

10^o

FEPEG FÓRUM

ENSINO • PESQUISA
EXTENSÃO • GESTÃO
RESPONSABILIDADE SOCIAL: INDISSOCIABILIDADE
ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA



ISSN 1806-549 X

Autor(es): LILIAN FERREIRA NEVES, ANDRESSA GOMES BATISTA MANZUR, FERNANDA GUIMARÃES, VANESSA DE ARAUJO VELOSO, DANIELLE SOARES MALVEIRA, EDUARDO ROBSON DUARTE

Caracterização microbiológica de leite de transição fermentado bovino

Introdução

O colostro e o leite de transição excedente podem constituir importante alternativa para o aleitamento artificial de bezerros, por apresentarem elevados níveis proteicos e energéticos. Essa matéria prima pode ser conservada em acondicionamento anaeróbico em garrafas de plástico de politereftalato de etileno (PET), técnica conhecida como silagem de colostro (SAALFELD, 2008). Esse processo de armazenamento é simples, dependente de bactérias lácticas, as quais são naturalmente presentes nessas secreções (SAALFELD, 2008; AZEVEDO; DUARTE, 2013).

Na produção dessa silagem deve se ter atenção quanto às características físicas e microbiológicas, pois o odor, a consistência e em especial o pH podem refletir a qualidade microbiológica do produto fermentado. Frequentemente pode ocorrer perda do material por fermentações indesejáveis e putrefação (AZEVEDO *et al.*, 2014).

O gênero *Lactobacillus* apresenta propriedades probióticas em alimentos para humanos e animais. Esse gênero foi identificado em colostro fermentado durante 360 dias (SAALFELD *et al.*, 2013).

Lactobacillus spp. tem contribuído para melhorar o estado de saúde de bezerros recém-nascidos (MALDONADO *et al.*, 2012; BAYATKOUHSARA *et al.*, 2013). Entretanto, poucos estudos têm avaliado e caracterizado a população de bactérias lácticas e naturalmente presentes em colostro ou leite de transição fermentado. A seleção de *Lactobacillus* spp. fermentativos para o leite de transição excedente poderia contribuir para o melhor armazenamento desse alimento e reduzir a população de bactérias patogênicas causadoras de diarreia em bezerros. Dessa forma, nesta pesquisa objetivou-se a caracterização e seleção de bactérias lácticas provenientes de leite de transição bovino fermentado.

Material e métodos

O leite de transição utilizado foi obtido na ordenha mecânica de vacas Holandesas, entre o 3º e o 6º dia após o parto, criadas na fazenda experimental do Instituto de Ciências Agrárias da UFMG, Montes Claros, Minas Gerais, Brasil. Após a coleta o leite de transição foi transferido para garrafas do tipo *pet* de dois litros, sendo totalmente preenchidas e vedadas. O material coletado foi armazenado em galpão experimental cuja temperatura média foi de 22,67°C, com máximas e mínimas de 26,4°C e 18,1°C, respectivamente e sem incidência direta de luz solar durante aproximadamente 141 dias. (AZEVEDO; DUARTE, 2013).

Para cada um dos quatro períodos após o parto, foram selecionadas quatro garrafas, correspondendo o total de 16 amostras com o leite fermentado, apresentando boa aparência, odor agradável e separação adequada do coágulo e da gordura conforme descrito por Saalfeld (2008).

Para o cultivo microbiano, o material das garrafas foi homogeneizado e alíquotas de 1 mL foram diluídas em tubos contendo 9 mL de solução salina em capela de fluxo laminar. Posteriormente, alíquotas de 0,1 mL foram inoculadas em placas de petri contendo os meios Agar MRS, Agar MacConkey, Agar Sabouraud Dextrose e Ágar Sal Manitol para determinação de bactérias ácido lácticas, enterobactérias, *Staphylococcus* spp, fungos e leveduras. As placas contendo meio MRS foram colocadas em jarras de anaerobiose e a incubação ocorreu em estufa BOD a 37°C por 48 horas e posteriormente realizou-se a contagem das colônias.

