

## ATIVIDADE ANTIBIÓTICA DE CEPAS DE BACTÉRIAS LÁCTICAS ISOLADAS DO KEFIR FRENTE À *ESCHERICHIA COLI*, *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* E *SALMONELLA TYPHIMURIUM*

Loyse Tussolini (IC-Voluntária/UNICENTRO), Tais Hobold Justo (PIBIC/UNICENTRO), Herta Stutz Dalla Santa (Professora), Osmar Roberto Dalla Santa (Orientador), e-mail: ordallasanta@yahoo.com.br

Universidade Estadual do Centro-Oeste/UNICENTRO – Departamento de Engenharia de Alimentos – Guarapuava, Paraná.

**Palavras-chave:** bactérias lácticas, kefir, atividade antimicrobiana.

### Resumo:

O leite fermentado pelos grãos de Kefir é considerado um alimento probiótico pelos inúmeros benefícios que pode trazer para a saúde dos consumidores. Os grãos de Kefir contêm em sua microbiota bactérias ácido lácticas que podem ser capazes de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos. As cepas de bactérias lácticas isoladas do kefir apresentaram diferentes capacidades de inibir cepas patogênicas de importância em alimentos. Das 20 cepas avaliadas 90% apresentaram atividade antimicrobiana frente *Staphylococcus aureus*, 85% frente a *Salmonella typhimurium* e 95% frente a *Escherichia coli*.

### Introdução

Os alimentos fermentados são definidos como produtos preparados a partir de matérias-primas cruas ou aquecidas, que adquirem características peculiares, por um processo onde os microrganismos estão envolvidos. Em alguns casos, as enzimas endógenas de matérias-primas cruas possuem um papel decisivo no processo de transformação (BUCKENHÜSKES, 1993).

Leites fermentados são produtos obtidos da fermentação do leite pasteurizado ou esterilizado sob a ação de bactérias ácido-lácticas que convertem parte da lactose em ácido láctico. Outras substâncias como dióxido de carbono, ácido acético, diacetil e alcataldeído são formadas nesse processo e conferem aos produtos características sensoriais peculiares (GOMES & MALCATA, 1999).

Um exemplo de leite fermentado por microorganismos é o Kefir. Essa bebida é produzida a partir da fermentação alcoólica e ácido-láctica realizada por grãos de Kefir, diferindo assim do iogurte, por ser menos denso e por conter além do ácido láctico, álcool e gás carbônico (CZAMANSKI, 2004; SOUZA *et al.*, 1984).

Os grãos de kefir são formados por uma microbiota simbiótica, não patogênica, bastante variável, agrupada de forma organizada formada por



diversas leveduras fermentadoras ou não de lactose e bactérias lácticas (BESHKOVA *et al.*, 2003; NINANE *et al.*, 2005; ORDÓÑEZ, 2005). Entre os microrganismos estão *Lactobacillus kefir*, espécies dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter*, que produzem ácido láctico, etanol, dióxido de carbono e outras substâncias. Esses compostos contribuem com a formação do sabor e aroma característicos do Kefir tradicional (GUZEL–SEYDIM *et al.*, 2000).

As bactérias lácticas ocupam importante papel na produção de alimentos fermentados, pois além de estarem envolvidas na elaboração de vários alimentos, algumas espécies são capazes de produzir biocinas que inibem o crescimento de outras espécies bacterianas, assim podem ser utilizadas como culturas bioprotetoras de alimentos obtidos por fermentação (BUCKENHÜSKES, 1993; HANSEN, 2002; OTLES; CAGIDI, 2003).

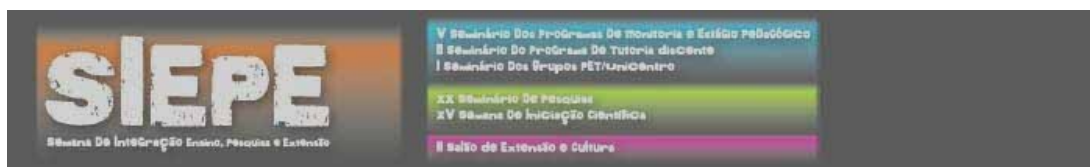
Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi verificar a atividade antimicrobiana de cepas de bactérias lácticas, isoladas dos grãos de kefir e do leite fermentado pelo kefir, frente a microrganismos de importância em alimentos.

