

## Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus reuteri* contra bactérias de interesse alimentar

### Antimicrobial activity of *Lactobacillus reuteri* against bacteria of nourishment concern

RIALA6/1334

Helen Silvestre da SILVA\*, Roberta Juliano RAMOS, Andréia CIROLINI, Marília MIOTTO, Andressa Mara BASSEGIO, Cleide Rosana Werneck VIEIRA

Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Rodovia Admar Gonzaga, 1346, Itacorubí, Florianópolis, SC, Brasil. CEP 88034-001. Tel: 47 8805-3705. E-mail: helen\_silves@yahoo.com.br

Recebido: 09.08.2010 – Aceito para publicação: 29.12.2010

#### RESUMO

*Lactobacillus reuteri* é uma espécie heterofermentativa que reside nos tratos gastrointestinal (GI), vaginal e oral do homem e de outros animais de sangue quente. A ação probiótica de *L. reuteri* é atribuída a sua capacidade de exercer um efeito inibitório sobre micro-organismos patogênicos pela combinação de diversos mecanismos, incluindo-se a produção de ácido láctico, peróxido de hidrogênio e produção de bacteriocinas. A reuterina é um composto neutro, de baixo peso molecular, solúvel em água, ativa em uma larga faixa de pH e resistente a ação de enzimas proteolíticas e lipolíticas. Neste estudo foi avaliado o efeito inibitório de *L. reuteri* sobre bactérias patogênicas ou deteriorantes de alimentos. *L. reuteri* apresentou capacidade de inibir o crescimento de *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella tiphymurium*, *Staphylococcus aureus* e *Vibrio cholerae*. Sugere-se que o antimicrobiano produzido pelo *L. reuteri* seja a reuterina.

**Palavras-chave.** reuterina, *L. reuteri*, atividade antimicrobiana.

#### ABSTRACT

*Lactobacillus reuteri* is a heterofermentative species that lives in the gastrointestinal (GI), vaginal and oral tracts of humans and other warm-blooded animals. The action of probiotic *L. reuteri* is derived from its ability to exert an inhibitory effect on pathogens, combining several mechanisms, including the production of lactic acid, hydrogen peroxide and bacteriocin production. The reuterin is a neutral compound of low molecular weight, water soluble, active in a wide pH range, and resistant to proteolytic and lipolytic enzymes. This study evaluated the inhibitory effect of *L. reuteri* on pathogenic bacteria or food deterioration. *L. reuteri* showed ability to inhibit the growth of *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella tiphymurium*, *Staphylococcus aureus* and *Vibrio cholerae*. It is suggested that the antibiotic produced by *L. reuteri* is the reuterin.

**Key words.** reuterin, *L. reuteri*, antimicrobial activity.

## INTRODUÇÃO

*Lactobacillus reuteri* é uma espécie heterofermentativa que reside no trato gastrointestinal (GI), vaginal e oral do homem e outros animais de sangue quente<sup>1</sup>. A ação probiótica de *L. reuteri* é atribuída a sua capacidade de exercer um efeito inibitório sobre micro-organismos patogênicos com uma combinação de diversos mecanismos, incluindo a produção de ácido lático, peróxido de hidrogênio e produção de bacteriocinas<sup>2</sup>. Um composto primário produzido por *L. reuteri*, reuterina, é produzido durante a fermentação do glicerol. Reuterina,  $\beta$ -hydroxypropionaldeído (3-HPA), é produzida em condições de anaerobiose e apresenta efeitos de amplo espectro contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bem como fungos, leveduras e protozoários. A reuterina é um composto neutro, de baixo peso molecular, é solúvel em água, ativa em uma larga faixa de pH e resistente a ação de enzimas proteolíticas e lipolíticas<sup>3</sup>.

