

MODIFICAÇÕES DA MICROBIOTA LÁCTICA E CONTAMINANTE DURANTE A FERMENTAÇÃO NATURAL DE HORTALIÇAS

ANTONIO EUSTAQUIO RESENDE TRAVASSOS\*  
ANTONIO WILLIAM OLIVEIRA LIMA\*\*  
CRISTINA PAIVA DE SOUSA\*\*\*

Estudou-se o comportamento da microbiota láctica (Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus, Streptococcus) e contaminante (enterobactérias, aeróbios totais a 35°C, coliformes totais, cocos halotolerantes, bolores e leveduras formadoras de película) durante a fermentação natural de pepinos e vagens utilizando-se como substrato o soro desproteinizado de queijo de Coalho (SDQC). Verificou-se que a maior concentração de aeróbios totais, bolores e leveduras e cocos halotolerantes ocorreu no 11º dia de fermentação. Os coliformes totais estiveram presentes até o 3º dia de fermentação nas dornas com pepinos e até o 5º dia nas dornas com vagem. A contagem inicial de coliformes totais foi maior nas dornas com vagem que nas com pepinos. Leveduras oxidativas e bolores, foram inibidos pela adição de 300 ppm de benzoato de sódio adicionados à salmoura, tendo este conservante exercido pouca ação inibitória sobre as bactérias lácticas e leveduras fermentativas, que estiveram presentes ao longo de toda fermentação. As maiores contagens de bactérias produtoras de ácido láctico foram verificadas no Ágar MRS acidificado. Verificou-se também que a presença de Pediococcus pode ter contribuído para retardamento no desenvolvimento de Lactobacillus plantarum.

\* Professor Assistente do Departamento de Tecnologia Rural do Centro de Formação de Tecnólogos da Universidade Federal da Paraíba.

\*\* Professor Adjunto do Departamento de Tecnologia Química e de Alimentos do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba.

\*\*\* Professora Assistente do Departamento de Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba.

## 1 INTRODUÇÃO

As hortaliças possuem microbiota diversificada, uma vez que crescem em ambiente aeróbio e em contato íntimo com o ar, o solo e a umidade. Esta microbiota contaminante é constituída, principalmente, por três grupos de microrganismos: as bactérias lácticas (Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus, Streptococcus), as enterobactérias (Enterobacter, Escherichia, Flavobacterium, Achromobacter, Pseudomonas, etc) e leveduras formadoras de película.

As bactérias lácticas são caracterizadas pelo seu metabolismo fermentativo que resulta na produção de ácido láctico, CO<sub>2</sub>, etanol e ácido acético como metabólitos principais (9). BUCHAMAN e GIBBONS (3), classificam estas bactérias nas famílias Lactobacillaceae, que contêm o gênero Lactobacillus, e Streptococaceae, compreendendo os gêneros Streptococcus, Pediococcus e Leuconostoc.

Em geral, poucas são as espécies de bactérias que participam da fermentação natural de pepinos e vagens, as quais, geralmente, estão presentes numa sequência natural no seu transcorrer (6, 10, 12, 15). Segundo MENEZES (12) e PEDERSON (15) o processo fermentativo pode ser dividido em três fases: na 1<sup>a</sup> fase, encontra-se a presença de microrganismos aeróbicos dos gêneros Flavobacterium, Achromobacter, Pseudomonas e, em menor proporção, Escherichia e Enterobacter; na 2<sup>a</sup> fase, principalmente devido à ação seletiva do sal e dos nutrientes que passaram da hortaliça para a salmoura, desenvolvem-se as bactérias lácticas tais como Streptococcus faecalis, Leuconostoc mesenteroides, Pediococcus cerevisiae, Lactobacillus brevis e Lactobacillus plantarum; na 3<sup>a</sup> fase, predominam apenas as espécies de Lactobacillus homolácticos, heterolácticos, principalmente Lactobacillus plantarum.