## Material e Métodos

Para este estudo inicialmente foram isoladas 20 cepas de bactérias lácticas de grãos de kefir e do leite fermentado por kefir. O isolamento foi realizado em placas com Agar Man, Rogosa e Sharpe (MRS).

A capacidade inibitória foi avaliada pela possível ação de biocinas produzidas durante o crescimento dos isolados em caldo MRS utilizando a técnica de difusão por cavidade. O caldo fermentado por 48 h a 37°C pelas diferentes cepas de bactérias lácticas foi centrifugado para separar a biomassa. Após foi concentrado a 50% de seu volume em estufa com circulação de ar a 45°C. Em seguida o caldo concentrado foi filtrado em membrana de 0,2 µm e utilizado para avaliar a possível ação antimicrobiana (MUFANDAEDZA *et al.*, 2006).

As cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhimurium* foram cultivadas em tubos com 10 ml de caldo tripticase de soja (TSB). Essas cepas patogênicas foram semeadas com o auxílio de swab estéril em placas de Petri contendo 15 ml de Agar Tripticase de Soja (TSA). Depois da absorção completa do inóculo pelo meio de cultura foram feitos poços de 8 mm de diâmetro aos quais foram adicionados 50 µl do caldo concentrado e filtrado das diferentes culturas de bactérias lácticas. As placas foram mantidas a 4°C por 3 h para permitir a difusão do caldo concentrado no meio de cultura, depois as placas foram incubadas por 24 h a 37°C. A atividade antimicrobiana foi verificada pela formação ou não de uma zona de inibição (halo) ao redor da cavidade (MUFANDAEDZA *et al.*, 2006).



## Resultados e Discussão

As bactérias lácticas despertam grande interesse devido ao seu potencial de utilização no biocontrole. Algumas espécies exercem atividade inibitória frente a outras bactérias, devido a competição direta por nutrientes ou pela produção de compostos com efeitos antagônicos, tais como ácidos orgânicos, diacetil, peróxido de hidrogênio, e bacteriocinas (CAPLICE; FITAGERALD, 1999; HANSEN, 2002).

Os resultados do teste de atividade antimicrobiana do caldo MRS fermentado pelas cepas de bactérias lácticas e concentrado a 50%, frente as cepas de patógenos de importância em alimentos estão apresentados na tabela 1. As cepas de bactérias lácticas testadas apresentaram diferenças na capacidade de inibir o crescimento dos patógenos testados. Isso pode ser observado pela formação de halos de inibição de diferentes tamanhos. Porém algumas cepas não possuem atividade antimicrobiana frente as cepas de patógenos testadas, pois não ocorreu a formação de halos de inibição ao redor da cavidade.

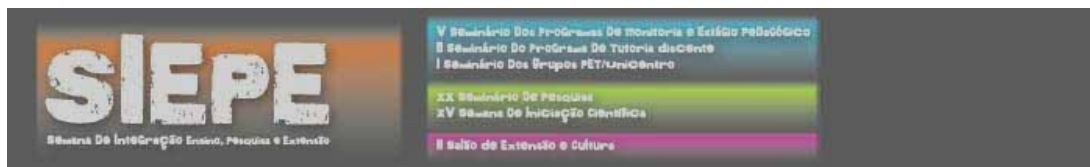
**Tabela 1** – Ação inibitória dos caldos fermentados pelas cepas de bactérias lácticas frente a cepas de bactérias de importância em alimentos.