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia antimicrobiana da cultura celular e do extrato de *Lactobacillus reuteri* contra bactérias de interesse em alimentos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Micro-organismos e condições de cultivo

*Lactobacillus reuteri* ATCC 1428, foi mantido em Caldo MRS com 20% de glicerol a  $\pm 20^\circ\text{C}$ . As seguintes cepas foram usadas como indicadoras: *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117, *Proteus vulgaris* ATCC 13315, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enterica* ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e *Vibrio cholerae* ATCC 15748. Para reativação, as cepas indicadoras foram cultivadas em caldo triptona de soja (TSB) e *L. reuteri* em caldo MRS. Meios seletivos foram usados para a contagem das cepas indicadoras utilizadas nos ensaios de inibição em caldo. Os meios foram selecionados utilizando-se com base a metodologia de contagem ou pesquisa descrita no APHA<sup>4</sup> para cada espécie.

### Produção do extrato de *Lactobacillus reuteri* por fermentação do glicerol

A produção do extrato seguiu a metodologia descrita por Cleusix<sup>5</sup> com algumas modificações. A partir da cultura de *L. reuteri* (10 mL) pré-reativada, o volume total foi transferido

para um frasco contendo 50 mL de caldo MRS e incubado a  $\pm 37^\circ\text{C}$  por 12 horas. Todo o volume foi transferido para um frasco contendo 500 mL de caldo MRS e incubado a  $\pm 37^\circ\text{C}$  por 24 horas. As células foram colhidas por centrifugação em 1500 x g por 10 minutos a  $20^\circ\text{C}$ , lavadas com tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7,0), ressuspendidas em 300 mL de solução estéril aquosa de glicerol (200 mM) e incubadas por 3 horas a  $37^\circ\text{C}$  em cuba de anaerobiose (Anaerogen®). As células foram removidas por centrifugação (8000 x g, 10 minutos) e 150 mL do sobrenadante foram esterilizados por filtração em membrana 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore).

### Ensaio de inibição

Os ensaios de inibição em meio sólido foram realizados através do Método de Difusão em Ágar pela técnica de poços<sup>6</sup>. Nos poços foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  do extrato ou da cultura. Cada ensaio foi feito em triplicata e, após o período de incubação, procedeu-se à leitura e interpretação dos resultados, através da medida do diâmetro da zona sem crescimento da cepa indicadora. Os ensaios de antagonismo em meio líquido foram realizados por Método Simultâneo e Método *Deferred*, seguindo a metodologia descrita por Batista<sup>7</sup>. Para os dois experimentos o controle foi a cultura da cepa indicadora em caldo TSB. Após a incubação, a contagem final da cepa indicadora em meio seletivo foi realizada para os dois métodos e para o controle.

### Análise Estatística

O resultado dos ensaios em caldo foi submetido à análise de variância (ANOVA), seguida de teste de Tukey para avaliar a diferença estatística entre o controle e o tratamento. As análises foram realizadas com auxílio do programa STATISTICA® 9.0 (StaSoft).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

De todas as culturas indicadoras testadas, duas apresentaram crescimento inibido pela cultura de *L. reuteri* em meio sólido, *Proteus vulgaris* e *Vibrio cholerae*, com zonas de inibição médias de 3,3 mm e 7,8 mm de diâmetro. Resultados pouco expressivos foram observados nos ensaios em meio sólido quando se avaliou a inibição usando uma cultura de *L. reuteri*. O caldo de crescimento e o ensaio de inibição ocorreram todos em aerobiose, desta forma, a produção de antimicrobianos por *L. reuteri* pode ter sido insuficiente para inibir o crescimento da maioria das cepas indicadoras. Segundo Ruch et al<sup>8</sup>, os micro-organismos

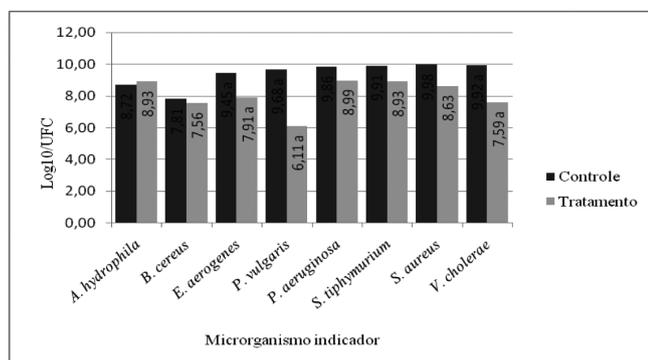
que têm a capacidade de produzir reuterina como *L. reuteri* e *K. pneumoniae* apresentam essa produção apenas em anaerobiose e produção bastante reduzida em aerobiose.

