

# Uso de soro de leite bovino para elaboração de meios de cultura para *Staphylococcus aureus*

## Culture media made by bovine whey for *Staphylococcus aureus* growth

RIALA6/1455

Renata Albuquerque COSTA<sup>1</sup>, Márcia Viviane de BRITO<sup>2</sup>, Verônica Sousa de BRITO<sup>2</sup>, Joséires Lira de Sousa FONTENELLE<sup>2</sup>, Jackson Rafael Oliveira PEIXOTO<sup>3</sup>, Gustavo Hitzschky Fernandes VIEIRA<sup>2</sup>, Regine Helena Silva dos Fernandes VIEIRA<sup>4</sup>

\* Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado, Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará (UFC), Avenida Abolição, 3207, CEP 60165-081, Fortaleza, CE. Tel.: (85) 3366-7027. E-mail: renata.albuq@gmail.com.

<sup>2</sup> Departamento de Biologia, Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA).

<sup>3</sup> Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado, UFC.

<sup>4</sup> Instituto de Ciências do Mar (Labomar), UFC.

Recebido: 20.07.2011 - Aceito para publicação: 11.01.2012

### RESUMO

Foi investigada a eficiência do cultivo de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 em meios experimentais elaborados com soro de leite bovino. Foram preparados meios líquido (caldo soro – CS) e sólido (ágar soro – AS) suplementados com cloreto de sódio (CS+NaCl e AS+NaCl) e extrato de levedura (CS+Lev e AS+Lev). No meio AS, foi testado o enriquecimento com extrato de levedura (0,1%) e diluição em água (40%) (AS+H<sub>2</sub>O+Lev). Os meios comerciais de caldo infusão cérebro coração (BHI) e ágar Baird-Parker (BP) foram utilizados como controle. A eficiência dos meios experimentais foi avaliada por determinação da biomassa e contagem de colônias, utilizando-se a cepa *S. aureus* ATCC 25923. Em todos os testes, o crescimento bacteriano foi compatível à quantificação observada nos meios utilizados como controle e houve desenvolvimento de colônias com características morfológicas típicas de *S. aureus*, principalmente no meio AS+H<sub>2</sub>O+Lev. Concluiu-se que o soro de leite bovino pode ser utilizado como componente alternativo na elaboração de meio de cultura para *S. aureus*.

**Palavras-chave.** *Staphylococcus aureus*, lactossoro, meio de cultura experimental.

### ABSTRACT

We investigated the cultivation of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 in experimental media containing bovine whey. Liquid (whey broth – WB) and solid (whey agar – WA) media supplemented with sodium chloride (WB+NaCl and WA+NaCl) and yeast extract (WB+yeast and WA+yeast) were prepared. In WA media, the enrichment with yeast extract (0.1%) and water dilution (40%) (WA+H<sub>2</sub>O+yeast) was tested. Commercial brain heart infusion broth (BHI) and Baird-Parker agar (BP) media were used as controls. The efficiency of experimental culture media was assessed by means of biomass determination and colony counts by using *S. aureus* ATCC 25923 strain. The bacterial growths in all experimental media were identical to those found in control media. In addition, grown bacteria colonies showed morphological characteristics compatible with ATCC *S. aureus*, especially in the WA+H<sub>2</sub>O+yeast medium. Therefore, the bovine whey proved to be efficient as an alternative culture medium for *S. aureus* isolation and growth.

**Keywords.** *Staphylococcus aureus*, bovine whey, experimental media.

## INTRODUÇÃO

O soro de leite é um produto da indústria laticinista obtido por coagulação do leite e redução do pH, apresentando em sua composição química 4,5% de lactose, 0,8% de proteína, 1,0% de sais e 0,1 a 0,8% de ácido láctico<sup>1</sup>.

