

AVALIAÇÃO DE BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁTICO ISOLADAS DE AMOSTRAS DE LEITE ORIUNDAS DA SERRA DA CANASTRA – MG POTENCIALMENTE PROBIÓTICAS POR MEIO DE TÉCNICAS DE ANTAGONISMO E ANTIBIOGRAMA.

Marcio Vinicius Medeiros de Carvalho¹; Pedro William Maia¹; Nathan Felipe Moraes de Souza²; Talita Gomes da Costa³; Gustavo Augusto Lacorte¹; Raphael Steinberg Da Silva¹

¹Instituto Federal de Minas Gerais – campus Bambuí

²Universidade Federal de Lavras – UFLA

³Universidade de São Paulo - USP

marcio06.medeiros@gmail.com

RESUMO

A mastite é uma das principais causas de prejuízo relacionada a diminuição produção de leite em bovinos. Essa doença é caracterizada por uma inflamação na glândula mamária, causada principalmente por microrganismos patogênicos. Resultando em muitas vezes quadros crônicos, levado ao descarte prematuro de animais. O tratamento usual para esta patologia é baseado em antibioticoterapia, que acaba por levar ao descarte de leite em animais em tratamento, gerando ainda mais prejuízos aos produtores. O uso desenfreado de antibióticos por vezes apresenta diversas complicações, como a seleção artificial de bactérias que venham por apresentar resistência, realizando transferência vertical de fatores de resistência. Por isso, representando um problema de saúde pública. Diante de tal problemática, são considerados diversos métodos alternativos à antibioticoterapia, um destes é a utilização de bactérias do ácido lático (BAL) potencialmente probióticas e autóctones de bovinos. Nesta perspectiva, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial probiótico de 110 BALs isoladas a partir de amostras de leite coletadas em cinco fazendas produtoras do Queijo Minas Artesanal, mensurando a resistências a antibióticos pelo antibiograma em disco difusão em ágar e o perfil antagônico contra patógenos causadores de mastite por sobrecamada em meio sólido. De forma geral os resultados foram positivos, muitos dos isolados demonstrando ação antagônica e susceptibilidade a antibióticos, ao final do estudo foi possível constatar dois isolados com alta frequência de antagonismo além sensibilidade a antibióticos, sendo até então potenciais probióticos para serem administrado na bacterioterapia.

Palavras-chave: Mastite; Antagonismo; Antibiograma; Bactérias do Ácido Lático; Probióticos

1 INTRODUÇÃO

A mastite clínica e subclínica causam perdas econômicas em escala global e seus prejuízos gerados podem ser divididos em diversas categorias, como a diminuição na produção de leite, a cuidados veterinários, qualidade do leite dentre outras categorias (HALASA et al., 2007).

Diante dessas problemáticas, são buscadas formas para o tratamento desta. A mais comumente utilizada é o tratamento por meio de antibióticos, contudo tem-se observado um uso indevido antibióticos em larga escala, levando a preocupação, principalmente quando relacionada a possibilidade de seleção artificial de linhagens

multirresistentes, ou devido a presença de resíduos de antibióticos em produtos destinados ao consumo humano (AARESTRUP, 2012).

Para a identificação de uma nova linhagem benéfica que possa ser usada como probiótico existem diferentes critérios e ensaios laboratoriais recomendados por organizações internacionais (FAO/WHO, 2002; *International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics* – ISAPP, 2009). São esperadas uma série de características para a seleção de um novo probiótico seguro, dentre estas, uma é apresentar atividade antagônica e suscetibilidade a antibióticos.

As bactérias do ácido láctico (BALs) têm a capacidade de converter carboidratos em ácido láctico por fermentação (WEISDORF, 2005). Essa característica acaba por ser usada em produtos lácteos como o Queijo Minas Artesanal (QMA), por exemplo. Por isso, a maior parte dos seus representantes possui o status GRAS “*Generally Recognized As Safe*” de acordo com a *Food and Drug Administration*.

Em 2020 e 2021, um projeto intitulado “Prospecção de bactérias com potencial biotecnológico e probiótico para bacterioterapia da mastite bovina isoladas a partir de amostras de leite de rebanhos da região da Serra da Canastra - MG” começou a ser desenvolvido no IFMG – campus Bambuí sob coordenação do prof. Dr. Raphael Steinberg da Silva. Naquele ano foram isoladas 110 diferentes linhagens de BALs a partir de amostras de leite individual ou de tanque de expansão refrigerado em 5 fazendas da Serra da Canastra-MG produtoras de Queijo Canastra. Portanto, este trabalho teve como objetivo principal avaliar o perfil de antagônico e susceptibilidade a antibióticos, reconhecendo seu potencial na aplicação biotecnológica e potenciais probióticos para a confecção de produtos preventivos ou terapêuticos para mastite em bovinos.