Halos de inibição (mm)	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Escherichia coli</i>
Quantidade de cepas de bactérias lácticas			
0	2	3	1
< 0,5	1	2	1
0,51 – 1,00	7	7	10
1,10 – 1,50	6	4	7
1,51 – 2,00	4	4	1

Das 20 cepas de bactérias lácticas avaliadas, 90% apresentaram ação antimicrobiana com diferentes intensidades frente a cepa de *Staphylococcus aureus*. Sendo que a cepa que mais se destacou formou um halo maior que 1,95 mm. Tendo em vista que as cepas de *S. aureus* são produtoras de enterotoxinas, as quais estão associadas a surtos de intoxicações alimentares em humanos, torna-se necessário a inibição do crescimento desses microrganismos em alimentos (SILVA; GANDRA, 2004).

Em relação a inibição do crescimento da cepa de *Salmonella typhimurium* pelas cepas de bactérias lácticas, 85% das cepas foram capazes de inibir o crescimento do patógeno. A cepa que apresentou maior atividade inibitória formou um halo de 1,92 mm.

As cepas de bactérias lácticas também mostraram-se eficientes quando submetidas ao teste de inibição do crescimento da cepa de *Escherichia coli*, onde 95% das cepas foram capazes de inibir seu crescimento. O maior halo de inibição formado foi de 1,67 mm. A presença de *E.coli* em alimentos pode trazer risco à saúde dos consumidores, pois



algumas cepas são comprovadamente patogênicas. Com posse dessa informação é de suma importância a restrição do crescimento deste microrganismo em alimentos (FRANCO; LANDGRAF, 2007).

## Conclusão

Com este estudo foi possível selecionar cepas de bactérias lácticas isoladas de grãos e de leite fermentado por kefir com capacidade de inibir o crescimento de espécies de bactérias patogênicas que podem estar presentes nos alimentos. Dessa forma existe a possibilidade de utilizar as cepas que possuem maior capacidade inibitória como culturas bioprotetoras de alimentos, especialmente os obtidos por fermentação.

## Referências

- Buckenhuskes, H.J. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. *FEMS Microbiol. Reviews*. 1993, 12, 253.
- Czamanski, R.T.; Greco, D.P.; Wiest, J.M. Avaliação da atividade antimicrobiana de filtrados de kefir artesanal. *Higiene Alimentar*, 2004.
- Caplice, E.; Fitzgerald, G.F. *Int. J. of Food Microbiol.* 1999, 50, 131.
- Franco, B.D.G.M.; Landgraf, M. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Atheneu, 2007.
- Gomes, A.M.P.; Malcata, F.X. Agentes probióticos: aspectos fisiológicos e terapêuticos, e aplicações tecnológicas. *Boletim de Biotecnologia*, 1999.
- Güzel–Seydim, Z.B.; Seidim, A.C.; Greene, A.K.; Bodine, A.B. Determination of organic and volatile flavor substances in kefir during fermentation. *J. of Food Composition and Analysis*, 2000, 13, 35.
- Hansen, E.B. Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. *Int. J. of Food Microbiol.* 2002, 78, 119.
- Mufandaedza, J.; Viljoen, B.C.; Feresu, S.B.; Gadaga, T.H. Antimicrobial properties of lactic acid bacteria and yeast-LAB cultures isolated from traditional fermented milk against pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis* strains. *Int. J. of Food Microbiol.* 2006, 108, 147.
- Ninane, V.; Berben, G.; Romnee, J.M.; Oger, R. Variability of the microbial abundance of a kefir grain starter cultivated in partially controlled conditions. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 2005, 9, 191.
- Ordóñez, J. A. *Tecnologia de Alimentos – Alimentos de Origem Animal*. Porto Alegre: Editora Artmed, 2005.
- Otles, O.; Cagindi, O. Kefir: A probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects. *Pakistan J. Nutrition*. 2003, 2, 54.
- Silva, W.P.; Gandra, E.A. Estafilococos coagulase positiva: patógenos de importância em alimentos. *Higiene Alimentar*, 2004, 18, 32.
- Souza, G.; Gharcia, S.; Valle, J.L.E. Quefir e sua tecnologia – aspectos gerais. *Boletim ITAL*, 1984, 21, 137.