Na fermentação natural de hortaliças, os principais tipos de deterioração são:

- a) amolecimento, que pode ser causado por enzimas pectinolíticas das próprias hortaliças ou produzidas por microrganismos. Em geral, leveduras formadoras de película e Bacillus mesentericus fuscus são os responsáveis por esta alteração;
- b) formação de "cavidade" (picles ocos) ou deterioração gasosa, quando provocada por microrganismos, está associada à presença de leveduras fermentativas, bactérias lácticas heterofermentativas e enterobactérias;
- c) escurecimento da salmoura, que pode ocorrer devido a formação de sulfato de ferro ou pela presença de B. nigrificans, formador de pigmento solúvel de cor preta;
- d) salmoura viscosa, devido à presença de vários báculos móveis, gram negativos, encapsulados, ainda não identificados (8, 10, 12, 15). As leveduras, quando presentes, destroem o ácido láctico, provocam hidrólise do material péctico e decompõem proteínas e lípidos, resultando em sabores e odores indesejáveis, além de modificações na textura de produtos (15).

Fatores avaliáveis como concentração salina, temperatura, teor de açúcares fermentescíveis, pH, acidez e anaerobiose poderão influenciar o desempenho adequado desses microrganismos, na fermentação láctica de hortaliças (10, 12, 15, 17).

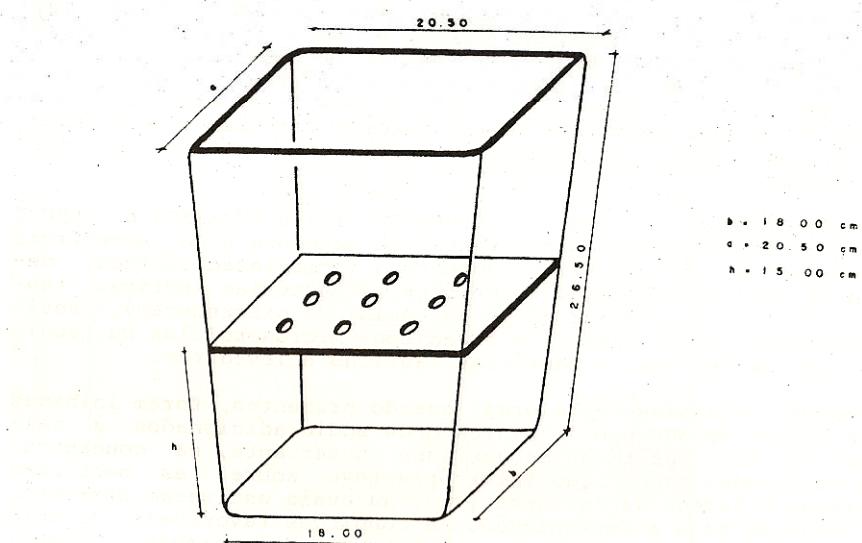
O presente trabalho objetivou verificar o comportamento da microbiota láctica e a presença de grupos de microrganismos indesejáveis (aeróbios totais a 35°C, coliformes totais, cocos halotolerantes, bolores e leveduras) durante a fermentação natural de pepinos e vagens utilizando como substrato o soro desproteinizado de queijo de Coalho.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Preparação das dornas de fermentação

Os ensaios da fermentação de pepinos e vagens foram conduzidos em dornas de PVC, capacidade nominal de 9,0 litros, contendo tampa falsa e recobertas com filme de polietileno (Figura 1). A salmoura foi preparada com soro de queijo de Coalho desproteinizado pelo processo da termocoagulação, com 0,02% de proteína bruta, 3,97% de lactose, traços de gordura, pH 4,80 e acidez 0,39% (18). A concentração salina foi determinada segundo metodologia adotada por GOLDONI (10). As dornas foram mantidas a temperatura de 23°C ± 2°C, durante toda a fermentação.

FIGURA 1 - DORNA DE FERMENTAÇÃO DE PVC COM TAMPA FALSA UTILIZADA NOS EXPERIMENTOS DE FERMENTAÇÃO DE PICLES DE PEPINO E VAGEM



### 2.2 Análises microbiológicas

Ao longo da fermentação natural de pepinos e vagens em dornas contendo salmouras preparadas com soro desproteinizado de queijo de Coalho (SDQC) (18), foram feitas contagens em placas de micror-

ganismos totais (agar plate count), coliformes totais (ágar bile vermelho violeta), cocos halotolerantes (ágar nutritivo caseinato), bolores e leveduras (ágar dextrose batata, acidificado, pH 4,0) e a contagem das bactérias lácticas (MRS acidificado, Lactobacillus selection medium agar e APT ágar, com Tween 80), segundo metodologias recomendadas pela AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (2). Vários meios de cultura foram empregados na contagem de bactérias lácticas, devido aos resultados dispares obtidos por outros autores (9, 13, 14).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A variação do número de aeróbios totais - (AT), cocos halotolerantes - (CH), bolores e leveduras - (BL), coliformes totais - (CT), em função do tempo, durante as fermentações de pepino e vagem em salmoura com soro desproteinizado de queijo de Coalho (SDQC), é mostrada nas Figuras 2 e 3.