Os ensaios feitos com o extrato de *L. reuteri*, apresentaram resultados positivos para cinco cepas indicadoras, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus* e *Vibrio cholerae*, com zonas de inibição médias de 5,0 mm; 2,3 mm; 5,0 mm; 4,3 mm e 5,9 mm, respectivamente.

A capacidade de algumas cepas de *L. reuteri* de inibir o crescimento de *V. cholerae* foi testada por Spinler et al<sup>3</sup>, eles verificaram que todas elas apresentaram efeito inibitório contra este microrganismo. Segundo os autores, as cepas de *L. reuteri* apresentam diferenças na síntese de reuterina, o que revela diferenças na expressão gênica. No entanto, o composto produzido por todas as cepas apresentou-se semelhante, quanto à capacidade de inibição contra as cepas indicadoras testadas. Os autores utilizaram neste estudo uma solução de reuterina que foi produzida de forma semelhante ao extrato de *L. reuteri* usado no presente trabalho. Ainda, o estudo de Spinler et al<sup>3</sup>, apresenta resultados de inibição da solução de reuterina contra cepas patogênicas de *E. coli*.

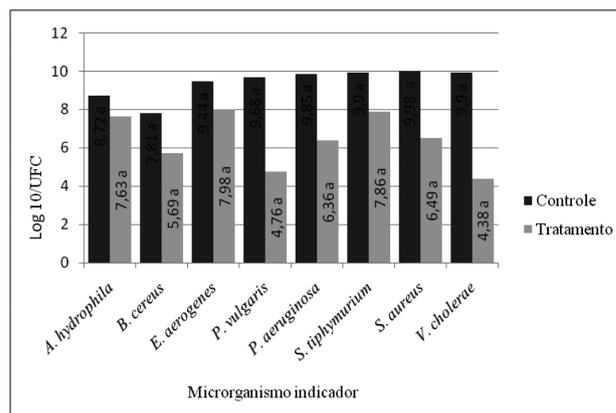
El-Ziney et al<sup>9</sup> já haviam relatado a capacidade inibitória de reuterina produzida por *L. reuteri* contra cepas de *Bacillus cereus* com Concentração Inibitória Mínima (MIC) de 2 UA/mL.

Para os ensaios realizados em meio líquido pode-se observar que pelo Método Simultâneo *L. reuteri* apresentou efeito inibitório baixo contra todas as cepas testadas, porém, quando analisados estatisticamente, apenas os resultados para *E. aerogenes*, *P. vulgaris* e *V. cholerae* apresentaram diferença estatística ( $p < 0,05$ ). O resultado da contagem do controle comparado ao tratamento pelo Método Simultâneo pode ser observado na Figura 1.



**Figura 1.** Contagens (Log 10) de diferentes micro-organismos quando tratados com *L. reuteri*, em meio líquido, pelo método Simultâneo. \*O símbolo (a) representa diferença estatística entre o controle e o tratamento

O resultado do experimento realizado pelo Método *Deferred* apresentou inibição para todas as cepas indicadoras e, quando submetidas à análise estatística, apresentou diferença ( $p < 0,05$ ) em todas. O resultado da contagem do controle comparado ao tratamento pelo Método *Deferred* pode ser observado na Figura 2.



**Figura 2.** Contagens (Log 10) de diferentes micro-organismos quando tratados com *L. reuteri*, em meio líquido, pelo método *Deferred*. \*O símbolo (a) representa diferença estatística entre o controle e o tratamento

Arqués et al<sup>10</sup> em estudo de aplicação de reuterina em leite refrigerado, avaliaram a atividade inibitória deste antimicrobiano contra patógenos Gram-negativos. Os autores observaram que a reuterina foi efetiva contra *E. coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila* e *Campylobacter jejuni*.

