

DIVERSIDADE FENOTÍPICA DE BACTÉRIAS PRESENTES EM FRUTOS DE MORANGO
(*Fragaria ananasa*) ORGÂNICO

GILBERTO VINÍCIUS DE MELO PEREIRA¹; KARINA TEIXEIRA MAGALHÃES²; GLÁUCIA MARA MOREIRA³; VANESSA MARIA PEREIRA⁴; MONIQUE SUELA SILVA⁵; ROSANE FREITAS SCHWAN⁶

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo isolar e identificar bactérias de frutos de morango (*Fragaria ananasa*) orgânico. A população bacteriana (UFC g⁻¹) de aeróbios mesófilos, enterobactérias, bactérias do ácido láctico e bactérias do ácido acético foram realizadas em meio ágar nutriente (AN), eosina azul de metileno (EMB), De Man Rogosa Sharpe (MRS) e agar etanol carbonato de cálcio (MYG), respectivamente. Bactérias mesofílicas foi o grupo predominante, apresentando população em torno 7,9 x 10⁴ UFC g⁻¹. A população de bactérias do ácido láctico e enterobactérias foram semelhantes, apresentando população em torno de 1,14x10³ UFC g⁻¹ e 1,17x10³ UFC g⁻¹, respectivamente. Não foram detectadas bactérias do ácido acético em contagens com nível de detecção de 10 UFC g⁻¹. Um total de 102 isolados foi selecionado para identificação com base em suas características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas. Os isolados foram divididos em três famílias: Enterobacteriaceae (Gram-negativo, motilidade-negativo, esporulação-negativo, oxidase-negativo e catalase-positivo), Bacillaceae (Gram-positivo, catalase-positivo, motilidade-positivo, esporulação-positivo e oxidase-negativo) e Lactobacillaceae (Gram-positivo catalase-negativo, motilidade-negativo, esporulação-negativa e oxidase-negativo). A comunidade bacteriana deteriorante associada ao morango cultivado em sistema orgânico constituiu-se de bactérias Gram-negativas das espécies *Klebsiella ozaenae*, *Serratia liquefaciens* e *Hafnia alvei*, que potencialmente podem ser prejudiciais ao consumidor; além da espécie deterioradora Gram-positiva *Lactobacillus coprophilus* e bactérias formadoras de esporos do gênero *Bacillus*.

Palavras-chaves: Morango (*Fragaria ananasa*), comunidade bacteriana, identificação fenotípica

INTRODUÇÃO

Perdas durante o transporte e armazenagem de frutas são principalmente causadas por desordens fisiológicas ou microbiológicas. Os principais microrganismos patogênicos e deteriorantes provêm do solo, água de irrigação, água utilizada para aplicar fungicidas e inseticidas, poeira, insetos e manipulação humana (TERREZZAN et al., 2006). Para viabilizar a produção de frutas, é necessário o uso de muitos agroquímicos, fazendo com que esta cultura apresente-se com uma imagem extremamente negativa perante o público consumidor devido ao uso incorreto de agrotóxicos por parte dos produtores. A agricultura orgânica apresenta-se como uma boa alternativa na produção de alimentos mais saudáveis.

O morango é uma importante cultura no Brasil, sendo os estados de Minas Gerais e São Paulo os maiores produtores da América Latina (CORDENUNSI et al., 2002). O sistema de cultivo orgânico do morango minimiza o impacto ambiental sem prejudicar a produção, garantindo ao mesmo tempo a

¹ Mestrando em Microbiologia Agrícola, DBI/UFLA, gilbertovinicius@gmail.com

² Doutoranda em Microbiologia Agrícola, DBI/UFLA e UMINHO/Portugal, gt-magalhaes@uol.com.br

³ Mestranda em Microbiologia Agrícola, DBI/UFLA, moreira.glaucia@gmail.com

⁴ Mestranda em Microbiologia Agrícola, DBI/UFLA, vannbiology@yahoo.com.br

⁵ Mestranda em Microbiologia Agrícola, DBI/UFLA, monique0901@yahoo.com.br

⁶ Professor Adjunto, DBI/UFLA, rschwan@dbi.ufla.br

sustentabilidade do solo, da água e da biodiversidade, além de oferecer morangos saudáveis para o consumidor (TERRAZZAN et al., 2006).