A maior concentração de AT, BL e CH ocorreu no 11º dia de fermentação. Os CT só estiveram presentes até o 3º dia nas dornas com pepinos e até o 5º dia nas dornas com vagem, em virtude do aumento de acidez da salmoura, como também relatado por ETCHELLS, FLEMING e BELL (6), FRAZIER (8) e PEDERSON (15). A contagem inicial de CT foi maior nas dornas com vagem que nas com pepinos.

Ácido acético presente no substrato (SDQC) e o ácido láctico produzido durante a fermentação, agiram sinergisticamente inibindo o crescimento de coliformes e de outras enterobactérias, o que segundo ADAMS e HALL (1) explica a estabilidade de vegetais fermentados sem o uso de culturas iniciadoras de fermentação ou emprego de pasteurização. Os mesmos autores verificaram que Salmonella typhimurium e S. enteritidis são inibidas na presença desses ácidos.

Segundo ETCHELLS e JONES (7), PEDERSON (15) e PEDERSON e ALBURY (16), aeróbios típicos provenientes da salmoura e da superfície de hortaliças não sobrevivem durante a fermentação láctica, devido às condições criadas no meio pelas bactérias lácticas (aumento de acidez, diminuição do potencial de oxirredução). Assim as contagens de AT deve-se a organismos microaerófilos ou facultativos, provavelmente bactérias lácticas e leveduras.

Leveduras oxidativas e bolores, quando presentes, foram inibidas pela adição de 300 ppm de benzoato de sódio adicionados à salmoura (8, 15). Verificou-se que esse conservante, na concentração utilizada, pouca ação inibitória teve sobre as bactérias lácticas e leveduras fermentativas, as quais estiveram presentes ao longo de toda a fermentação. As condições favoráveis do meio de fermentação (alta acidez e anaerobiose) como também a composição do substrato (SDQC) podem ter contribuído para a presença de leveduras fermentativas. Essas condições foram também verificadas nos trabalhos de ETCHELLS, FLEMING e BELL (6) e PEDERSON (15).

A presença de lactose no substrato pode ter influenciado a predominância de leveduras fermentativas do gênero Kluyveromyces que de acordo com GUÉRIVIERES (11) utilizam-na como única fonte de carbono.

FIGURA 2 - NÚMERO DE AÉROBIOS TOTAIS, COCOS HALOTOLERANTES, BOLORES E LEVEDURAS E COLIFORMES TOTAIS, EM FUNÇÃO DO TEMPO, NA FERMENTAÇÃO NATURAL DE PICLES DE PEPTINO EM SALMOURA COM 100% DE SDOC