De acordo com Wong e Lee<sup>2</sup>, a eliminação de grandes quantidades de resíduos de soro do leite, que constitui o principal subproduto da fabricação de queijo, provoca impactos ambientais consideráveis devido a sua alta demanda biológica de oxigênio. A fim de oferecer alternativas para mitigação desse tipo de poluição, novas tecnologias e produtos vêm sendo desenvolvidos como opções para a utilização do resíduo de soro.

Citam-se diferentes formas de uso do lactossoro, dentre as quais destaca-se a elaboração de meios de cultivo para micro-organismos. Ibrahim e Bezkorovainy<sup>3</sup> afirmam que  $\alpha$ -lactoalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina, derivadas do soro de leite bovino, podem ser adicionadas a meios de cultura como promotoras de crescimento bacteriano, principalmente de bifidobactérias.

Por outro lado, são escassos estudos sobre composição de meio, a partir de soro de leite, para bactérias de interesse clínico. Nesse contexto, é justificada a pesquisa de meios experimentais para o cultivo desses isolados, uma vez que nessa área, normalmente, os estudos priorizam micro-organismos com potencial biotecnológico.

Dentre os micro-organismos patogênicos para o homem, *Staphylococcus aureus* é reconhecido como agente etiológico de várias doenças<sup>4</sup>.

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo elaborar e avaliar a eficiência de meios para o cultivo de *Staphylococcus aureus*, tendo como base o soro de leite bovino.

## METODOLOGIA

O soro de leite foi obtido na fazenda Experimental da Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA) e transportado em recipientes previamente esterilizados. Todas as amostras foram mantidas sob refrigeração até o seu uso.

A elaboração dos meios experimentais foi feita após tratamento do soro, seguindo-se as etapas: 5 litros do soro de leite foram deixados em repouso por 12 horas

sob refrigeração. O precipitado obtido (40% do soro total) foi dividido em duas alíquotas, e o pH foi ajustado para pH 2,0 e pH 4,5 com HCl 1 M, a fim de se obter um meio mais límpido. Após fervura por 30 minutos, o concentrado (20% de redução) foi filtrado em papel-filtro e neutralizado até pH 7,0 com NaCl 1 M. Os caldos foram denominados Caldo Soro A (CSa) e Caldo Soro B (CSb), de acordo com o ajuste inicial para pH 2,0 e pH 4,5, respectivamente. Alíquotas de 50 mL foram suplementadas com 0,25% de NaCl (Synth) – CSa+NaCl e CSb+NaCl – e 0,05% de extrato de levedura (Oxoid) – CSa+Lev e CSb+Lev. Para formulação do ágar soro, alíquotas de 50 mL foram adicionadas de 2% de ágar bacteriológico (Difco) – ASa e ASb –, suplementados com 1,0% de NaCl – ASa+NaCl e ASb+NaCl – e 0,1% de extrato de levedura – ASa+Lev e ASb+Lev. Todos os meios foram esterilizados a 121 °C por 15 minutos. Os meios sólidos foram enriquecidos com emulsão de gema de ovo e telurito de potássio a 1% antes da distribuição em placas de Petri. Foram utilizados como controle o caldo infusão cérebro coração (BHI, Difco) e o ágar Baird Parker (BP, Difco).

A eficiência dos meios líquidos foi verificada a partir da biomassa produzida, que foi obtida pela determinação do peso seco. Esse procedimento foi realizado em triplicata. Para obtenção do crescimento bacteriano, foram inoculados 2 mL do inóculo em 50 mL dos caldos experimentais e BHI. Para obtenção do inóculo, a cepa padrão foi diluída em solução salina a 0,85% até o padrão de turbidez 0,5 da escala de McFarland. A comparação foi feita a partir da leitura da densidade ótica em espectrofotômetro (Micronal B542) em comprimento de onda de 625 nm. Os meios de cultura foram incubados em estufa a 35 °C por 24 horas. Após o período de incubação, os cultivos foram filtrados em papel-filtro faixa branca JP 40, previamente seco e pesado. Em seguida, o papel-filtro foi colocado em estufa a 65 °C por duas horas. A determinação da biomassa foi feita por diferença de peso e expressa em mg.100 mL<sup>-1</sup> de meio.

