

## AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA MICROBIOLÓGICA DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS PROVENIENTES DE KEFIR

CHAYANE SENA DE MELO<sup>1</sup>; CAROLINE KRAUSE BIERHALS<sup>2</sup>; MARIA FERNANDA FERNANDES SIQUEIRA<sup>3</sup>; KHADIJA BEZERRA MASSAUT<sup>4</sup>; PEDRO FERNANDES VIANA<sup>5</sup>; ÂNGELA MARIA FIORENTINI<sup>6</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – chayane-sena@hotmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – carolinekbierhals@gmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – maria.fernanda.fs97@gmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas - khadijamassaut@gmail.com

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas - fernandes199921@gmail.com

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas - angefiore@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

O kefir é uma bebida fermentada reconhecida por ser uma provável fonte de probióticos. Dentro do complexo grupo de microrganismos que a compõem, o maior destaque é para o grupo de bactérias ácido-láticas (BAL) (PLESSAS et al., 2020). As BAL são Gram-positivas, catalase negativa, podendo apresentar-se na forma de cocos ou bacilos, produzem metabólitos importantes como ácidos orgânicos, bacteriocinas e exopolissacarídeos (LINARES et al., 2017).

As BAL são GRAS (*Generally Recognized As Safe*), o que possibilita a utilização das mesmas como culturas iniciadoras na fermentação de diversos produtos, e algumas espécies apresentam potencial probiótico. Apesar de serem consideradas GRAS, é necessário que a segurança microbiológica destes isolados seja garantida através da identificação de características potencialmente patogênicas (YOU et al., 2020; BRITO, 2021).

EATON E GASSON (2001) relataram que, dentre os fatores que determinam a virulência de bactérias, estão a resistência a determinados antimicrobianos de uso clínico, provocando a disseminação de genes de resistência, e a presença de enzimas extracelulares como DNase, gelatinase e hemolisina, responsáveis por causar doenças. Portanto, os testes de segurança se tornam indispensáveis para a área de alimentos, pois através deles, é possível avaliar fatores de virulência que indicam se um isolado de BAL possui características de patogenicidade ou se pode ser aplicado, de forma segura, no processamento de alimentos (SANTOS, 2023).

Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a segurança microbiológica de bactérias ácido-láticas isoladas de kefir.

### 2. METODOLOGIA

Para o estudo foram utilizadas 5 amostras de kefir, provenientes da região Sul do Rio Grande do Sul. O isolamento foi realizado a partir dos grãos de kefir e do leite fermentado. Os isolados que apresentaram morfologia de cocos ou bacilos, coloração Gram positiva e ausência da enzima catalase, foram selecionados para os testes. Para todos os testes realizados, os isolados foram previamente reativados em caldo MRS e incubados a 37 °C/24 h.

Para determinação da produção da enzima desoxirribonuclease (DNase), os isolados foram inoculados em estria em placas contendo ágar DNase e incubados a 37 °C/24 h. A leitura dos resultados foi realizada após a adição de solução de ácido clorídrico 1N. O resultado positivo (produção da enzima) foi caracterizado pelo aparecimento de zonas transparentes ao redor da colônia. Como controle

positivo e negativo foram utilizadas as bactérias *S. aureus* ATCC 25923 e *L. sakei subsp. sakei* ATCC 15521, respectivamente (KATEETE et al., 2010).

A avaliação da atividade da enzima gelatinase (GelE) foi realizada em um meio de cultura específico (1% de extrato de levedura, 1,5% de triptona e 12% de gelatina), preparado em tubos de ensaio, nos quais os isolados foram inoculados com o auxílio de uma agulha microbiológica e, posteriormente, incubados a 30 °C/7 dias. Ao final deste período, os tubos foram mantidos sob refrigeração a 8 °C/30 min. O resultado positivo foi observado a partir da mudança do estado físico do meio de cultivo, de sólido para líquido. E o resultado negativo foi caracterizado pela permanência do meio em estado sólido. Como controle positivo e negativo foram utilizados *S. aureus* ATCC 25923 e *E. coli* ATCC 8739, respectivamente (PEREIRA et al., 2009).

Para avaliação da presença de hemolisinas, os isolados foram estriados em placas contendo *Ágar Trypticase Soy* (TSA) suplementado, previamente, com 7% de sangue de equino desfibrinado. Como controle positivo, utilizou-se *L. monocytogenes* ATCC 7644. Após o período de 24 h de incubação a 37 °C, a presença de uma zona transparente ao redor da colônia ( $\beta$ -hemólise) foi interpretada como lise total dos glóbulos vermelhos. Zonas esverdeadas ( $\alpha$ -hemólise) foram consideradas como hemólise parcial e ausência de zonas transparentes e/ou esverdeadas ( $\gamma$ -hemólise) foram consideradas negativas para a produção de hemolisinas (EATON; GASSON, 2001).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As 5 amostras de kefir foram subdivididas em dois grupos, grãos (24 isolados) e leite fermentado (22 isolados), conforme demonstrado na Tabela 1.

