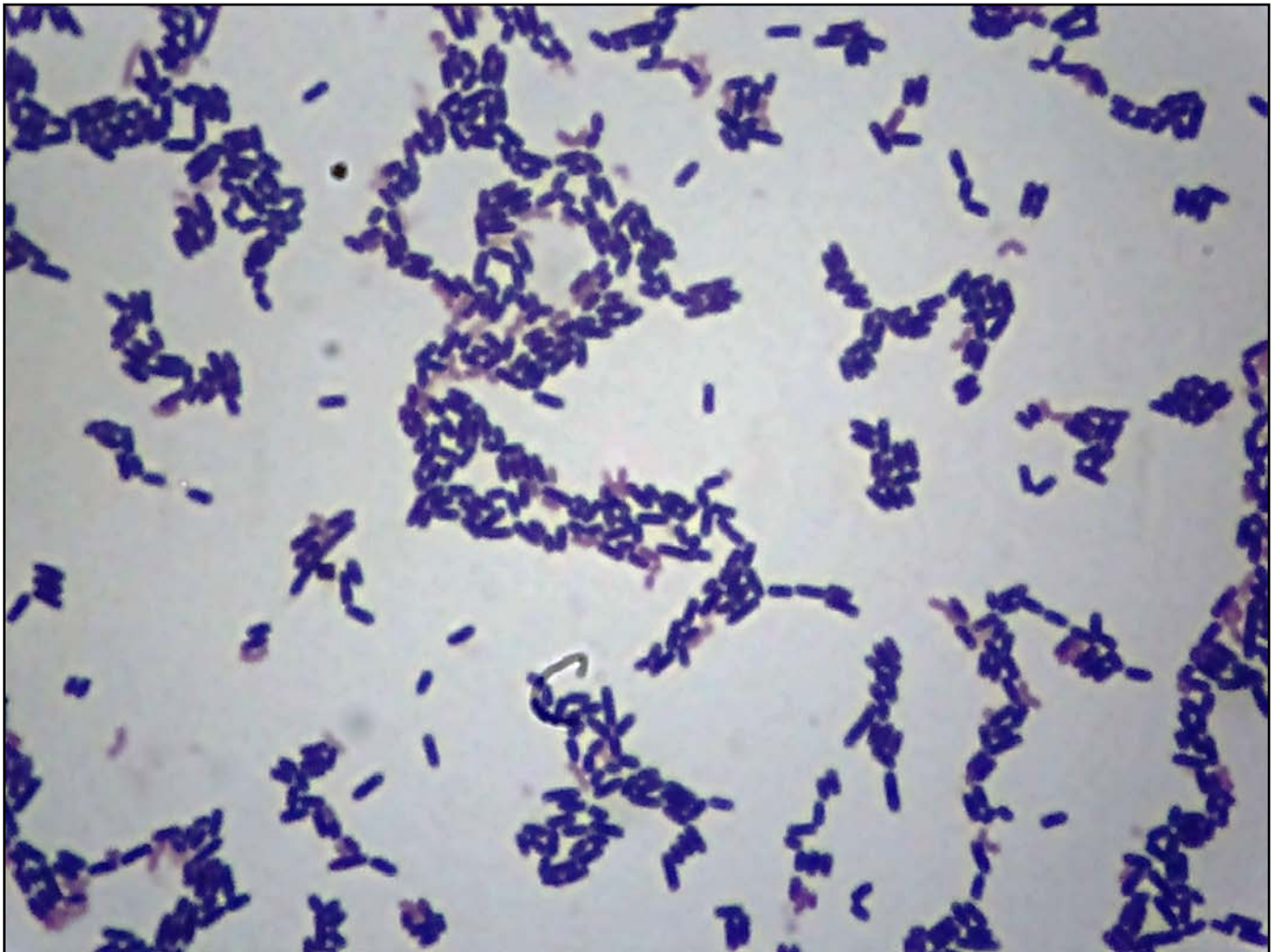


Manual de Curadores de Germoplasma – Micro-organismos: Bactérias Ácido-Láticas

Foto: Cristiane Pereira de Lima



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos

336 *Embrapa Recursos Genéticos e
Biotecnologia
ISSN 0102-0110*

151 *Embrapa Agroindústria Tropical
ISSN 2179-8184*

Manual de Curadores de Germoplasma – Micro-organismos: Bactérias Ácido-Láticas

Laura Maria Bruno

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Endereço: Parque Estação Biológica - PqEB – Av. W5 Norte (final)