A contagem de colônias de *S. aureus* foi feita nos meios de ágar soro e no BP, por plaqueamento em superfície de 0,05 mL do inóculo ajustado, em duplicata. Após a inoculação, as placas foram incubadas em estufa a 35 °C por 24 horas. O resultado da contagem de colônias foi expresso em unidades formadoras de colônias (UFC.mL<sup>-1</sup>). A fim de se obter resultados representativos, para cada tipo de AS, foram realizadas oito repetições

do experimento. As colônias crescidas nos meios de AS foram isoladas em ágar BHI e submetidas à coloração de Gram e às provas de catalase e coagulase.

## RESULTADOS

Os meios experimentais, com pH ajustado previamente para 4,5 (CSb, CSb+NaCl e CSb+Lev), apresentaram valores de biomassa ( $\text{mg } 100.\text{mL}^{-1}$ ) superiores ao meio controle (BHI). A maior produção de biomassa foi observada no CSb ( $45,0 \text{ mg } 100.\text{mL}^{-1}$ ), seguido de CSb+Lev ( $34,6 \text{ mg} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ ), CSb+NaCl ( $25,0 \text{ mg} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ ) e BHI ( $15,0 \text{ mg} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ ).

Com o pH ajustado previamente para 2,0, o CSA+Lev ( $46,6 \text{ mg } 100.\text{mL}^{-1}$ ) foi o único meio experimental em que foi observada uma produção de biomassa superior à do meio controle BHI ( $26,6 \text{ mg} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ ). Nos meios de CSA e CSA+NaCl, foi observada uma produção de biomassa de  $16,8 \text{ mg} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$  e  $21,3 \text{ mg } 100.\text{mL}^{-1}$ , respectivamente. O ajuste prévio para pH 2,0 foi feito para melhorar a qualidade do soro, uma vez que possibilita sua maior precipitação. Essa assertiva foi comprovada, pois, quando comparados os valores de biomassa dos meios com pH ajustado previamente para pH 4,5 com os submetidos a ajuste prévio para pH 2,0, o maior índice foi verificado no CSA+Lev ( $46,6 \text{ mg} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ ).

A massa celular obtida em quatro (CSb, CSb+NaCl, CSb+Lev e CSA+Lev) dos seis tipos CS testados foi maior do que aquela determinada nos controles (BHI). Isso pode ser decorrente da variedade de nutrientes disponíveis no lactossoro. De acordo com Frank<sup>5</sup>, o leite possui fontes disponíveis de carbono (lactose, proteínas e gordura), compostos nitrogenados não proteicos (ureia, peptídeos e aminoácidos), minerais e micronutrientes, além de estimulantes de crescimento microbiano, como ácido orótico (precursor metabólico de pirimidinas). Soma-se a isso a presença das proteínas do soro,  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbumina, albumina e imunoglobulinas, que são suscetíveis a proteólise microbiana.

Todos os cultivos nos meios experimentais (meios líquidos e sólidos) apresentaram características morfotintoriais típicas de *S. aureus*, cocos Gram-positivos em um arranjo de cachos irregulares.

Considerando que o BHI é um meio nutritivo e que a produção de biomassa nos caldos experimentais foi superior à do BHI, pode-se afirmar que os meios experimentais foram mais eficientes do que o controle.

Ainda nesse sentido, os resultados obtidos sugerem que o caldo soro com suplementações, principalmente o CSA+Lev e CSb+Lev, representa uma fonte alternativa para o cultivo de *S. aureus*.