Foram realizadas análises para determinação do pH e acidez titulável em função do dia de coleta do leite de transição. Cada garrafa foi homogeneizada e aberta para a coleta de 100 mL para mensuração do pH em potenciômetro digital e a acidez foi determinada com a titulação de ácido-base, adicionando solução de NaOH 0,1 mol/dm³ como titulante conforme descrito pela *Federation Internationale de Laiterie* (1991).

Para caracterização bioquímica dos três isolados selecionados, promoveu-se a análise em galerias API 50 CHL (BioMérieux SA, Marcy- l'Etoile/ França). Esse *kit* permite avaliar a capacidade de fermentação de 49 carboidratos e derivados.

Após o crescimento exponencial, com dois cultivos em ágar MRS a 37°C, durante 48 h em condições de anaerobiose, foram preparados inóculos em caldo MRS, que foram cultivados nessas mesmas condições. Posteriormente, inóculos de 2 mL foram incorporados ao meio API 50 CHL Médiu e transferidos para 49 cúpulas, contendo os diferentes substratos. Cada cúpula foi vedada com uma gota de óleo mineral estéril e a incubação foi em estufa BOD a 37°C (BIOMÉRIEUX, 2012).

As leituras foram efetuadas em 24 e 48 h após inoculação nas galerias API. Durante a incubação, o catabolismo conduz à formação de ácidos orgânicos que permitem a viragem do indicador do pH. Os resultados obtidos constituem o

10^o

FEPEG FÓRUM

ENSINO • PESQUISA
EXTENSÃO • GESTÃO

RESPONSABILIDADE SOCIAL: INDISSOCIABILIDADE
ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA



ISSN 1806-549 X

perfil bioquímico da cepa, favorecendo a identificação ou tipagem bioquímica (RAMIRÉZ, 2005). Para análise dos resultados, utilizou-se o programa de probabilidade LAB PLUS software version 4.0 database da BioMerieux, Marcy l'Etoile, France (BIOMÉRIEUX, 2012).

Resultados e discussão

Ao comparar a média de concentração de bactérias lácticas do terceiro ao sexto dia, verificou-se que não houve diferença significativa para esses períodos de coleta.

Não houve crescimento de Bastonetes Gram-negativo, fungos filamentosos e leveduras para os quatro períodos de coletas avaliados. Entretanto, a presença de *Staphylococcus* spp. somente não foi verificada para as amostras do sexto dia de coleta (Tabela 1).

Saalfeld *et al.* (2013) em estudo de colostro fermentado anaerobicamente como alternativa para alimentação de bezerras, observou que os microrganismos que se mantiveram viáveis até 360 dias foram bactérias do gênero *Lactobacillus* spp. A presença de *Lactobacillus* spp., *Staphylococcus* spp., *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp., *Bacillus* spp. e leveduras do gênero *Candida* spp. foi observado na silagem de colostro até 14 dias de fermentação. Entretanto, a partir de 21 dias foram isolados apenas bactérias do gênero *Lactobacillus* spp.. Esses resultados poderiam ser justificados uma vez que maioria das bactérias patogênicas não sobrevivem em condições ácidas, em pH abaixo de 4,0, justificando os resultados observados.

Para os diferentes dias de coletas analisados, não se verificou diferença significativa na média de pH e da acidez titulável do leite de transição, após a fermentação (Tabela 2).

A caracterização bioquímica indicou que os três isolados, apesar de apresentarem aspectos morfológicos diferentes de colônias, apresentaram perfil catabólico semelhantes, o que poderia ser justificado pela pressão seletiva durante o processo fermentativo do leite de transição bovino. Os três isolados avaliados apresentaram características compatíveis com a espécie *Lactobacillus brevis*

Conclusão/Conclusões/Considerações finais

Para leites de transição bovino coletado entre o 3^o e o 6^o dias após o parto e fermentados durante 144 dias, as concentrações de bactérias lácticas são similares e superiores a 10⁵ UFC/ mL.

Três cepas predominantes e previamente selecionadas apresentaram características bioquímicas compatíveis com a espécie *Lactobacillus brevis*

Agradecimentos

Ao Instituto de Ciências Agrárias da UFMG, FAPEMIG, CAPES e CNPq.

