

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE MICRORGANISMOS ISOLADOS DE GRÃOS DE *KEFIR* CONTRA *Salmonella* ENTERITIDIS*

DIAS², Priscila Alves; SILVA², Daiani Teixeira; TEJADA², Talita Schneid; GONZALEZ¹, Helenice de Lima; TIMM¹, Cláudio Dias

¹Professores de Inspeção de Leite e Derivados, Faculdade de Veterinária, UFPel.

²Pós-Graduandas em Medicina Veterinária, Faculdade de Veterinária, UFPel.

1 INTRODUÇÃO

A fermentação do leite por grãos de *kefir* constituídos por uma microbiota de bactérias ácido-lácticas e leveduras dá origem a uma bebida fermentada, ácida, levemente alcoólica (MOTAGHI et al., 1997). Esse leite fermentado tem sido objeto de estudo em função de suas propriedades nutracêuticas. A utilização de microrganismos com propriedades antimicrobianas como conservantes naturais é uma alternativa que tem como vantagem a inibição do desenvolvimento de bactérias deteriorantes e patogênicas sem o uso de substâncias químicas indesejáveis. *Salmonella* é um importante patógeno em saúde pública que pode contaminar produtos de origem animal e provocar enfermidades na forma de surtos e casos isolados (D'AOUST et al., 2001). Pelo fato do *kefir* ser produzido de maneira artesanal, além da possível veiculação de patógenos pelo leite, há também riscos de contaminação pela manipulação. O presente estudo teve por objetivo avaliar a atividade antimicrobiana de microrganismos isolados de *kefir* contra *Salmonella* Enteritidis.

2 METODOLOGIA

Foram obtidos grãos de *kefir* utilizados no preparo artesanal da bebida, denominados neste experimento de LIPOA ABB. Quinhentos mililitros de leite UHT desnatado foram adicionados a 50 g de grãos de *kefir* e incubados em banho-maria a 20°C. Diariamente, o *kefir* foi coado utilizando-se coador estéril e os grãos novamente misturados ao leite, retornando à incubação. O processo foi repetido durante uma semana. Após, os grãos foram separados por coagem e macerados com uso de almoxariz esterilizado. Uma alíquota de 10 g foi homogeneizada com 90 mL de solução salina estéril (0,9% de NaCl) para semeadura por esgotamento em placas com ágar MRS (Acumedia, Lansing, Michigan), as quais foram incubadas a 37°C por 48 horas sob condições de aerobiose e anaerobiose para obtenção de colônias isoladas. As colônias foram transferidas para caldo MRS, incubadas a 37°C até turvamento do meio, misturadas com igual volume de glicerol a 80% em salina fosfatada tamponada (PBS 0,01 M, pH 7,4) e estocadas a -70°C. Quando necessário, os isolados foram recuperados em caldo MRS a 37°C por 48 horas.

Salmonella enterica subsp. *enterica* sorotipo Enteritidis (LIPOA 2024), previamente isolada de doce de leite (TIMM et al., 2007), foi usada como bactéria indicadora. Quando necessário, a bactéria foi recuperada em Infusão

de Cérebro e Coração (BHI, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) a 37°C por 24 horas.

A atividade antimicrobiana de 20 microrganismos isolados de grãos de *kefir* foi estudada através do teste do antagonismo, segundo JACOBSEN et al. (1999). Os isolados foram caracterizados pela morfologia, com uso da coloração de Gram, e bioquimicamente, de acordo com BARROW e FELTHAM (1993). Dois microlitros de cultura de cada isolado foram dispostos isoladamente na superfície de ágar MRS e incubados por 24 horas a 37°C para desenvolvimento de colônias, sob anaerobiose e aerobiose, conforme o caso. Duzentos microlitros de cultura *overnight* da bactéria indicadora foram misturados a 12 mL de BHI contendo 0,75% de ágar e espalhados sobre a superfície das placas com MRS. As placas foram incubadas a 37°C em aerobiose. Após 24 horas de incubação, foram lidas as zonas de inibição. Uma zona clara ao redor das colônias dos isolados, sem crescimento da bactéria indicadora, com 1 mm ou mais foi considerado resultado positivo. Os testes foram realizados em triplicata.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 20 microrganismos isolados de grão de *kefir* foram classificados como pertencentes ao gênero *Lactobacillus*. Todos foram capazes de inibir o crescimento de *Salmonella* Enteritidis. A média das medidas dos halos de inibição variou entre 3,0 e 10,7 mm.