Nos meios experimentais sólidos, com pH previamente ajustado para 2,0 (ASa, ASa+NaCl, ASa+Lev e ASa+H<sub>2</sub>O+Lev) e pH 4,5 (ASb, ASb+NaCl, ASb+Lev e ASb+H<sub>2</sub>O+Lev), foram observadas colônias com características morfológicas compatíveis com *S. aureus* no meio BP. Em todas as placas de meios experimentais, os inóculos desenvolveram-se e formaram colônias negras com zona opaca ao redor da colônia e halo transparente mais externo. Além de semelhança morfológica, as colônias apresentaram características bioquímicas típicas de *S. aureus*, sendo caracterizadas como coagulase e catalase positivas.

Quando comparadas as médias de  $\log_{10}$  UFC. $\text{mL}^{-1}$ , o ágar soro sem suplementações mostrou-se satisfatório (ASa =  $7,80 \pm 0,25 \log_{10}$  UFC. $\text{mL}^{-1}$ ; ASb =  $7,81 \pm 0,22 \log_{10}$  UFC. $\text{mL}^{-1}$  e BP =  $7,82 \pm 0,16 \log_{10}$  UFC. $\text{mL}^{-1}$ ).

Ao AS foram adicionados nutrientes considerados importantes para o cultivo de *S. aureus*. Nesse sentido, Figueiredo e Passos<sup>6</sup> observaram que o soro de leite quando suplementado com peptona possibilitou maior crescimento de *Lactobacillus acidophilus* do que o meio contendo somente soro.

A média do número de colônias nos ASa+NaCl e ASb+NaCl foi de  $7,93 \pm 0,38$  e  $7,90 \pm 0,21 \log_{10}$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ , respectivamente. No BP, verificou-se  $\log_{10}$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  de  $7,83 \pm 0,17$ . Apesar de proporcionar um índice de crescimento semelhante ao do controle, as colônias crescidas nos ASa+NaCl e ASb+NaCl não apresentaram halos bem desenvolvidos como observados no BP. A tolerância de espécie *S. aureus* ao NaCl foi pesquisada por Parfentjev e Catelli<sup>7</sup>. Os autores observaram que os estafilococos são capazes de crescer satisfatoriamente em meio enriquecido com até 10% de NaCl sem haver indução de alterações relacionadas à produção de pigmentos, sensibilidade a antibióticos e atividade de coagulase e hemolisina. No presente estudo, apesar de ter sido utilizado apenas 1% de NaCl, o meio experimental sólido foi eficiente na promoção do crescimento de estafilococos coagulase positiva.

Nos ASa+Lev e ASb+Lev, a média das contagens foi de  $7,73 \pm 0,24$  e  $7,72 \pm 0,11 \log_{10}$  UFC. $\text{mL}^{-1}$ , respectivamente, e no controle (BP), de  $7,70 \pm 0,29 \log_{10}$  UFC. $\text{mL}^{-1}$ . Apesar de não haver diferença entre as médias das contagens no AS+Lev e no BP, as colônias

crecidas no meio enriquecido com extrato de levedura foram mais desenvolvidas do que as cultivadas no meio sem suplementação. Suarez et al.<sup>8</sup> pesquisaram o efeito do extrato de levedura no crescimento de *Escherichia coli* e verificaram que a capacidade fermentativa dos cultivos foi potencializada no meio enriquecido com levedura.

Foi observado que os meios experimentais sólidos, apesar de suplementados, apresentavam colônias morfológicamente distintas no que tange a forma, elevação e tipo de borda (irregular, plana e borda ondulada) quando comparadas àquelas crescidas no BP (circular, convexa e borda inteira). Portanto, optou-se por adicionar 40% de água: 20 mL de água + 50 mL de caldo soro + 0,1% de extrato de levedura (AS+H<sub>2</sub>O+Lev). A média das contagens de colônias nesse meio (ASb+H<sub>2</sub>O+Lev) foi de  $7,13 \pm 0,52 \log_{10}$  UFC.mL<sup>-1</sup>, enquanto no BP foi de  $7,62 \pm 0,38 \log_{10}$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Apesar de ter sido o único meio experimental em que o número de colônias foi menor do que no meio de BP, a adição de água foi responsável pelo desenvolvimento de colônias com forma circular, elevação convexa e borda inteira, semelhantes àquelas cultivadas em BP.