Açúcares são os principais componentes solúveis em frutos de morango sadios, que apresentam também alta umidade e acidez, e, portanto, são susceptíveis ao ataque de microrganismos patogênicos e deteriorantes (CORDENUNSI et al., 2002). A qualidade microbiológica no período de pré-colheita do morango associado ao cultivo orgânico é importante para que danos não sejam agravados na pós-colheita. Assim, o presente trabalho teve como objetivo isolar e identificar bactérias associadas ao morango (*Fragaria ananasa*) cultivado em sistema orgânico.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

Os frutos de morango orgânico foram adquiridos no Setor de Holericultura (horta) da Universidade Federal de Lavras, em Lavras/MG. Os frutos foram coletados assepticamente seguindo uma amostragem significativa, referente ao número de canteiros cultivados no setor Holericultura/UFLA. Os frutos foram transportados assepticamente para o Laboratório de Microbiologia do Departamento de Biologia da UFLA, onde foram selecionados de acordo com a uniformidade de cor, tamanho e ausência de injúrias mecânicas e fisiológicas. As análises microbiológicas foram feitas com porções de 25g do morango, pesados assepticamente e homogeneizados com 225 mL de água peptonada 0,1%. A homogeneização foi feita em Stomacher® (Seward, Reino Unido). Diluições decimais apropriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6}) foram preparadas e alíquotas dessas diluições foram transferidas para meios específicos para a determinação de grupos microbiológicos.

Contagem total de aeróbios mesófilos, bactérias do ácido láctico, bactérias do ácido acético e enterobactérias

As contagens totais de aeróbios mesófilos, enterobactérias e bactérias do ácido acético foram realizadas pela técnica de espalhamento em superfície, inoculando-se uma alíquota de 0,1 mL das diluições em ágar nutriente (AN), ágar eosina azul de metileno (EMB) e ágar etanol carbonato de cálcio (MYG), respectivamente, ambos acrescidos de 400 mg/1.000mL de nistatina (Sigma, St. Louis, USA). As placas foram incubadas a 35°C para bactérias mesófilas e 37°C para enterobactérias.

A contagem padrão de bactérias do ácido láctico foi realizada pela técnica de plaqueamento em profundidade (*pour plate*), utilizando meio de cultura - MRS ágar (De Man Rogosa Sharpe). As placas foram incubadas a 28°C por 48 horas.

Após o período de incubação procedeu-se a contagem de células viáveis. As colônias crescidas nas placas foram classificadas de acordo com as características e as estruturas morfológicas, buscando caracterizar os diferentes morfotipos crescidos nos meios de cultivo. Foi realizada contagem total dos morfotipos encontrados, identificando-se o tipo de meio cultivado, a amostra, a diluição e a triplicata. A partir da contagem total, foi selecionada para o isolamento dos diferentes morfotipos, uma placa de cada meio e diluição cuja contagem se encontrasse entre 30 e 300 colônias.

Purificação e caracterização dos isolados

Após o período de incubação das placas, os isolados foram purificados utilizando sucessivas repicagens, através da técnica de estria composta em placa de Petri, para obtenção das células puras e colônias isoladas. Para a certificação da pureza das bactérias, foram realizados testes pela técnica de Coloração Diferencial de Gram. As bactérias foram submetidas à realização de testes específicos: coloração de Gram, catalase, motilidade, esporulação e oxidase.

Identificação de bactérias Gram-positivas

Através das instruções contidas no *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (HOLT et al., 1994), bactérias Gram-positivas foram separados em grupos quanto às características semelhantes para identificação dos gêneros. A identificação em nível de espécie foi realizada por provas bioquímicas através do Kit API 50 CHL (BioMerieux) (MAGALHÃES et al., 2010).

Identificação de bactérias Gram-negativas

Para a identificação de bactérias Gram-negativa e oxidase-negativa foram utilizados os kits Bac tray I e II (Difco, USA) (MAGALHÃES et al., 2010). A identificação das espécies foi realizada pela soma dos resultados positivos, conforme o manual do fabricante (DIFCO), por meio da análise de um software.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Comunidade microbiana

O morango apresenta elevada quantidade de água e nutrientes, assim, diferentes grupos de microrganismos tornam-se preponderantes neste fruto; o crescimento de bactérias lácticas e leveduras são favorecidos devido ao pH mais baixo nesta fruta (TORREZAN et al., 2000). A qualidade microbiológica no período de pré-colheita do morango associado ao cultivo orgânico é importante para que danos não sejam agravados na pós-colheita.