Caixa Postal: 02372 - Brasília, DF - Brasil – CEP: 70770-917

Fone: (61) 3448-4700

Fax: (61) 3340-3624

Home Page: <http://www.cenargen.embrapa.br>

E-mail (sac): sac@cenargen.embrapa.br

Comitê Local de Publicações

Presidente: *João Batista Teixeira*

Secretário-Executivo: *Thales Lima Rocha*

Membros: *Jonny Everson Scherwinski Pereira*

Lucília Helena Marcelino

Lígia Sardinha Fortes

Márcio Martinelli Sanches

Samuel Rezende Paiva

Vânia Cristina Rennó Azevedo

Suplentes: *João Batista Tavares da Silva*

Daniela Aguiar de Souza Kols

Supervisor editorial: Lígia Sardinha Fortes

Revisor de texto: José Cesamildo Cruz Magalhães

Normalização bibliográfica: Lígia Sardinha Fortes

Editoração eletrônica: José Cesamildo Cruz Magalhães

Foto da capa: Cristiane Pereira de Lima

1ª edição (*online*)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei n 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

Bruno, Laura Maria.

Manual de Curadores de Germoplasma – Micro-organismos: Bactérias Ácido-Láticas. / Laura Maria Bruno. – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2011.

15 p. – (Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 336; Documentos / Embrapa Agroindústria Tropical, 151)

1. Recursos Genéticos – Micro-organismos. 2. Conservação. 3. Bactérias Ácido-Láticas. I. Título. II. Série.

589.9 – CDD

© Embrapa 2011

Autores

Laura Maria Bruno

Ph.D. em Ciências Biológicas, Pesquisadora da Embrapa

Agroindústria Tropical

laura.bruno@embrapa.br

Apresentação

Desde o início da década de 1970, há uma crescente conscientização mundial sobre a necessidade de preservação dos recursos genéticos, que são essenciais para o atendimento das demandas de variabilidade genética dos programas de melhoramento, principalmente aqueles voltados para alimentação.

No Brasil, esta necessidade é especialmente importante, uma vez que a maioria dos cultivos que compõem a base alimentar do país é de origem exótica. Observa-se, por exemplo, que cerca de 95% dos acessos de cereais conservados em coleções do Sistema Nacional de Pesquisa Agropecuária (SNPA) são de espécies exóticas. Portanto, a manutenção e o enriquecimento contínuo da variabilidade genética dessas coleções são prioritários e estratégicos, considerando, ainda, as atuais restrições internacionais ao intercâmbio de germoplasma.

Na década de 1970, a *Food and Agriculture Organization* (FAO), órgão das Nações Unidas, estimulou o estabelecimento de uma rede mundial de centros para a conservação de recursos genéticos situados em regiões consideradas de alta variabilidade genética. Em 1974, o *Consultative Group for International Agricultural Research* (CGIAR) criou o *International Board for Plant Genetic Resources* (IBPGR), hoje transformado no *Bioversity International*. No mesmo ano, a Embrapa reconheceu a importância estratégica dos recursos genéticos com a criação do Centro Nacional de Recursos Genéticos (CENARGEN), que mais recentemente adotou a assinatura-síntese Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

A criação da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e a consolidação do SNPA estabeleceram ambiente propício para a formatação da Rede Nacional de Recursos Genéticos. A partir de então, paulatinamente, coleções de germoplasma foram estruturadas em diferentes Unidades Descentralizadas, predominantemente na área vegetal.