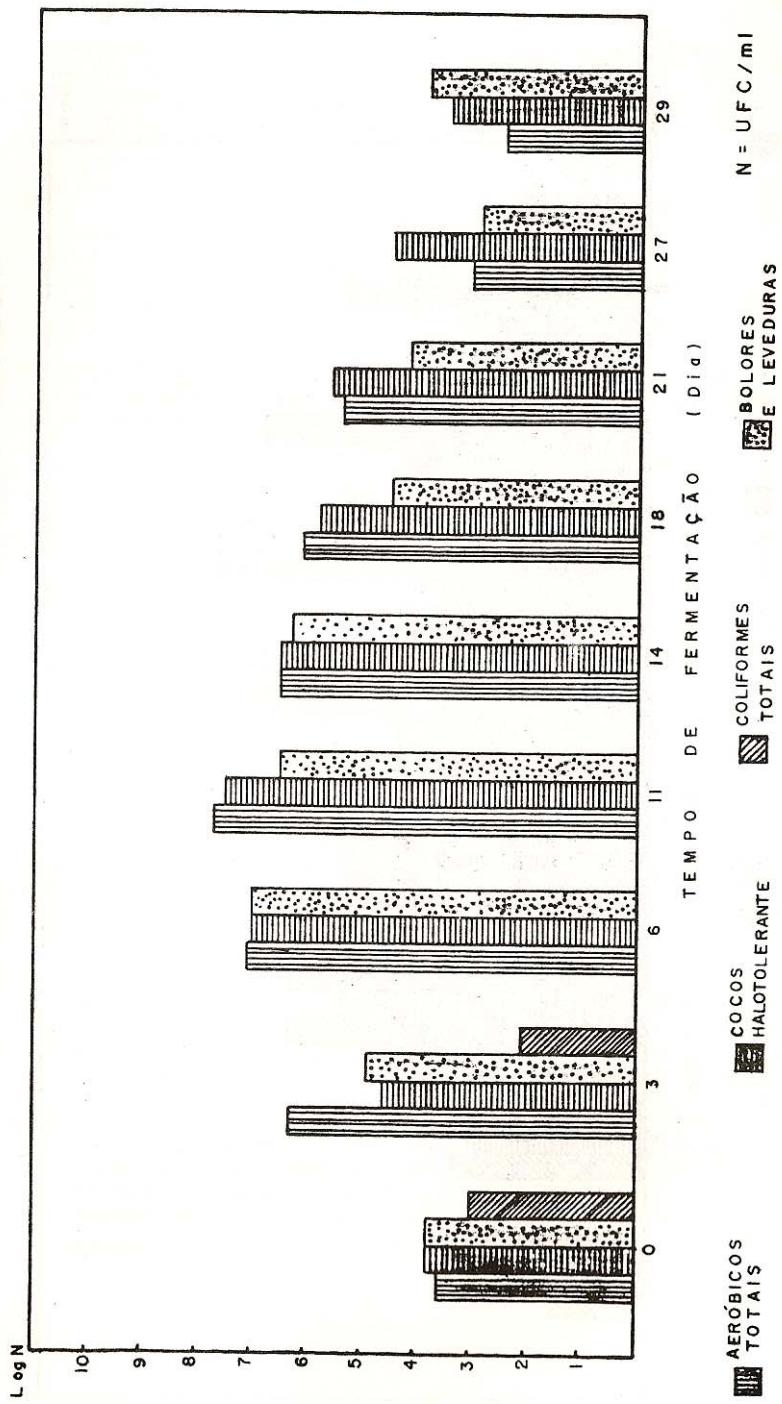
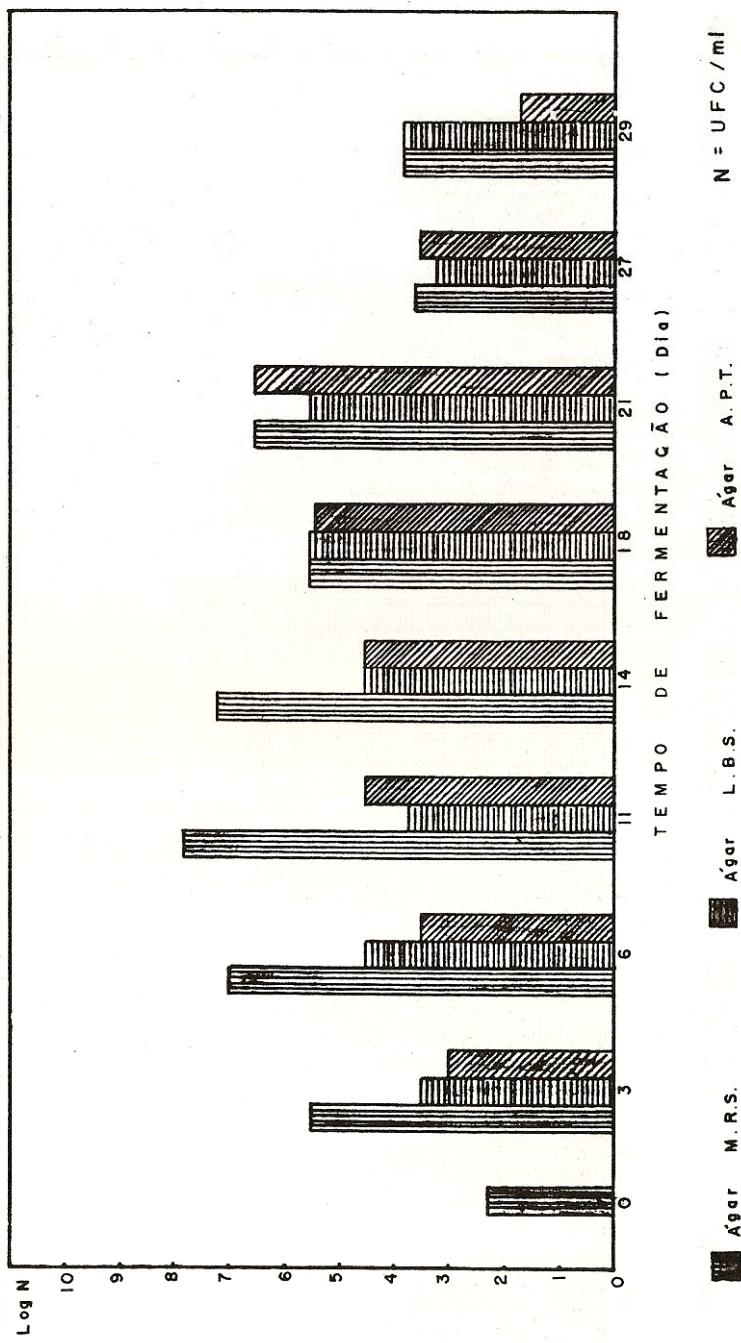