2 METODOLOGIA

Para o isolamento de BALs do leite, foram coletadas previamente amostras de leite cru de 106 vacas e amostra do tanque de expansão refrigerado em 5 fazendas produtoras do QMAC. Animais com sinais de visíveis mastites não foram coletados.

O leite foi coletado individualmente por ordenha manual e armazenado em dois tubos estéreis de 50mL. As amostras de leite recém-colhidas foram armazenadas em caixa térmica a 4°C e em seguida transportadas para o Laboratório de Pesquisa Multiusuário (LaPeM) do Instituto Federal de Minas Gerais – Campus Bambuí (IFMG – Campus Bambuí) para serem isoladas e enumeradas.

Os experimentos realizados neste trabalho, bem como as técnicas de coleta,

foram executados de acordo com diretrizes internacionais (2010/63/EU) e tiveram o acompanhamento de um médico veterinário. Todas as coletas foram realizadas respeitando o bem-estar animal, de modo que nenhum deles sofreu qualquer agressão ou foi eutanasiado para o alcance dos objetivos deste trabalho.

O teste de antagonismo baseado em crescimento de sobrecamada, é dividido em quatro dias. Os patógenos são usados como agentes reveladores de atividade antagônica, sendo neste experimento utilizados sete patógenos comumente associados a mastite, sendo estes: *S. xylosus* – EMB; *S. aureus* – ATCC; *S. sciuri* – EMB; *S. aureus* – VET; *S. uberis* – EMB; *E. coli* 25723 e *L. innocua* - EMB. Após os procedimentos de manipulação, ocorreu uma medição utilizando-se de um paquímetro digital (Mitutoyo, Japão). Através da atividade antagônica de uma BAL em relação a todos os patógenos, torna-se possível medir o seu nível de atividade antagônica

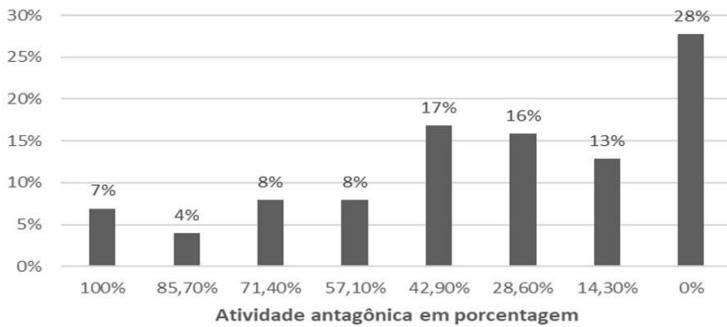
O antibiograma permite avaliar o grau de inibição que um antibiótico tem sobre o crescimento de uma bactéria, sendo utilizado neste trabalho a metodologia de disco-difusão em meio sólido. A sensibilidade aos antimicrobianos foi determinada utilizando-se discos impregnados com antimicrobianos conforme descrito por Charteris e col. (1998) e ANVISA (2005). Os antimicrobianos usados no teste, são os mais utilizados no tratamento para a mastite: vancomicina 30 µg (VAN); ampicilina 10 µg (AMP); gentamicina 10 µg (GEN); amicacina 30 µg (AMI); eritromicina 15 µg (ERI); ceftriaxona 30 µg (CRO); estreptomicina 10 µg (EST); oxacilina 1 µg (OXA); penicilina G 10 U (PEN) e amoxicilina 10 µg (AMO). Após a disposição dos discos, as placas foram incubadas em estufa microbiológica a 37°C por 48 h em aerobiose. Um paquímetro digital (Mitutoyo, Japão), foi utilizado posteriormente para a leitura dos diâmetros dos halos de inibição. Os isolados foram classificados em sensíveis, moderadamente sensíveis ou resistentes para cada antimicrobiano testado.

3 RESULTADOS

No experimento, menos de 30% dos isolados não apresentaram atividade de antagonismo contra nenhum dos patógenos avaliados. Dentre os que apresentaram a atividade de antagonismo, sete isolados chamaram a atenção: *Lactobacillus plantarum* IFMGV87I01; *Lactobacillus rhamnosus* IFMGV105I14; *Lactobacillus paracasei* IFMGT33I01; *Lactobacillus rhamnosus* IFMGT58I14; *Lactobacillus sanfranciscensis* IFMGT109I37; *Lactobacillus sanfranciscensis* IFMGT133I11 e *Lactobacillus paracasei* IFMGT133I01. Todos esses foram eficientes em produzir antagonismo contra todos os

