

MÔNICA PACHECO DA SILVA

**PROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS BACTERIOCINOGÊNICAS EM
SILAGENS DE ESTILOSANTES**

Dissertação apresentada a
Universidade Federal de Viçosa como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola, para obtenção do título
Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011

RESUMO

SILVA, Mônica Pacheco da, Universidade Federal de Viçosa, julho de 2011. **Prospecção de bactérias lácticas bacteriocinogênicas em silagens de estilosantes.** Orientador Hilário Cuquetto Mantovani. Coorientadores: Odilon Gomes Pereira e Célia Alencar de Moraes.

A silagem é uma forma de forragem conservada obtida por meio da fermentação da forrageira pelas bactérias lácticas, que convertem os carboidratos solúveis em ácido láctico. Este ácido é responsável por reduzir o pH da massa ensilada, inibindo o crescimento de micro-organismos deterioradores e patogênicos, sem interferir com as características nutricionais da cultura ensilada. Além do ácido láctico, as bactérias lácticas podem produzir outros compostos antimicrobianos, como as bacteriocinas. Neste estudo, foram isoladas 256 culturas de bactérias lácticas da silagem de Estilosantes Campo Grande, em diferentes períodos de fermentação. Dos 256 isolados de bactérias lácticas obtidos, 83% (214) demonstraram atividade antagonista contra o micro-organismo indicador. Dentre estes, apenas 10% foram capazes de crescer em meio basal. Análise da diversidade genética de 20 isolados foi realizada por BOX-PCR. Oito isolados de bactérias lácticas que apresentaram alta atividade antagonista e elevada velocidade de crescimento foram selecionados e o perfil de fermentação de 49 carboidratos permitiu a identificação desses isolados como *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici* e *Lactobacillus plantarum*. A análise do gene 16S rDNA mostrou a mesma identificação. O extrato bruto da substância antimicrobiana semelhante a bacteriocina (Blis) de três isolados de bactérias lácticas inibiu o crescimento do micro-organismo indicador, e a atividade antagonista do extrato também foi observada após a neutralização do pH (pH 7,0) com NaOH. A atividade antagonista do extrato bruto da Blis foi perdida após o tratamento com enzimas proteolíticas. Estes tres isolados de bactérias lácticas demonstraram amplo espectro de atividade antagonista, inibindo várias espécies de micro-organismos diferentes. A característica antimicrobiana destes isolados observada neste trabalho, associada com outros parâmetros fisiológicos de crescimento e fermentação faz com que as culturas de bactérias lácticas isoladas de silagem de Estilosantes Campo Grande sejam candidatos potenciais para serem avaliados como inoculantes em silagens de leguminosas.

ABSTRACT

SILVA, Mônica Pacheco da. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2011. **Prospection of bacteriocinogenic lactic bacteria in estilosantes silage.** Adviser: Hilário Cuquetto Mantovani. Co-advisers: Odilon Gomes Pereira and Célia Alencar de Moraes.

Silage is a sort of conserved fodder obtained through the fermentation of forage by lactic bacteria, which convert the soluble carbohydrates in lactic acid. This acid is responsible for reducing the pH of the ensiled mass, inhibiting the growth of deteriorating and pathogenic microorganisms, with no interference in the nutritional features of the ensiled culture. In addition to the lactic acid, the lactic bacteria may produce other antimicrobial compounds, such as the bacteriocins. In the present study, it was isolated 256 cultures of lactic bacteria from Estilosantes Campo Grande, in varied periods of fermentation. Among the 256 isolates obtained, 83% (214) displayed antagonist activity against the indicator microorganism. Among these, only 10% were capable of growing in basal medium. An analysis of the genetic diversity of 20 isolates was done by BOX-PCR. Eight isolates of lactic bacteria which presented high antagonist activity and elevated growth rate were selected and their fermenting profile in 49 carbohydrates sources allowed the identification of these isolates, such as *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici* e *Lactobacillus plantarum*. The analysis of the 16S rDNA showed the same identification. The crude extract of the antimicrobial substance similar to bacteriocin (Blis) of three isolates inhibited the growth of the indicator microorganism, and the antagonist activity was also observed after pH neutralization (pH 7,0) with NaOH. The antagonist activity of the Blis crude extract was lost after the treatment with proteolytic enzymes. These three lactic acid bacteria isolates presented a broad spectrum of antagonist activity, inhibiting several species of different microorganisms. The antimicrobial feature of these isolates observed in this in this work, associated with other growth and fermentation physiological parameters shows that the lactic bacteria cultures isolated in silage from Estilosantes Campo Grande are potential candidates to be evaluated as inoculants in legume silage.