A população bacteriana (UFC g⁻¹) presente em amostras de morango orgânico foi obtida durante o período de pré-colheita (Tabela 1).

Tabela 1. Enumeração de bactérias isoladas em morango orgânico no período de pré-colheita.

Diluições	MEIOS								
	MRS			AN			EMB		
	Placa A	Placa B	log ₁₀ ufc/g	Placa A	Placa B	log ₁₀ ufc/g	Placa A	Placa B	log ₁₀ ufc/g
10 ⁻¹	181	102	3,06	>300	>300	*	105	130	3,07
10 ⁻²	<300	<300	*	>300	>300	*	<300	<300	-
10 ⁻³	ND	ND	*	70	89	4,9	<300	<300	-
10 ⁻⁴	ND	ND	*	<300	<300	*	ND	ND	-
10 ⁻⁵	ND	ND	*	ND	ND	*	ND	ND	.*

< (menor), > (maior), ND = não detectado.

Bactérias mesofílicas foi o grupo predominante, apresentando população em torno de 7,9x10⁴ UFC g⁻¹. Frutas cultivadas e colhidas em temperatura ambiente nos países de clima quente, como o Brasil, são comuns a predominância de bactérias mesofílicas. A população de bactérias do ácido láctico e enterobactérias foram semelhantes, apresentando população em torno de 1,14x10³ UFC g⁻¹ e 1,17x10³ UFC g⁻¹, respectivamente. Não foram detectadas bactérias do ácido acético em contagens com nível de detecção de 10 UFC g⁻¹. O crescimento de bactérias do ácido láctico foi favorecido pela alta concentração de açúcares e pH mais ácido do morango (~3,5).

Entre as bactérias Gram-negativas, enterobacteriáceas e pseudomonáceas, são as mais frequentemente isoladas em vegetais. No presente estudo, oito diferentes morfotipos foi identificado como bactérias Gram-negativas e três como bactérias Gram-positivas. Estudo bioquímico dos diferentes morfotipos encontrados resultou na identificação de três diferentes famílias associadas ao morango orgânico: Enterobacteriaceae (Gram-negativo, motilidade-negativo, esporulação-negativo, oxidase-negativo e catalase-positivo), Bacillaceae (Gram-positivo, catalase-positivo, motilidade-positivo, esporulação-positivo e oxidase-negativo) e Lactobacillaceae (Gram-positivo catalase-negativo, motilidade-negativo, esporulação-negativa e oxidadse-negativo). A Tabela 2 mostra uma lista dos gêneros e espécies de bactérias identificadas.

XIX CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA
27 de setembro a 01 de outubro de 2010

Tabela 2. Identificação de bactérias isoladas em morango orgânico e suas principais características bioquímicas.