FIGURA 4 - NÚMERO DE BACTÉRIAS PRODUTRAS DE ÁCIDO LÁCTICO, EM FUNÇÃO DO TEMPO, EM DIFERENTES MÉIOS DE CULTURA, NA FERMENTAÇÃO NATURAL DE PICLES DE PEPINO EM SAIMOURA COM 100% DE SDOC



A presença de cocos halotolerantes durante a fermentação de hortaliças foi verificada por diversos autores (6, 10, 15). Dentre esses gêneros, o Leuconostoc caracterizado morfologicamente como cocos aos pares, só esteve presente no início da fermentação devido a sua tolerância à altas concentrações de sal (6). Sucessivos esfregaços preparados a partir de colônias típicas, isoladas de ágar nutritivo caseinato, foram coradas pelo Gram onde verificou-se nítida predominância da presença de cocos em tétrades o que caracteriza o gênero Pediococcus. Não foram observados cocos em cadeia o que pode significar ausência de Streptococcus. A presença de Pediococcus em grande número, pode ter contribuído para retardamento parcial no desenvolvimento de Lactobacillus plantarum.

A variação do número de bactérias produtoras de ácido láctico (BPAL) em função do tempo durante as fermentações de pepino e de vagem em salmoura com SDQC é mostrada nas Figuras 4 e 5.

Dos meios empregados para contagem de BPAL os maiores níveis de crescimento foram verificados no Ágar MRS acidificado a pH 5,0 (4). Segundo GERALDINI et al (9), esse meio quando inoculado com cultura pura de diversas bactérias lácticas, foi o mais adequado para o crescimento dos gêneros Lactobacillus, Streptococcus, Pediococcus e Leuconostoc, embora algumas espécies destes gêneros tenham apresentado baixas contagens.

O Ágar LBS modificado pelo ajuste do pH para 5,4 ± 0,2 com ácido acético e, a adição de 0,0075% de verde brilhante (2), apresentou menores contagens, o que se deve a sua seletividade para o gênero Lactobacillus. As maiores contagens, com esse meio ocorreram nas dornas com vagem ( $10^6$ UFC/ml). Verificou-se nesse mesmo experimento (Figura 3), que entre o 15º e 28º dias as maiores contagens foram verificadas no Ágar LBS o que pode estar associado a alta acidez e ao baixo pH da salmoura favorecendo o crescimento de espécies do gênero Lactobacillus, principalmente Lactobacillus plantarum. Essa predominância foi confirmada através da caracterização morfológica das colônias isoladas do Ágar LBS. Tal fato não se verificou na fermentação de pepinos, onde as contagens em Ágar LBS foram sempre menores.

Em Ágar APT as BPAL apresentaram, ao longo da fermentação, crescimento mais uniforme. Nas dornas com pepino, o máximo de crescimento ocorreu no 21º dia, havendo em seguida, redução de 4 ciclos decimais até o 29º dia, apresentando contagem final de microrganismos menor que a inicial, e nas dornas com vagem, no 11º dia de fermentação permanecendo invariável a partir do 24º dia. Esse meio, pela presença de tiamina na sua composição, permite acentuado desenvolvimento de Lactobacillus, Streptococcus e Leuconostoc (5, 9). DEIBEL, EVANS e NIVEN (5) e GERALDINI et al (9) verificam que Lactobacillus plantarum e Pediococcus cerevisiae cresceram satisfatoriamente nesse meio, enquanto que Leuconostoc mesenteroides apresentou baixas contagens.

