



ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA
INSTITUTO POLITÉCNICO DE CASTELO BRANCO

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA
DE BACTÉRIAS LÁCTICAS DO GÉNERO *Lactobacillus***

Engenharia das Ciências Agrárias - Ramo Animal

Relatório do Trabalho de Fim de Curso

Maria Manuela Martins Francisco Goulão

—◆—
CASTELO BRANCO

2001

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	I
RESUMO.....	III
ABSTRACT.....	IV
LISTA DE ABREVIATURAS	V
ÍNDICE GERAL.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE TABELAS	X
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 BACTÉRIAS LÁCTICAS.....	3
2.1 Classificação das bactérias lácticas.....	3
2.2 Principais características das bactérias lácticas	6
2.3 Género <i>Lactobacillus</i>	7
2.3.1 Subdivisões do género <i>Lactobacillus</i>	7
2.4 Principais funções das bactérias lácticas.....	9
2.4.1 Actividade antimicrobiana.....	10
2.4.1.1 Produção de ácidos orgânicos	10
2.4.1.2 Produção de peróxido de hidrogénio	11
2.4.1.3 Produção de bacteriocinas.....	11
2.4.1.4 Produção de outros inibidores não específicos.....	12
2.4.2 Actividade probiótica	12
3 MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS	14
3.1 Identificação pelos caracteres fenotípicos.....	14
3.1.1 Análise fenotípica.....	15
3.1.2 Análise serológica	18
3.1.3 Tipagem fágica.....	18
3.1.4 Métodos físico-químicos	18
3.1.4.1 Perfis proteicos	18
3.1.4.2 Perfis dos ácidos gordos.....	19

3.1.4.3 Espectros infravermelhos mediante a transformação de Fourier (IRTF)	19
3.2 Identificação pelos caracteres genotípicos	20
3.2.1 Determinação da % G+C do DNA cromossómico	20
3.2.2 Hibridização DNA-DNA	21
3.2.3 Hibridização DNA-RNA	21
3.2.4 Sequenciação do rRNA	21
3.2.5 Reacção de polimerase em cadeia (PCR)	22
3.2.6 Sondas oligonucleotídicas	22
3.2.7 Análise do cromossoma inteiro	23
3.2.8 Perfis plasmídicos	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 Material biológico	25
4.2 Técnicas de caracterização fenotípica para identificação de bactérias lácticas—género <i>Lactobacillus</i>	25
4.2.1 Características morfológicas	26
4.2.1.1 Teste de Gram	26
4.2.2 Características fisiológicas	26
4.2.2.1 Teste de crescimento a 15°C e a 45°C	26
4.2.3 Características bioquímicas	26
4.2.3.1 Teste da catalase	26
4.2.3.2 Teste do CO ₂	27
4.2.3.3 Teste dos isómeros do ácido láctico	27
4.2.3.4 Teste da hidrólise da arginina	29
4.2.3.5 Teste de fermentação das fontes de carbono	30
4.2.4 Características quimiotaxonómicas	31
4.2.4.1 Teste do ácido meso-diaminopimélico (m-DAP)	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1 Características morfológicas	36
5.2 Características fisiológicas	36

5.3 Características bioquímicas	37
5.3.1 Presença de catalase	37
5.3.2 Produção de CO ₂	37
5.3.3 Produção de isómeros do ácido láctico	37
5.3.4 Hidrólise da arginina	38
5.3.5 Utilização das fontes de carbono-perfil de fermentação	38
5.4 Características quimiotaxonómicas	40
5.5 Identificação dos microrganismos	41
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	45
BIBLIOGRAFIA	46
ANEXOS	

Resumo

O principal objectivo deste trabalho foi a identificação de bactérias lácticas do género *Lactobacillus*, após implementação de técnicas de caracterização fenotípica, no Laboratório de Microbiologia da Escola Superior Agrária de Castelo Branco.

Procedeu-se ao estudo de um conjunto de 289 estirpes, isoladas a partir de salmoura de azeitonas pretas ao natural, da cultivar *Galega*. As estirpes encontravam-se conservadas há 2 anos, numa mistura de suspensão bacteriana e glicerol a 90% com uma concentração final de 1/1 (v/v).

A identificação das estirpes foi realizada com base nas características fenotípicas. Partiu-se de culturas puras e foram realizados testes de avaliação das características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e quimiotaxonómicas.

Uma vez na posse de todos os resultados, procedemos à identificação das estirpes, utilizando a chave proposta em “The Prokaryotes” (Hammes *et al.*, 1992). Das estirpes estudadas não foi possível recuperar 84,8%, tendo apenas sido identificadas 15,2%, das quais: *Lb. paracasei* (29,5%), *Lb. plantarum* (22,7%), *Weissella confusa* (22,7%), *Lb. maltaromicus* (9%), *Lb. rhamnosus* (6,8%), *Lb. pentosus* (4,5%), *Lb. coryniformes* e *Lb. graminis*, ambos com (2,3%).

Palavras - chave: bactérias lácticas, *Lactobacillus*, identificação fenotípica