Referências bibliográficas

- AZEVEDO, R.A. ; DUARTE, E. R. ; GERASSEEV, L. C. ; COELHO, S.G ; ARAÚJO, L.; FARIA-FILHO, D.E. Desempenho de bezerras alimentados com silagem de leite de transição. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 48, p. 545-552, 2013.
- AZEVEDO, R. A.; GUIMARAES, F.; VIEGAS, C. R.; ALMEIDA, P.N.M. ; GERASSEEV, L. C. ; PINTO, M. S. ; GLÓRIA, J.R. ; DUARTE, E. R.; Silagem de colostro: riscos microbiológicos e caracterização do pH em função do dia de coleta. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 36, p. 271-276, 2014.
- AZEVEDO, R. A.; DUARTE, E. R. Aspectos microbiológicos do colostro bovino em diferentes técnicas de conservação e armazenamento: uma revisão. *Revista Eletrônica de Pesquisa Animal*, v. 1, p. 84-98, 2013.
- BAYATKOUHSARA, J.; TAHMASEBIB, A.M.; NASERIANB, A.A.; MOKARRAMC, R.R.; VALIZADEH, R. Effects of supplementation of lactic acid bacteria on growth performance, blood metabolites and fecal coliform and lactobacilli of young dairy calves. *Animal Feed Science and Technology*, v.186, p.1-11, 2013.
- BIOMERIEUX, LAB PLUS. **Software version 4.0**. Disponível em: apiweb.biomerieux.com. Acessado dia: 30/09/2012
- FEDERATION INTERNATIONALE DE LAITERIE. Yaourt: determination de l'acidité titrable (methode potentiometrique). *Federation Internationale de Laiterie*, v. 1, 1991.
- MALDONADO, N.C. RUIZ, C.S.; OTERO, M.C.; SEMA, F.; NADER-MACIAS, M.E. Lactic acid bacteria isolated from young calves – Characterization and potential as probiotics. *Research in Veterinary Science*, v. 92 p. 342-349, 2012.
- RAMÍREZ, C. **Uso de bactérias lácticas probióticas na alimentação de camarões *Litopenaeus vannamei* como inibidoras de microrganismos patogênicos e estimulantes do sistema imune**. 2005. 153f., Tese (Doutorado em processos biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- SAALFELD, M.H. Uso da silagem de colostro como substituto do leite na alimentação de terneiras leiteiras. *A Hora Veterinária*, v.162, p.59-62, 2008.
- SAALFELD, M.H. PEREIRA, D.I.B.; RODRIGUES K.K.S; SCHRAMM, R.; VALENTE,J.S.S.; BORCHARDTI, J.L.; GULARTE, M.A.; LEITE, F.P.L.; Anaerobically fermented colostrum: an alternative for feeding calves. *Ciência Rural*, v.43, n.9, p.1636-1641, 2013.

10^o

FEPEG

FÓRUM ENSINO • PESQUISA
EXTENSÃO • GESTÃORESPONSABILIDADE SOCIAL: INDISSOCIABILIDADE
ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA

ISSN 1806-549 X

Tabela 1. Contagem média de bastonetes Gram-negativo, fungos filamentosos e leveduras, *Staphylococcus* spp. e *Lactobacillus* spp. em silagem de leite de transição de acordo com o período de coleta após o parto de vacas Holandesas.

Dia após o parto	Bastonetes Gram negativos	Fungos filamentosos e		<i>Staphylococcus</i> spp. (UFC/mL)	Bactérias lácticas (UFC/mL)
		Leveduras			
Terceiro	-	-	-	$2,5 \times 10^2$	$7,4 \times 10^5$
Quarto	-	-	-	$2,5 \times 10^2$	$8,7 \times 10^5$
Quinto	-	-	-	$1,8 \times 10^0$	$5,4 \times 10^5$
Sexto	-	-	-	-	$1,0 \times 10^6$

Tabela 2. Média do pH e índice de acidez titulável em silagem de leite de transição de acordo período de coleta após o parto de vacas Holandesas.

Dia após o parto	pH	Acidez Titulável (°D)
Terceiro	3,67	37,0
Quarto	3,50	35,0
Quinto	3,52	33,0
Sexto	3,63	34,0

°D = Graus Dornic