Em 1993, por intermédio de deliberação da Diretoria Executiva, a Embrapa formalizou, como ferramenta de gestão das coleções, o Sistema de Curadorias de Germoplasma e definiu os papéis e as responsabilidades para os diversos atores envolvidos nesse Sistema, tais como: curadores de coleções de germoplasma, chefes de Unidades Descentralizadas que abrigavam as coleções e a Supervisão de Curadorias. Os projetos em rede foram definidos como figuras programática e operacional, possibilitando o custeio de atividades de coleta, intercâmbio, quarentena, caracterização, avaliação, documentação, conservação e utilização de germoplasma, além da manutenção das coleções. De 1993 até a presente data, muitas coleções de germoplasma foram estabelecidas e, atualmente, o Sistema de Curadorias da Embrapa reúne 209 coleções, incluindo Bancos Ativos de Germoplasma Vegetal (BAGs), Núcleos de Conservação Animal, Coleções Biológicas de Micro-organismos e Coleções de Referência, as quais abrangem espécies nativas e exóticas. Nas

demais Instituições do SNPA, estima-se que são mantidos pelo menos outros 243 Bancos Ativos de Germoplasma Vegetal.

Como duplicata de segurança dos acessos mantidos nos BAGs, a Embrapa Cenargen abriga a Coleção de Base (COLBASE) de germoplasma vegetal, projetada para conservar sementes à temperatura de -20°C por longo período de tempo.

Como consequência desses 30 anos de atividades relacionadas ao manejo dos recursos genéticos, os curadores adquiriram uma bagagem de conhecimentos práticos na área, conhecimentos estes que foram, em parte, sistematizados e disponibilizados para a sociedade por intermédio da presente obra: "Manual de Curadores de Germoplasma".

Esperamos que esta publicação em série torne-se um guia para curadores de germoplasma no Brasil e no exterior, e que contribua efetivamente para o aprimoramento da gestão dos recursos genéticos deste país.

Mauro Carneiro

Chefe Geral

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Sumário

Introdução	08
Coleta de amostras	08
Isolamento	09
Identificação e caracterização	09
Preservação	12
Referências	13

Bactérias Ácido-Láticas

Laura Maria Bruno

Introdução

As bactérias ácido-láticas (BAL), ou bactérias láticas, constituem um grupo diverso de micro-organismos associados a plantas, carnes e laticínios. São bastante empregadas na produção de alimentos, como leites fermentados, iogurtes e queijos, bem como no processamento de carnes, bebidas alcoólicas e vegetais. No entanto, em algumas situações, as BAL também podem ser responsáveis pela produção de sabores e aromas indesejáveis nestes produtos.

Além da importância industrial, algumas BAL também são relevantes para a saúde pública, uma vez que têm sido implicadas como agentes etiológicos de doenças como endocardites, bacteremia e septicemia em pacientes com o sistema imune debilitado (CARR *et al.*, 2002).

As BAL são um grupo de micro-organismos Gram-positivos, catalase negativos, não formadores de esporos e que geralmente crescem sob condições microaerófilas ou estritamente anaeróbicas. Os mais importantes gêneros de BAL são *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus* e *Bifidobacterium* (KLEIN *et al.*, 1998).

Embora as BAL englobem diversos gêneros, elas são agrupadas como homofermentativas ou heterofermentativas, com base no produto final da sua fermentação. As homofermentativas produzem ácido lático como o principal produto da fermentação da glucose. As heterofermentativas, além de ácido lático, formam outras substâncias, como dióxido de carbono, ácido acético, e etanol, a partir da fermentação da glucose (CARR *et al.*, 2002).

Coleta de amostras

A coleta de amostras de alimentos para pesquisa de BAL pode ser realizada conforme especificado no *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (DOWNES; ITO, 2001), bem como no *Laboratory Methods in Food Microbiology* (HARRIGAN, 1998).

Isolamento

Existe uma grande diversidade de meios de cultura para o isolamento de BAL em produtos lácteos. No entanto, a escolha do meio deve ser baseada nas características particulares do micro-organismo a ser estudado, e, também, do produto ou *habitat* onde ele está (RICHTER; VEDAMUTHU, 2001). Em geral, o ágar M17, desenvolvido por Terzaghi e Sandine, tem sido utilizado para o isolamento de BAL na forma de cocos, e o ágar Rogosa acidificado ou o ágar MRS, desenvolvido por Man, Rogosa e Sharpe, para o isolamento de BAL na forma de bastões (CARVALHO, 2007; MARINO *et al.*, 2003; RICHTER; VEDAMUTHU, 2001).