FIGURA 3 - NÚMERO DE AÉROBICOS TOTAIS, COCOS HALOTOLERANTES, BOLORES E LEVEDURAS E COLIFORMES TOTAIS, EM FUNÇÃO DO TEMPO, NA FERMENTAÇÃO NATURAL DO PICLES DE VAGEM EM SALMOURA COM 100% DE SDOC

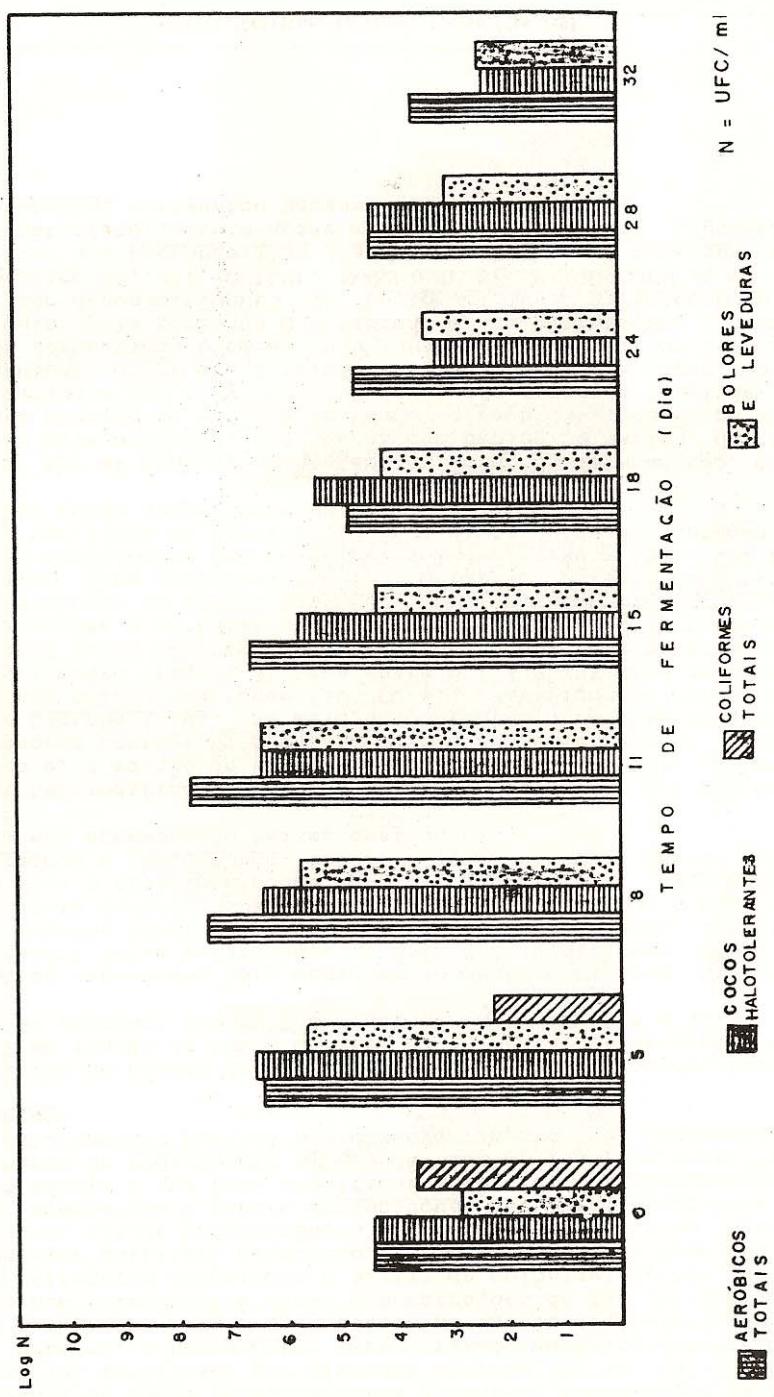
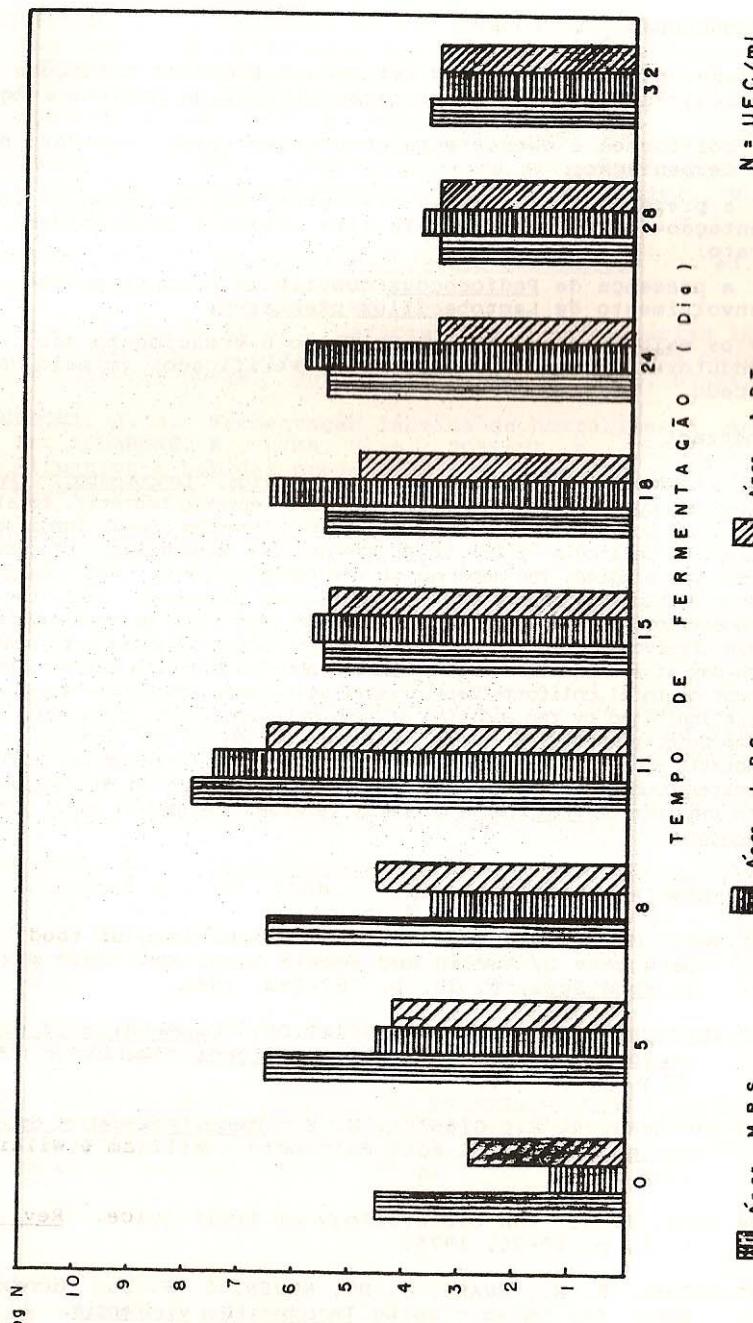


