



Ação antimicrobiana de nisina contra estirpes de *Listeria monocytogenes* isoladas maioritariamente de alimentos

Deiva Eunice Tavares Correia

Orientadora

Professora Doutora Cristina Maria Baptista Santos Pintado

Relatório de Estágio apresentado à Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de licenciado em Biotecnologia Alimentar, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Cristina Maria Baptista Santos Pintado, da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco.

Outubro, 2023

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus irmãos e meus pais que sempre estiveram presentes nesta caminhada e ao meu Deus.

Agradecimentos

Agradeço ao meu bom Deus por mais uma etapa concluída, agradeço pela dádiva de ter o Senhor na minha vida, agradeço a oportunidade que tive de ter aprendido com excelentes professores da Escola Superior Agrária.

Agradeço à minha orientadora Doutora Cristina Maria Baptista Santos Pintado pelo ensinamento, paciência, incentivo, disposição e pela amizade que ela sempre teve comigo.

Agradeço à Engenheira Maria Manuela Goulão por estar sempre presente, pela ajuda, pela paciência, pela amizade. Agradeço pelo tempo que estive com a Engenheira no laboratório aprendendo.

Agradeço aos meus pais pelos esforços, agradeço aos meus irmãos e à minha cunhada, por sempre me incentivarem mesmos nas dificuldades.

Resumo

Com este trabalho pretendeu-se conhecer a suscetibilidade de um conjunto de isolados de *Listeria monocytogenes* à ação da bacteriocina nisina, através da determinação da concentração mínima inibitória (MIC) e da concentração mínima bactericida (MBC), a duas temperaturas diferentes. A nisina é um agente antimicrobiano natural, seguro, e que está autorizado para uso alimentar no controlo de *Listeria monocytogenes* e outras bactérias Gram positivas.

Foram analisados 20 isolados de *Listeria monocytogenes*, sendo 5 isolados de leite cru, 5 de queijo feito com leite cru, 5 de salmoura de queijo e 5 de zaragatoas a superfícies numa queijaria. Os ensaios foram feitos seguindo as normas para a avaliação da suscetibilidade antimicrobiana, em caldo à base de triptona de soja e extrato de levedura (TSYEB), para o caso da MIC, e em meio sólido à base de triptona de soja e extrato de levedura (TSYEA), às temperaturas de 10°C e 25°C.

Os resultados permitiram concluir que a nisina foi eficaz no controlo dos 20 isolados de *L. monocytogenes* estudados, com concentrações que variaram entre 63 e 500 UI / mL para a concentração mínima inibitória e 250 a 1000 IU / mL para a concentração mínima bactericida. Concluiu-se ainda que os valores MIC e MBC foram mais baixos quando o ensaio decorreu a 10°C relativamente à temperatura de 25°C, o que sugere que a atividade da nisina como agente antimicrobiano é mais eficaz a baixas temperaturas.

Palavras-chave: Indústria alimentar; Bacteriocina; Concentração mínima inibitória; Concentração mínima bactericida; Controlo microbiano

Abstract

The aim of this work was to know the susceptibility of a set of isolates of *Listeria monocytogenes* to the action of bacteriocin nisin, through the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC), at two different temperatures. Nisin is a natural, safe, antimicrobial agent that is authorized for dietary use in the control of *Listeria monocytogenes* and other Gram-positive bacteria.

Twenty isolates of *Listeria monocytogenes* were analyzed, being 5 isolates of raw milk, 5 of cheese made with raw milk, 5 of cheese brine and 5 of surface swabs in a cheese factory. The assays were carried out following the norms for the evaluation of antimicrobial susceptibility, in broth based on soybean tryptone and yeast extract (TSYEB), for the case of MIC, and in solid medium based on soybean tryptone and yeast extract (TSYEA), at temperatures of 10°C and 25°C.