Cepas de *Salmonella* sp. apresentam-se sensíveis a antimicrobianos produzidos por *L. reuteri*. Barros et al<sup>11</sup> avaliaram a atividade de cepas de *Lactobacillus* sp. isolados de ingluvío e ceco de aves contra *Salmonella* isoladas de vísceras de galinha. *L. reuteri* foi eficiente contra todas as cepas testadas. Spinler et al<sup>3</sup> também reportaram a atividade inibitória da reuterina contra *Salmonella enterica*.

A reuterina é efetiva na inibição de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica*, *Shewanella putrefaciens* e outros<sup>9,12</sup>.

Neste estudo *Lactobacillus reuteri* foi capaz de inibir todas as cepas testadas pelo Método *Deferred*, sugerindo que houve produção de reuterina durante a incubação em anaerobiose, e que a reuterina produzida inibiu o crescimento das cepas indicadoras inoculadas posteriormente.

## CONCLUSÃO

*L. reuteri* produz reuterina através da fermentação do glicerol, e esta é eficiente para a inibição dos micro-organismos testados neste trabalho.

---

### AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), pelo apoio financeiro.

---

### REFERÊNCIAS

1. Hammes W, Hertel C. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: *The Prokaryotes*. 2006. p. 320-403.
2. Casas IA, Dobrogosz WJ. Validation of the probiotic concept: *Lactobacillus reuteri* confers broad spectrum protection against disease in humans and animals. *Microb Ecol Health Dis*. 2000; 12: 247-85.
3. Spinler JK, Taweechotipatr M, Rognerud CL, Ou CN, Tumwasorn S, Versalovic J. Human-derived probiotic *Lactobacillus reuteri* demonstrate antimicrobial activities targeting diverse enteric bacterial pathogens. *Anaerobe*. 2008; 14 (3):166-71.
4. APHA. American Public Health Association. Compendium of methods for microbiological examination of foods. 4 ed. Washington; 2001.
5. Cleusix V, Lacroix C, Vollenweider S, Le Blay G. Glycerol induces reuterin production and decreases *Escherichia coli* population in an in vitro model of colonic fermentation with immobilized human feces. *FEMS Microbiol Ecol*. 2008; 63:56-64.
6. Pinto TJA, Kaneko TM, Ohara MT. Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos. 2 ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2003.p.325.
7. Batista CRV. Studies on the cultural properties of smooth and rough forms of *Listeria monocytogenes* and antagonistic interaction with *Bacillus amyloliquefaciens*. [PhD Thesis], Glasgow: University of Strathclyde, 1993.p 314.
8. Ruch FE, Lengeler J, Lin ECC. Regulation of glycerol catabolism in *Klebsiella aerogenes*. *J Bacteriol*. 1974.119:50-6.
9. El-Ziney MG, Debevere JM, Jakobsen M, Reuterin. In: NAYDU, A.S. *Natural Food Antimicrobial Systems*. CRC, Florida; 1997. p. 567-87.
10. Arqués JL, Nunez M, Rodriguez E, Medina M. Antimicrobial Activity of Nisin, Reuterin, and the Lactoperoxidase System on *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in Cuajada, a Semisolid Dairy Product Manufactured in Spain. *J Dairy Sci*. 2007; 91:70-5.
11. Barros MR, Andreatti Filho RL, Lima ET, Crocci JA. Avaliação *in vitro* da atividade inibitória de *Lactobacillus* spp, isolados do ingluvío e cecos de aves sobre *Salmonella*. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2009; 61:863-68.
12. Chung TC, Axelsson L, Lindgren SE, Dobrogosz WJ. *In vitro* studies on reuterin synthesis by *Lactobacillus reuteri*. *Microb Ecol Health Dis*. 1989. 2:137-44.