FIGURA 5 - NÚMERO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE ÁCIDO LÁCTICO, EM FUNÇÃO DO TEMPO, EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA, NA FERMENTAÇÃO NATURAL DE PICLES DE VAGEM EM SALMOURA COM 100% DE SDOC



N = UFC/ml

Agar A.P.T.

Agar L.B.S.

Agar M.R.S.

#### 4 CONCLUSÃO

Algumas conclusões gerais relacionadas com as condições microbiológicas durante a fermentação natural de pepinos e vagens foram:

- a) coliformes e outras enterobactérias foram inibidas no início da fermentação;
- b) a presença de leveduras fermentativas, ao longo de toda a fermentação foi favorecida pela alta acidez e anaerobiose do substrato;
- c) a presença de Pediococcus contribuiu para retardamento no desenvolvimento de Lactobacillus plantarum;
- d) os maiores níveis de recuperação e crescimento das bactérias produtoras de ácido láctico foram verificados em meio MRS acidificado.

#### Abstract

The behaviour of lactic bacteria (Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus, Streptococcus) and contaminating organisms (enteric bacteria, total aerobic incubated to 35°C, total coliforms, salt-tolerating cocci, fungi and yeast forming pellicula film) during the natural fermentation of cucumbers and beans was studied. The substrat to the fermentations was desproteinized serum of "Coelho" cheese (SDCC). The results indicated that the greater concentration of total aerobic, fungi and yeast, and salt-tolerating cocci, were observed in the 11th of fermentation. Total coliform were observed till 3th day of fermentation with cucumbers and 5th day with beans. The initial count of total coliforms were greater with beans. Oxidative yeast and fungi were inhibited by the addition of sodium benzoate (300 ppm). This conservant have done, probably, a little inhibitory action to the growth of lactic bacteria and fermenting yeast, observed in all fermentation process. The greater count of bacteria producing lactic acid were in MRS medium acidified. The presence of Pediococcus probably retarded the growth of Lactobacillus plantarum.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01 ADAMS, M. R., HALL, C. J. Growth inhibition of food borne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures. *J. Food Sci.*, v. 23, p. 287-292, 1988.
- 02 AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Compendium of methods for microbiological examination of foods. Washington : APHA, 1976. 701 p.
- 03 BUCHANAN, R. E., GIBBONS, N. E. Berger's manual of determinative bacteriology. 8. ed. Baltimore : William & Wilkins, 1974. 1268 p.
- 04 CARR, J. G. The bacteriology of fruit juice. *Rev. Microb.*, v. 6, p. 18-26, 1975.
- 05 DEIBEL, R. H., EVANS, J. B., NIVEN, C. F. J. Microbiological assay for thiamin using Lactobacillus viridencis. *J. Bact.*, v. 74, p. 818-821, 1957.

- 06 ETCHELLS, J. L., FLEMING, H. P., BELL, T. A. Factors influencing the growth of lactic acid bacteria during the fermentation of brined cucumbers. In: CARR, J. G., CUTTING, C. V., WHITTING, G. C. Lactic acid bacteria in beverages and food. London : Academic Press, 1975. p. 281-305.
- 07 ETCHELLS, J. L., JONES, I. Characteristics of lactic bacteria from commercial cucumbers fermentation. J. Bacteriol., v. 52, p. 593-599, 1946.
- 08 FRAZIER, W. C. Microbiologia de los alimentos. 2. ed. Zaragoza : Acribia, 1976. 512 p.
- 09 GERALDINI, A. M. et al. Caracterização de bactérias lácticas em alimentos. I. Avaliação de meios sólidos para contagens de culturas puras. Bol. ITAL, v. 16, n. 1, p. 53-64, 1979.
- 10 GOLDONI, J. S. Fermentação láctica de hortaliças e azeitonas. In: AQUARONE, E., LIMA, U. A., BORZANI, W. Biotecnologia-Alimentos e bebidas produzidos por fermentação. São Paulo : Edgard Blucher, 1983. p. 149-175.
- 11 GUÉRIVIERI, J. F. Les levures lactiques cultivées sur lactosérum dé protéine. La Technique Laitéri, v. 952, p. 89-92, 1981.
- 12 MENEZES, T. J. B. Fabricação de picles. Bol. ITAL, v. 8, p. 1-14, 1966.
- 13 MORENO, I., VALE, J. L. E. do, GARCIA, S., VAN DENDER, A. G. F. Isolamento e seleção tecnológica de Streptococcus cremoris a partir de leite cru. Bol. ITAL, v. 23, p. 409-424, 1986.
- 14 OLIVEIRA, J. S., GARCIA, S. Isolamento e caracterização de culturas lácticas. Rev. IICT, v. 40, n. 239, p. 19-30, 1985.
- 15 PEDERSON, C. S. Microbiology of food fermentation. 2. ed. Connecticut : AVI, 1979. 384 p.
- 16 \_\_\_\_\_, ALBURY, M. N. Factors affecting the bacterial flora in fermenting vegetables. Food Res., v. 18, p. 290-300, 1953.
- 17 PRESCOTT, S. C., DUNN, C. G. Industrial microbiology. 3. ed. New York : McGraw-Hill, 1959. 945 p.
- 18 TRAVASSOS, A. E. R. Utilização do soro de queijo de Coalho na fermentação natural de hortaliças. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal da Paraíba, 1991. 131 p.