The results allowed us to conclude that nisin was effective in controlling the 20 *L. monocytogenes* isolates studied, with concentrations that varied between 63 and 500 IU/mL for the minimum inhibitory concentration and 250 to 1000 IU/mL for the minimum bactericidal concentration. It was also concluded that the MIC and MBC values were lower when the test took place at 10°C compared to 25°C, which suggests that the activity of nisin as an antimicrobial agent is more effective at low temperatures.

Keywords

Food industry; Bacteriocin; Minimum inhibitory concentration; Minimum bactericidal concentration; Microbial control

Índice geral

| | | |
|-----|--|----|
| I | Introdução..... | 1 |
| II | Revisão Bibliográfica..... | 2 |
| 1 | Características de <i>L. monocytogenes</i> | 2 |
| 2 | <i>L. monocytogenes</i> na indústria alimentar | 2 |
| 3 | Características da nisina e sua ação com agente antilisterial..... | 3 |
| 4 | Exemplos da aplicação da nisina na indústria alimentar..... | 5 |
| 5 | Concentração mínima inibitória (MIC) e concentração mínima bactericida (MBC)..... | 6 |
| III | Material e Métodos..... | 7 |
| 1 | Culturas bacterianas..... | 7 |
| 2 | Meios de cultura e reagentes..... | 8 |
| 3 | Determinação dos valores MIC | 9 |
| 4 | Determinação dos valores MBC | 10 |
| IV | Resultados e Discussão | 12 |
| 1 | Concentração mínima inibitória de nisina sobre <i>L. monocytogenes</i> a 10°C e a 25°C. | 12 |
| 2 | Concentração mínima bactericida de nisina sobre <i>L. monocytogenes</i> a 10°C e a 25°C .. | 15 |
| V | Considerações Finais..... | 18 |
| | Referências Bibliográficas..... | 19 |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Modos de ação da nisina..... | 5 |
| Figura 2 - Esquema da determinação dos valores da concentração mínima inibitória (MIC)..... | 10 |
| Figura 3 - Esquema da determinação dos valores da concentração mínima bactericida (MBC).11 | |
| Figura4 - Valores da concentração mínima inibitória (MIC) de nisina (IU/mL) para as 20 culturas bacterianas de <i>L. monocytogenes</i> testadas a 10°C. | 12 |
| Figura 5 - Valores da concentração mínima inibitória (MIC) de nisina (IU/mL) para as 20 culturas bacterianas de <i>L. monocytogenes</i> testadas a 25°C. | 13 |
| Figura 6 - Valores da concentração mínima inibitória (MIC) para as 20 culturas de <i>L. monocytogenes</i> testadas a 10°C e 25°C..... | 14 |
| Figura 7 - Exemplo de uma microplaca com resultados MIC. | 14 |
| Figura 8 - Valores da concentração mínima bactericida (MBC) de nisina (IU/mL) para as 20 culturas bacterianas de <i>L. monocytogenes</i> testadas a 10°C..... | 15 |
| Figura 9 - Valores da concentração mínima bactericida (MBC) de nisina (IU/mL) para as 20 culturas bacterianas de <i>L. monocytogenes</i> testadas a 25°C..... | 16 |
| Figura 10 - Valores da concentração mínima bactericida (MBC) de nisina (IU/mL) para as 20 culturas de <i>L. monocytogenes</i> testadas a 10°C e 25°C..... | 16 |
| Figura 11 - Exemplo de uma placa com meio de cultura TSYEA com resultados MIC.. | 17 |

Lista de tabelas

| | |
|---|---|
| Tabela 1 - Exemplos de aplicações da nisina em alguns países..... | 6 |
| Tabela 2 - Origem e data de isolamento dos isolados de <i>Listeria monocytogenes</i> usados neste estudo..... | 7 |
| Tabela 3 - Meios de cultura e reagentes usados neste estudo. | 8 |
| Tabela 4 - Preparação dos meios de cultura e reagentes usados neste estudo. | 9 |