Morfotipo	Coloração de Gram	Reação de Catalase	Teste de Motilidade	Teste de Esporulação	Teste de Oxidase	Bactéria		
						Família	Gênero	Espécie
I1.1	-	+	-	-	-	Enterobacteriaceae	<i>Klebsiella</i>	<i>K. ozoenae</i>
I1.2	-	+	-	-	-	Enterobacteriaceae	<i>Klebsiella</i>	<i>K. ozoenae</i>
I2.1	+	+	+	+	-	<u>Bacillaceae</u>	<i>Bacillus</i>	Não identificado
I2.2	+	+	+	+	-	<u>Bacillaceae</u>	<i>Bacillus</i>	Não identificado
I3.1	-	+	-	-	-	Enterobacteriaceae	<i>Klebsiella</i>	<i>K. ozoenae</i>
I3.2	-	+	-	-	-	Enterobacteriaceae	<i>Klebsiella</i>	<i>K. ozoenae</i>
I4.1	+	+	+	+	-	<u>Bacillaceae</u>	<i>Bacillus</i>	Não identificado
I4.2	+	+	+	+	-	<u>Bacillaceae</u>	<i>Bacillus</i>	Não identificado
I5.1	-	+	-	-	-	Enterobacteriaceae	<i>Serratia</i>	<i>S. liquefaciens</i>
I5.2	-	+	-	-	-	Enterobacteriaceae	<i>Serratia</i>	<i>S. liquefaciens</i>
EM1.1	-	+	-	-	-	Enterobacteriaceae	<i>Klebsiella</i>	<i>K. ozoenae</i>
EM1.2	-	+	-	-	-	Enterobacteriaceae	<i>Klebsiella</i>	<i>K. ozoenae</i>
EM2.1	-	+	-	-	-	Enterobacteriaceae	<i>Hafnia</i>	<i>H. alvei</i>
EM2.2	-	+	-	-	-	Enterobacteriaceae	<i>Hafnia</i>	<i>H. alvei</i>
EM3.1	-	+	-	-	-	Enterobacteriaceae	<i>Klebsiella</i>	<i>K. ozoenae</i>
EM3.2	-	+	-	-	-	Enterobacteriaceae	<i>Klebsiella</i>	<i>K. ozoenae</i>
M1.1	+	-	-	-	-	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>	<i>L. coprophilus</i>
M1.2	+	-	-	-	-	Lactobacillaceae	<i>Lactococcus</i>	<i>L. coprophilus</i>
M1.3	+	-	-	-	-	Lactobacillaceae	<i>Lactococcus</i>	<i>L. coprophilus</i>
M2.1	+	-	-	-	-	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>	<i>L. coprophilus</i>
M2.2	+	-	-	-	-	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>	<i>L. coprophilus</i>
M2.3	+	-	-	-	-	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>	<i>L. coprophilus</i>
M2.4	+	-	-	-	-	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>	<i>L. coprophilus</i>
M3.1	+	+	+	+	-	<u>Bacillaceae</u>	<i>Bacillus</i>	Não identificado
M3.2	+	+	+	+	-	<u>Bacillaceae</u>	<i>Bacillus</i>	Não identificado

XIX CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFPA
27 de setembro a 01 de outubro de 2010

Foi possível identificar isolados pertencentes aos gêneros *Klebsiella*, *Hafnia*, *Serratia*, *Bacillus* e *Lactobacillus*. Os morfotipos EM1, EM3, I1, I2 foram identificados como *Klebsiella ozoenae* (Tabela 3); esta espécie foi a mais frequentemente encontrada, com população estimada de $8,2 \times 10^2$ UFCc g⁻¹ em meio EMB e $1,95 \times 10^4$ UFCc g⁻¹ em meio AN (Tabela 3).

Tabela 3. Enumeração das espécies de bactérias isoladas em morango orgânico.

	MORFOTIPOS	PLACA A	PLACA B	DILUIÇÕES	UFC g ⁻¹
BEM					
EMB (C.T)	EM1, EM2, EM3	105	130	10 ⁻¹	1, 17 X 10 ³
<i>K. ozoenae</i>	EM1, EM3	75	89	10 ⁻¹	8,20 x 10 ²
<i>H. alvei</i>	EM2	30	41	10 ⁻¹	3,55 x 10 ²
NA					
AN (C.T)	I1, I2, I3, I3, I4	70	89	10 ⁻³	7,9 X 10 ⁴
<i>K. ozoenae</i>	I1, I3	10	29	10 ⁻³	1,95 x 10 ⁴
<i>Bacillus sp</i>	I2, I4	40	51	10 ⁻³	4,55 x 10 ⁴
<i>S. liquefaciens</i>	I5	20	09	10 ⁻³	1,45 x 10 ⁴
MRS					
MRS (C.T)	M1, M2, M3	181	102	10 ⁻¹	1, 14 X 10 ³
<i>L. coprophilus</i>	M1, M2	125	97	10 ⁻¹	1,11 x 10 ³
<i>Bacillus SP.</i>	M3	56	05	10 ⁻¹	3,05 x 10 ²

Os morfotipos I5 e EM2 foram identificados como *Serratia liquefaciens* (população estimada de $1,45 \times 10^4$ UFCc g⁻¹ em meio AN) e *Hafnia alvei* (população estimada de $3,55 \times 10^2$ UFCc g⁻¹ em meio EMB), respectivamente (Tabela 3). Estas espécies apresentaram em forma de bacilos imóveis e são frequentemente encontrados em trabalhos relacionados com aspectos clínicos. *Hafnia*, *Klebsiella* e *Serratia* são bactérias oxidase-negativa, frequentemente encontradas no solo, água, grãos, frutas e vegetais.