Outro aspecto importante do isolamento é a incubação em diferentes temperaturas de crescimento para favorecer a seleção tanto de micro-organismos mesofílicos, como de termofílicos.

Foto: Juliane D. G. Carvalho



Figura 1. Caracterização de bactérias ácido-láticas.

Identificação e caracterização

As colônias isoladas nos meios específicos para BAL são purificadas, geralmente em ágar MRS, e submetidas aos seguintes testes: coloração de Gram, verificação da morfologia, teste de atividade de catalase e de produção de ácido (CARVALHO, 2007). Os micro-organismos Gram-positivos, catalase negativo, produtores de ácido, com morfologia de cocos ou bastões, são considerados BAL. No entanto, uma série de novos testes ainda é necessária para classificá-los ao nível de gênero e espécie.

Foto: Juliane D. G. Carvalho



Figura 2. Colônias em ágar MRS.

Foto: Cristiane Pereira de Lima

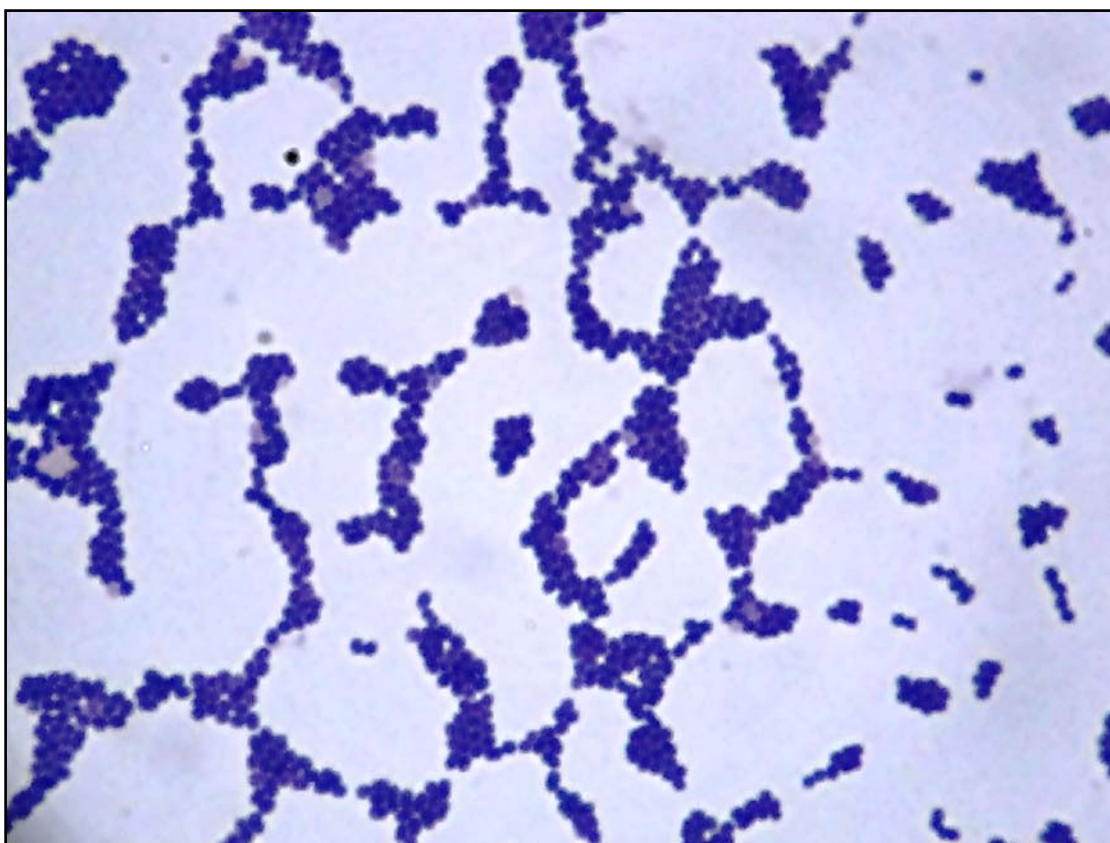


Figura 3. Gram de bactéria láctica na forma de cocos.