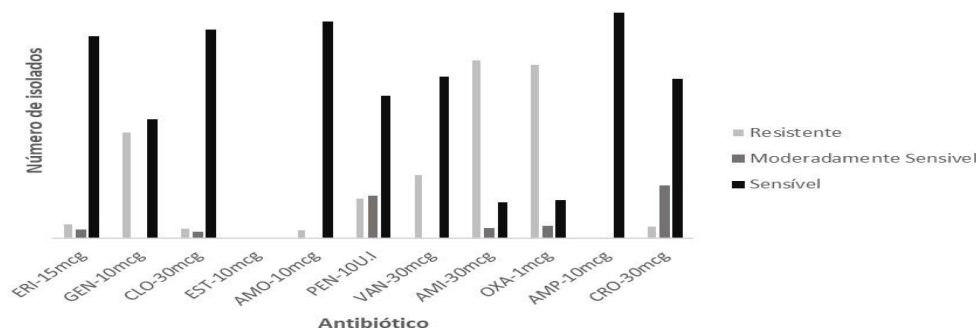
patógenos testados. Dentre os patógenos, *S. aureus* ATCC foi inibido por apenas 24 isolados de BALs, sendo o patógeno com menor efeito de antagonismo pelas BALs testadas. Os resultados expressados na FIGURA 1, baseiam-se nas frequências de atividade antagônica de todas as BALs isoladas durante o experimento.

FIGURA 1 – Distribuição da frequência de atividade antagônica de BALs



Foi possível no teste de Antibiograma, constatar uma maior frequência à susceptibilidade a antibióticos por parte das BALs, representando 66% de ocorrência no experimento. A amoxicilina 10 µg e ampicilina 10 µg demonstraram maior efetividade, principalmente a ampicilina, na qual todos os isolados demonstraram efetividade em serem inibidos. Na FIGURA 2 está resumido os resultados do antibiograma

FIGURA 2 – Esquematização da frequência susceptibilidade de isolados de BALs para os respectivos antibióticos.



4 DISCUSSÃO

De forma geral, foi observada uma variação entre as 110 BALs isoladas com relação a sua capacidade de produzir antagonismo contra os sete patógenos causadores de mastite testados. A explicação para essa tendência pode ser dada em razão dos diferentes tipos de metabólicos produzido pela BAL durante o seu crescimento (FROLA, 2012). Outros experimentos adicionais são necessários para confirmar essas observações aqui relatadas.

Sete BALs tiveram um perfil de antagonismo contra todos os patógenos testados,

além de algumas terem sensibilidade a maioria dos antibióticos testados, como a *L. plantarum* IFMGV87101 e *L. rhamnosus* IFMGV105114, o que faz destes isolados além de potenciais probióticos por razão de sua ação antagônica também seguros para o consumo, uma vez que possuem uma alta susceptibilidade a antibióticos.

5 CONCLUSÃO

Nossos resultados apontam que um número expressivo de isolados de BALs obtidas nas coletas em fazendas produtoras do QMAC apresentam antagonismo contra patógenos causadores de mastite e um perfil intrínseco de resistência a antibióticos, representando um grupo promissor para prospecção de novos produtos probióticos a serem usados como práticas zootécnicas corriqueiras em fazendas de leite.

AGRADECIMENTOS

Aos professores Dr. Raphael Steinberg, Dr. Gustavo Lacorte e Me. Lívia Cristina por ajudar a encontrar meu caminho na pesquisa, e oferecer os equipamentos e insumos necessários para o experimento, bem como aos meus amigos de laboratório. Agradecimento especial à PPRPG-IFMG pelo fomento oferecidos nos editais de Pesquisa Aplicada 065/18 e 087/19 que custearam os experimentos aqui relatados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP, Frank. Get pigs off antibiotics. *Nature*, v. 486, n. 7404, p. 465-466, 2012.

FROLA, I. D.; PELLEGRINO, M. S.; ESPECHE, M. C.; GIRAUDO, J. A.; NADER-MACIAS M.E.; BOGNI, C. I. Effects of intramammary inoculation of *Lactobacillus perolens* CRL1724 in lactating cows' udders. *J. Dairy Res.*, v. 79 (1), p. 84-92, 2012.

HALASA, T. et al. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. *Veterinary quarterly*, v. 29, n. 1, p. 18-31, 2007.

INTERNATIONAL SCIENTIFIC ASSOCIATION FOR PROBIOTICS AND PREBIOTICS. (ISAPP) Probiotics: a consumer guide for making smart choices, 2009. Disponível em <http://www.isapp.net/docs/Consumer_Guidelines-probiotic.pdf>. Acesso em: jul. 2009.

WEISDORF, Jacob L. From foraging to farming: explaining the Neolithic Revolution. *Journal of Economic surveys*, v. 19, n. 4, p. 561-586, 2005.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Normas de desempenho para testes de sensibilidade antimicrobiana: 15º suplemento informativo, v. 25, n. 1, p. 55-58, 2005.

CHARTERIS, A. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *J Food Protect.* v. 61, n. 12, p. 1636-1643, 1998.