreu à 37 °C. Para o armazenamento, 35 µL de água ultrapura foram adicionados juntamente a 1 µL de RNase, e o acondicionamento da amostra manteve condição de temperatura referente à -20 °C (SAMBROOK & RUSSELL, 2001).

A identificação genotípica foi realizada pelo sequenciamento parcial do gene 16S rDNA, realizado em Unidade de Análise Molecular e Proteica (Hospital de Clínicas, Porto Alegre, Brasil). O programa ContigExpress (pacote VectorNTI, Invitrogen) foi utilizado para análise do fragmento sequenciado e a ferramenta BLAST do National Center for Biotechnology Information (NCBI) foi usada para comparar a similaridade do resultado com outras sequências depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Seleção, caracterização e segurança microbiológica

Das 50 colônias selecionadas em ágar MRS, 15 foram caracterizadas como Gram-positivas catalase negativa apresentando morfologia de cocos ou bacilos.

Dos 15 isolados avaliados, fenotipicamente, nenhum apresentou produção das enzimas DNase, responsável pela degradação dos ácidos nucleicos, e gelatinase, responsável pela hidrólise da gelatina, colágeno, caseína, hemoglobina e outros peptídeos bioativos.

Quando testadas contra a produção de hemolisinas, seis bactérias apresentaram produção fenotípica de α -hemolisina, que estaria relacionada à lise parcial de enterócitos. Uma vez que a produção dessas enzimas e toxinas são caracterizadas como indicativas de patogenicidade, torna-se de suma importância a realização de tais testes com o objetivo de garantir a segurança desses isolados para futura aplicação na produção de alimentos. Sendo assim, os seis isolados positivos para produção de α -hemolisinas, não foram selecionadas para os demais testes.

3.2 Identificação molecular

Oito isolados seguiram para sequenciamento molecular e destes, apenas 6 são pertencentes ao grupo de bactérias ácido-láticas. Na Tabela 1, estão os resultados do sequenciamento molecular da porção do gene 16S rRNA, onde foi possível identificar o gênero e a espécie dos isolados.

Tabela 1 Identificação molecular dos isolados de bactérias ácido-láticas provenientes de sushi, comercializados em Pelotas, RS

Isolado	Espécie	Percentual de similaridade	Número de acesso NCBI
C28	Weissella cibaria	92,02%	NZ_CP012873.1
C34	Weissella cibaria	87,32%	NZ_CP012873.1
C35	Streptococcus marimammalium	84,17%	NZ_KB904348.1
C39	Streptococcus merionis	71,30%	NZ_KB904541.1
C48	Streptococcus marimammalium	84,17%	NZ_KB904348.1
C49	Enterococcus thailandicus	92,09%	NZ_LWMN01000007.1

Nota-se uma diversidade de espécies de BAL isoladas de sushi, com destaque para o gênero *Weissella cibaria*, que de acordo com a literatura algumas linhagens são potenciais candidatas a probióticas, pois utilizam vários tipos de oligossacarídeos derivados de fibras dietéticas produzindo lactato e acetato (MÅNBERGER et al, 2020), ressaltando que essa espécie também está relacionada a produção de bacteriocinas (WU et al., 2015).

Contudo é de conhecimento que para futura aplicação desses isolados ou de seus metabólitos em alimentos, necessita-se dar continuidade aos estudos com realização de testes para avaliar o potencial tecnológico e probiótico dos mesmos.

4. CONCLUSÕES

Conclui-se que alguns dos isolados provenientes de sushi, apresentaram características de BAL, não apresentaram fatores de virulência, garantindo a segurança desses isolados para futura aplicação em alimentos e, alto percentual de similaridade com espécies do grupo de bactérias ácido-láticas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DABA, G. M.; ELKHATEEB, W. A. Bacteriocins of lactic acid bacteria as biotechnological tools in food and pharmaceuticals: Current applications and future prospects. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, Gizé, v. 28, p. 101750, 2020.
- EATON, T. J.; GASSON, M. J. Molecular Screening of *Enterococcus* Virulence Determinants and Potential for Genetic Exchange between Food and Medical

Isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, Norwich, v. 67, n. 4, p. 1628–1635, 2001.

Food and Drug Administration (FDA). Current Good Manufacturing Practice, Hazard Analysis, and Risk-Based Preventive Controls for Human Food. Estados Unidos da América, 01 de abr. 2019. Acessado em 31 de ago. 2020. Online. Disponível em:

[https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?fr=117.3#:~:text=Ready%2Dto%2Deat%20food%20\(,would%20significantly%20minimize%20biological%20hazards.](https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?fr=117.3#:~:text=Ready%2Dto%2Deat%20food%20(,would%20significantly%20minimize%20biological%20hazards.)

FRANÇOISE, L. Occurrence and role of lactic acid bacteria in seafood products. **Food Microbiology**, France, v. 27, p. 698-709, 2010.

KANG, M. S.; YEU, J. E.; HONG, S. P. Safety Evaluation of Oral Care Probiotics *Weissella cibaria* CMU and CMS1 by Phenotypic and Genotypic Analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, Korea, v. 20, n. 11, p. 1-22, 2019.

KATEETE, D. P.; KIMANI, C. N.; KATABAZI, F. A.; OKENG, A.; OKEE, M. S.; NANTEZA, A.; JOLOBA, M. L.; NAJJUKA, F. C. Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, Kampala, v. 9, n. 23, p. 1-7, 2010.

LIMA, K. G. C.; KRUGER, M. F.; BEHRENS, J.; DESTRO, M.T.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B. D. G. M. Evaluation of culture media for enumeration of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium animalis* in the presence of *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. **LWT – Food Science and Technology**, São Paulo, v. 42, n. 2, p. 491–495, 2009.

MÅNBERGER, A.; VERBRUGGHE, P.; GUÐMUNDSDÓTTIR, E. E.; SANTESSON, S.; NILSSON, A.; HREGGVIÐSSON, G. O.; LINARES-PASTÉN, J. A.; KARLSSON, E. N. Taxogenomic assessment and genomic characterisation of *Weissella cibaria* strain 92 able to metabolise oligosaccharides derived from dietary fibres. **Nature**, Lund, v. 10, p. 5853, 2020.

MOURITSEN, O. G. Sushi: **Food for the eye, the body, & the soul**. New York: Springer Science, 2009.

OLOFSSON, T. C.; BUTLER, È.; MARKOWICZ, P.; LINDHOLM, C.; LARSSON, L.; VÁSQUEZ, A. Lactic acid bacterial symbionts in honeybees—an unknown key to honey’s antimicrobial and therapeutic activities. **International Wound Journal**, Lund, v.13, n. 5, p.668–679. 2014.

PEREIRA, V.; LOPES, C.; CASTRO, A.; SILVA, J.; GIBBS, P.; TEIXEIRA, P. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. **Food Microbiology**, Porto, v. 26, n. 3, p. 278–282, 2009.

RODRÍGUEZ, L. G. R.; MOHAMED, F.; BLECKWEDEL, J.; MEDINA, R.; DE VUYST, L.; HEBERT, E. M; MOZZI, F. Diversity and Functional Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated fom Wild Fruits and Flowers Present in Northern Argentina. **Frontiers in Microbiology**, Tucumán, v. 10, p. 1091, 2019.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. **Molecular cloning: A Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

WU, H.; SRIONNUAL, S.; YANAGIDA, F.; CHEN, Y. Detection and Characterization of Weissellicin 110, a Bacteriocin Produced by *Weissella cibaria*. **Iranian Journal of Biotechnology**, Taoyuan, v. 13, n. 3, p. 63-67, 2015.