Geralmente esses testes são baseados em características fisiológicas e bioquímicas dos micro-organismos. Os testes de crescimento nas temperaturas de 10° e 45°C, crescimento em presença de NaCl 6,5%, crescimento em pH 9,6 e pH 4,4, produção de CO₂ a partir da glucose e formação de téttrade são recomendados pelo *Laboratory Methods in Food Microbiology* (HARRIGAN, 1998) para diferenciação dos gêneros *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* e *Leuconostoc*. Harrigan (1998) também apresenta uma bateria de testes incluindo a verificação da formação de gás a partir de glucose, produção de amônia a partir de arginina, crescimento a 15° e 45°C e fermentação de açúcares (rafinose, melobiose, arabinose, celobiose, gluconato, lactose, salicina e sacarose) para a diferenciação de *Lactobacillus*.



Figura 4. Galeria API 50CH (Bio Méurieux) inoculada com bactéria láctica.

Esses testes fisiológicos e bioquímicos são bastante trabalhosos e demorados e, para auxiliar na identificação, sistemas comerciais, que utilizam diferentes conjuntos de substratos miniaturizados, têm sido desenvolvidos. Um exemplo é o Sistema API 50CH (bioMérieux). Também visando diminuir o tempo e custo da identificação, instrumentos automatizados para a identificação rápida de micro-organismos, como o VITEK®2 (bioMérieux), Phoenix (BD Diagnostic Systems) e OmniLog® ID (Biolog) são disponibilizados.

A identificação de bactérias ácido lácticas usando apenas métodos fenotípicos apresenta limitações, principalmente devido à pequena variação, de características, como, por

exemplo, o padrão de fermentação de açúcares, entre as espécies de BAL (QUERE *et al.*, 1997).

Diversos métodos moleculares têm sido desenvolvidos como uma alternativa para identificação e classificação mais acurada de micro-organismos. Muitos deles se baseiam no uso da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), a qual tem sido empregada para confirmar a identificação bioquímica de BAL. Na PCR específica, uma pequena sequência de nucleotídeos, específica da espécie de interesse, é escolhida e utilizada como *primer* para a identificação do organismo. Os protocolos desenvolvidos por Lick *et al.* (1996) para *Streptococcus thermophilus*, Liéo *et al.* (1999), para *Enterococcus faecalis*, Cheng *et al.* (1997), para *E. faecium*, Song *et al.* (2000) para *Lactobacillus*, Beimfohr *et al.* (1997) para *Lactococcus* são alguns exemplos do emprego da PCR na identificação de bactérias lácticas.

Vale salientar que outras técnicas, como o próprio sequenciamento, também são empregadas na identificação. No entanto, a escolha pela técnica mais viável para cada laboratório depende de fatores que incluem desde a disponibilidade de equipamento e treinamento de pessoal até o custo da sua realização.

Preservação

Um dos métodos de preservação mais empregados para BAL é a criopreservação, que consiste no congelamento da cultura a -80°C . Os meios empregados para a manutenção das culturas são, em geral, leite desnatado enriquecido com extrato de levedura e glucose (BADIS *et al.*, 2004), caldo BHI (ABRIOUEL *et al.*, 2008), caldo MRS e caldo M17 (MARINO *et al.*, 2003; CALSATA *et al.*, 2005; POZNANSKI, *et al.* 2004).

Independentemente do meio de cultura escolhido para a criopreservação, utiliza-se também um agente crioprotetor, comumente glicerol, em proporções que variam de 20 a 50% (BADIS *et al.*, 2004; MARINO *et al.*, 2003; CALSATA *et al.*, 2005; POZNANSKI, *et al.* 2004; ABRIOUEL *et al.*, 2008). Vale ressaltar que outro método utilizado para a preservação de BAL por longos períodos é a liofilização.