Os resultados das médias em  $\log_{10}$  UFC.mL<sup>-1</sup> de *S. aureus* nos meios de AS+H<sub>2</sub>O+Lev (pH 2,0 e 4,5) sugerem que o ajuste de pH do soro na preparação inicial dos meios não influenciou o crescimento bacteriano no AS+H<sub>2</sub>O+Lev, uma vez que a média no meio preparado com pH ajustado previamente para 2,0 (ASa+H<sub>2</sub>O+Lev) foi de  $7,09 \pm 0,11$  e no meio com pH ajustado previamente para pH 4,5 (ASb+H<sub>2</sub>O+Lev) foi de  $7,13 \pm 0,52 \log_{10}$  UFC.mL<sup>-1</sup>.

Apesar de perdas parciais de nutrientes nas fases de preparação dos meios de cultivo experimentais, que incluem fervura, ajustamento de pH, filtração e autoclavação, os mesmos tiveram uma alta eficiência para o cultivo de *S. aureus*. Krischke et al.<sup>9</sup> assinalam que o soro de leite contém proteínas de baixo peso molecular, peptídeos e sais inorgânicos, os quais são parcialmente

perdidos após a esterilização e ajuste de pH, sendo necessário, segundo Lund et al.<sup>10</sup>, a suplementação do soro com uma fonte de nitrogênio assimilável.

Os resultados, obtidos pela determinação da biomassa e contagem em placas, quando analisados e comparados respectivamente aos meios controles (BHI e BP), foram satisfatórios. Ainda nesse contexto, é importante ressaltar a eficiência do meio Baird-Parker, especificamente formulado para o crescimento de *S. aureus*, e em razão disso destacar a potencialidade do meio soro para o cultivo dessa espécie bacteriana.

## REFERÊNCIAS

1. Yang ST, Zhu H, Hong G. Continuous propionate production from whey permeate using a novel fibrous bed bioreactor. *Biotechnol Bioeng*. 1994;43:1124-30.
2. Wong HH, Lee SY. Poly-(3-hydroxybutyrate) production from whey by high-density cultivation of recombinant *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1998;50:30-3.
3. Ibrahim AS, Bezkorovainy A. Growth-promoting factors for *Bifidobacterium longum*. *J Food Sci*. 1994;59(1):189-91.
4. Huang SJ, Wang YJ, Cai QY, Fang JD. Detection of *Staphylococcus aureus* in different liquid mediums using wireless magnetoelastic sensor. *Chin J Anal Chem*. 2010;38(1):105-8.
5. Frank JF. Milk and Dairy Products. In: Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ. *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. Washington: ASM Press; 2007. p. 101-16.
6. Figueiredo HM, Passos FJV. Influência da fonte de nitrogênio no crescimento de *Lactobacillus acidophilus* UFV H2B20. *Sitientibus*. 2003;28:37-50.
7. Parfentjev IA, Catelli AR. Tolerance of *Staphylococcus aureus* to sodium chloride. *J Bacteriol*. 1964;88(1):1-3.
8. Suarez LD, Liria CW, Kilikian BV. Effect of yeast extract on *Escherichia coli* growth and acetic production. *World J Microbiol Biotechnol*. 1998;14(3):331-5.
9. Krischke W, Schröder M, Trösch W. Continuous production of L-lactic acid from whey permeate by immobilized *Lactobacillus casei* subsp. *casei*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1991;34(5):573-78.
10. Lund B, Norddahl B, Ahring B. Production of lactic acid from whey using hydrolyzed whey protein as nitrogen source. *Biotechnol Lett*. 1992;14:851-6.