A fermentação provocada pelos *Lactobacillus* contidos nos grãos de *kefir* desencadeia um processo de acidificação do leite capaz de gerar condições desfavoráveis à sobrevivência de *S. Enteritidis*. SANTOS et. al. (2003), estudando a atividade antimicrobiana de *Lactobacillus* spp. isolados de *kefir* observaram a inibição de *S. Typhimurium*. GARROTE et al. (2000) observaram que o efeito antimicrobiano é devido principalmente ao papel dos ácidos orgânicos produzidos durante o processo de fermentação, contribuindo para esse efeito, não apenas o ácido láctico, mas também o ácido acético. A composição dos grãos de *kefir* pode ser variável, dependendo da origem e condições de estocagem dos mesmos (WITTUHN et. al., 2005), incluindo espécies de *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc*, entre outros (ÂNGULO et. al., 1993). Nesse estudo não foram identificadas as espécies, mas as diferenças nas medidas dos halos de inibição podem estar relacionadas ao fato dos isolados pertencerem a diferentes espécies de *Lactobacillus*.

Microrganismos isolados de grãos de *kefir* com atividade inibitória sobre bactérias indesejáveis têm potencial para utilização na indústria de alimentos com vistas à segurança alimentar.

4 CONCLUSÃO

Lactobacillus isolados de grãos de *kefir* apresentam atividade antimicrobiana contra *S. Enteritidis*.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ÂNGULO, G.L.; ABRAHAM, A. G.; DE ANTON, G.L., Microflora present in kefir grains of the Galician Region. **Journal Dairy Research**, Cambridge, v.68, p.630-652, 1993.

BARROW, G.I.; FELTHAM, R.K.A. **Manual for identification of medical bacterial**. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University, 1993.

D'AOUST, J.; MAURER, J.; BAILEY, J.S. *Salmonella* Species. In: DOYLE, G.L.; ABRAHAM, A.G.; ANTONI, G.L. **Food Microbiology – Fundamentals and Frontiers**. 2nd ed. Washington: ASM, 2001. Cap.8 p.141-178.

GARROTE, G.L.; ABRAHAM, A.G.; DE ANTONI, G.L. Inhibitory Power of Kefir: The Role of Organic Acids. **Journal of Food Protection**, v.63, p.364-369, 2000.

JACOBSEN, C.N.; ROSENFELDT NIELSEN, V.; HAYFORD, A.E.; MØLLER, P.L.; MICHAELSEN, K.F.; PAERREGAARD, A.; SANDSTRÖM, B.; TVERDE, M.; JAKOBSEN, M. Screening of Probiotic Activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.65, p.4949-4956, 1999.

MOTAGHI, M.; MAZAHERI, M.; MOAZAMI, N.; FARKHONDEH, A.; FOOLADI, M.H.; GOLTAPPEH, E.M. Kefir production in Iran. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.13, p.579-581, 1997.

SANTOS, A.; SAN MAURO, M.; SANCHEZ, A.; TORRES, J.M.; MARQUINA, D. The antimicrobial properties of different strains of *Lactobacillus* spp. Isolated from kefir. **Systematic Applied Microbiology**, v.26, p.434-437, 2003.

TIMM, C.D.; CONCEIÇÃO, R.C.S.; COELHO, F.J.O.; ROOS, T.B.; TEJADA, T.S.; QUEVEDO, P.S.; HENTGES, A.; BRASIL, N.D.A. Avaliação microbiológica de doce de leite pastoso. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, Rio de Janeiro, v.66, n.3, p.275-277, 2007.

WITTHUHN, R. C.; SCHOEMAN, T.; CILLIERS, A.; BRITZ, T.J. Impact of preservation and different packaging conditions on the microbial community and activity of kefir grain. **Food Microbiology**, v.22, p.337-344, 2005.