Referências

- ABRIOUEL, H.; MARTÍN-PLATERO, A.; MAQUEDA, M.; VALDIVIA, E.; MARTÍNEZ-BUENO, M. Biodiversity of the microbial community in a Spanish farmhouse cheese as revealed by culture-dependent and culture-independent methods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 127, n. 3, p. 200-208, May, 2008.
- BADIS, A.; GUETARNI, B.; MOUSSA BOUDJEMA; B. HENNI, D. E.; KIHAL, M. Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. **Food Microbiology**, [S. l.], v. 21, p. 579-588, 2004.
- BEIMFOHR, C.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Rapid genotypic differentiation of *Lactococcus lactis* subspecies and biovar. **Systematic and Applied Microbiology**, [S. l.], v. 20, n. 2, p. 216-221, 1997.
- CALSATA, E.; CACHENAUT, J-M.; AUBERT, C.; DUFRENE, F.; NOËL, Y.; BEUVIER, E. Application of specific starters for manufacture of Venaco cheese. **Lait**, [S. l.], v. 85, p. 205-222, 2005.
- CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The acid lactic bacteria: A literature survey. **Critical Reviews in Microbiology**, [S. l.], v. 28, n. 4, 2002.
- DOWNES, F. P.; ITO, H. (Ed.) **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th ed. Washington, D. C.: American Public Health Association, 2001. 676 p.
- HARRIGAN, W. F. **Laboratory methods in food microbiology**. 3th ed. San Diego, CA: Academic Press, 1998. 532 p.
- KLEIN, G.; PACK, A.; BONAPARTE, C.; REUTER, G. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, [S. l.], v. 41, n. 2, p. 103-125, 1998.
- CARVALHO, J. D. G. **Caracterização da microbiota láctica isolada de queijo de Coalho artesanal produzido no Ceará e de suas propriedades tecnológicas**. 2007. 154 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.
- CHENG, S.; MCCLESKEY, F. K.; GRESS, M. J.; PETROZIELLO, J. M.; LIU, R.; NAMDARI, H.; BENINGA, K.; SALMEN, A.; DEL VECCHIO, V. G. A PCR assay for identification of *Enterococcus faecium*. **Journal of Clinical Microbiology**, [S. l.], v. 35, n. 5, p. 49-56, 1997.
- LICK, S.; KELLER, M.; BOCKELMANN, W.; HELLER, K.J. Rapid identification of *Streptococcus thermophilus* by primer-specific PCR amplification based on its *lacZ* gene. **Systematic and Applied Microbiology**, [S. l.], v. 19, p. 74-77, 1996.
- LLEO, M. M.; TAFI, M. C.; SIGNORETTO, C.; CERO, C.; CANEPARI, P. Competitive polymerase chain reaction for quantification of nonculturable *Enterococcus faecalis* cells in lake water. **FEMS Microbiology Ecology**, [S. l.], v. 30, n. 4 p. 345-353, 1999.

MARINO, M.; MAIFRENI, M.; RONDONINI, G. Microbiological characterization of artisanal Montasio cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, [S. l.], v. 229, n. 1 p. 133-140, 2003.

POZNANSKI, E.; CAVAZZA, A.; CAPPÀ, F.; COCCONCELLI, P. S. Indigenous raw milk microbiota influences the bacterial development in traditional cheese from an alpine natural park. **International Journal of Food Microbiology**, [S. l.], v. 92, p. 141-151, 2004.

QUERE, F.; DESCHAMPS, A.; URDACI, M. C. DNA probe and PCR-specific reaction for *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Applied Microbiology**, [S. l.], v. 82, n. 6, p. 783-790, 1997.

RICHTER, R. L.; VEDAMUTHU, E. R. Milk and Milk Products. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. (Ed.). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4th ed. Washington, D. C.: American Public Health Association, 2001. Cap. 47, p. 483-493.

SONG, Y.; KATO, N.; LIU, C.; MATSUMIYA, Y.; KATO, H.; WATANABE, K. Rapid identification of 11 human intestinal *Lactobacillus* species by multiplex PCR assays using group- and species-specific *primers* derived from the 16S-23S rRNA intergenic spacer region and its flanking 23S rRNA. **FEMS Microbiology Letters**, [S. l.], v. 187, n. 2, p. 167-173, 2000.



***Recursos Genéticos e
Biotecnologia***