Bactérias Gram-positivas não formadoras de esporos, pertencentes ao grupo de bactérias lácticas, apresentaram em dois diferentes morfotipos, M1 e M2 (Tabela 3). Estes isolados foram identificados como *Lactobacillus coprophilus*, apresentando população estimada de $1,11 \times 10^3$. *Lactobacillus coprophilus* foi caracterizado pela utilização de diferentes substratos, como D-arabinose, L-arabinose, ribose, galactose, glucose, fructose, manose, manitol, α-D-manosídeo de metilo, N-acetil-glucosamina, amigdalina, arbutina, esculina, salicina, celiobiose, maltose, sasarose, trealose, gentiobiose. Bactérias do ácido láctico estão amplamente distribuídas na natureza (MAGALHÃES et al., 2010) e produzem como deterioração típica, gás, limosidade e/ou líquido esbranquiçado. As bactérias do ácido láctico de importância como deteriorantes de alimentos são do gênero *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Paralactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* e *Weissella* (TORREZAN et al., 2000). Entretanto, o uso de bactérias do ácido láctico - como a espécie dominante *Lactobacillus coprophilus* encontrada neste estudo - pode ser uma alternativa como bioprotetores do morango, porque elas estão aptas a proliferar em substratos do morango e controlar o desenvolvimento de patógenos, além de microrganismos deteriorantes (COELHO et al., 2003).

Os morfotipos I2, I4 e M3 foram identificados como membros do gênero *Bacillus*. Há mais de 191 espécies e 4 subespécies descritas no gênero *Bacillus*, sendo a maioria dos bacilos saprófitos e não patogênicos para os animais. Entretanto, é conhecido que o grupo *B. cereus* - composto pelas espécies *B. thuringiensis*, *B. anthracis* e *B. cereus* - são espécies patogênicas e comumente encontradas em solo, planta e alimentos não processados.

CONCLUSÃO

A comunidade bacteriana associada ao morango cultivado em sistema orgânico constituiu-se de bactérias Gram-negativas das espécies *Klebsiella ozaenae*, *Serratia liquefaciens* e *Hafnia alvei*, que potencialmente podem ser prejudiciais ao consumidor; além da espécie deterioradora Gram-positiva *Lactobacillus coprophilus* e bactérias formadoras de esporos do gênero *Bacillus*. Os resultados informados neste estudo demonstraram que o número relativo de bactérias deteriorantes associadas ao morango orgânico foi notável e medidas de controle dos mesmos são necessárias. Entretanto, estudos futuros de identificação molecular destes isolados, bem como por técnicas moleculares independentes de cultivo (análise em eletroforese de gel de gradiente desnaturante (DGGE)), serão realizados para confirmação destes resultados.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES e CNPq por suporte financeiro e ao Setor de Holericultura (horta) da Universidade Federal de Lavras, em Lavras/MG, pelo fornecimento dos frutos para análise.

REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

COELHO, A. R.; HOFFMANN, F. L.; HIROOKA, E. Y. Biocontrole de doenças pós-colheita de frutas por leveduras: perspectivas de aplicação e segurança alimentar. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 2, p. 337-35, jul./dez. 2003.

CORDENUNSI, B. R.; OLIVEIRA DO NASCIMENTO, J.R.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Influence of cultivar on quality parameters and chemical composition of strawberry fruits grown in Brazil. **Journal Agriculture Food Chemistry**, Chicago, v. 50, n. 9, p. 2581-2586. 2002.

HOLT, J.G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P.H.A.; STANLEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. **Bergey's 485 Manual of Determinative Bacteriology**, 9 ed. Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 1994, p. 486-787.

KENNEDY, A.C. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agriculture, ecosystems and Environment**, v. 74, p.65-76, 1999.

MAGALHÃES, K.T.; PEREIRA, G.V.M.; DIAS, D.R.; SCHWAN, R.F. Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 1241-1250. 2010.

TERREZZAN, P.; AGUILA, J. S. del; HEIFFIG, L. S.; KLUGE, R. A. Physicochemical characterization of refrigerated strawberries from conventional and organic crop systems. **Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha**. v.8, n.1, p. 33-37, 2006

TORREZAN, R.; UBOLDI EIROA, M. N.; PFENNING.L. Identificação de microrganismos isolados em frutas, polpas e ambiente industrial. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos (CEPPA)**, Curitiba, v. 18, n. 1, p. 2738, jan./jun.2000.