**Tabela 1.** Resultados dos testes de segurança microbiológica de bactérias ácido-láticas provenientes dos grãos de kefir e da bebida fermentada

Amostra	Nº total de isolados	DNase negativa	Gelatinase		Atividade hemolítica		
			Positiva	Negativa	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$
Kefir 1 - Grãos	4	4	-	4	3	-	1
Kefir 1 - Leite fermentado	5	5	-	5	5	-	-
Kefir 2 - Grãos	5	5	-	5	2	-	3
Kefir 2 - Leite fermentado	6	6	-	6	4	-	2
Kefir 3 - Grãos	4	4	-	4	-	-	4
Kefir 3 - Leite fermentado	3	3	-	3	1	-	2
Kefir 4 - Grãos	5	4	1	3	1	-	4
Kefir 4 - Leite							



fermentado	6	6	-	6	-	-	6
Kefir 5 - Grãos	6	6	-	6	-	1	5
Kefir 5 - Leite fermentado	2	2	-	2	-	-	2

( - ) Nenhum isolado apresentou o respectivo resultado

Os microrganismos que degradam o DNA do meio, produzem uma zona transparente ao redor da área onde a sementeira do inóculo foi feita, pois o DNA polimerizado precipita na presença de HCl 1 N, criando um meio opaco. No presente estudo, nenhum isolado degradou o DNA presente no meio, portanto, foram considerados DNase negativos. ALMEIDA JÚNIOR (2015) realizou o teste de DNase em isolados de BAL provenientes de leite de cabra e obteve resultado negativo para todos os isolados testados, o que corrobora com os resultados obtidos neste estudo.

A enzima gelatinase hidrolisa gelatina, elastina, colágeno, caseína, hemoglobina e outros peptídeos bioativos. LIMA; CARBONERA; HELBIG (2022) avaliaram 73 isolados de BAL de queijo, e estes isolados não apresentaram atividade da enzima gelatinase, o que está em concordância com os resultados encontrados neste estudo, pois somente um isolado da amostra do “kefir 4” proveniente de grãos, apresentou resultado positivo.

O perfil  $\gamma$ -hemolítico, caracterizado pela ausência de hemólise, foi constatado em 17 (70,8%) dos 24 isolados provenientes de grãos e em 12 (54,5%) de 22 isolados de leite fermentado. Já o perfil  $\alpha$ -hemolítico (lise parcial) foi observado em 6 (25%) de 24 isolados de grãos e em 10 (45,4%) de 22 isolados de leite fermentado. Enquanto, que, apenas um isolado proveniente de grãos, apresentou perfil  $\beta$ -hemolítico (lise total). Portanto, 97,8% dos isolados apresentaram reação negativa, caracterizando-os como seguros, pois a ausência de hemolisinas capazes de realizar a lise total de eritrócitos humanos e animais, é importante para uma segura aplicação em alimentos (BARBOSA et al., 2010).

SANTOS (2023) relatou que, dos 84 isolados de soro-fermento de queijo, apenas 5,95% dos isolados foram hemolíticos, 34,5% foram capazes de realizar a lise parcial e 59,5% dos isolados não apresentaram reação.

#### 4. CONCLUSÕES

Conclui-se que a grande maioria dos isolados de BAL provenientes de grãos de kefir (91,7%) e todos os isolados provenientes do leite fermentado (100%), não apresentaram fatores de virulência nos testes de segurança microbiológica realizados. Sendo assim, a prospecção de novos microrganismos provenientes de diferentes matrizes alimentares é promissora para uma futura utilização, destes isolados, como culturas iniciadoras ou probióticos em alimentos.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA JÚNIOR, W. L. G.; FERRARI, I. S.; SOUZA, J. V.; SILVA, C. D. A.; COSTA, M. M.; DIAS, F. S. Characterization and evaluation of lactic acid bacteria isolated from goat milk. **Food Control**, v. 53, p. 96–103. 2015.

- BARBOSA, J.; GIBBS, P. A.; TEIXEIRA, P. Virulence factors among enterococci isolated from traditional fermented meat products produced in North of Portugal. **Food Control**, v.21, p.651-656, 2010.
- BRITO, G. F. **Seleção e microencapsulação de bactérias ácido-láticas potencialmente probióticas obtidas de frutos do bacupari (*rheedia gardneriana*)**. 2021. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Tocantins.
- EATON, T. J.; GASSON, M. J. Molecular Screening of *Enterococcus* Virulence Determinants and Potential for Genetic Exchange between Food and Medical Isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.4, p.1628-1635, 2001.
- KATEETE, D. P.; KIMANI, C.N.; KATABAZI, F.A.; OKENG, A.; OKEE, M.S.; NANTEZA, A., NAJJUKA, F., C. Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase , and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 23, p.9, 2010.
- LIMA, C. H. G. S.; CARBONERA, N.; HELBIG, E. Avaliação de aspectos fenotípicos de segurança de bactérias ácido-láticas isoladas de queijos artesanais do tipo colonial do sul do brasil. **Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes**, v. 77, n. 1, p. 12-20, 2022.
- LINARES, D. M.; GÓMEZ, C.; RENES, E.; FRESNO, J.M.; TORNADIJO, M.E.; ROSS, R.P.; STANTON, C. Lactic acid bacteria and bifidobacteria with potential to design natural biofunctional health-promoting dairy foods. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 846, p. 1-11, 2017.
- PEREIRA, V.; LOPES, C.; CASTRO, A.; SILVA, J.; GIBBS, P.; TEIXEIRA, P. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. **Food Microbiology**, v.26, n.3, p.278-282, 2009.
- PLESSAS, S.; KIOUSI, D.E.; RATHOSI, M.; ALEXOPOULOS, A.; KOURKOUTAS, Y.; MANTZOURANI, I.; GALANIS, A.; BEZIRTZOGLOU, E. Isolation of a *Lactobacillus paracasei* Strain with Probiotic Attributes from Kefir Grains. **Biomedicines**, v. 8, n. 12, p. 594, 2020.
- SANTOS, K. B. **Bioprospecção de bactérias lácticas isoladas do soro-fermento de queijo porungo com potencial tecnológico**. 2023. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental) - Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental, Universidade Federal De São Carlos.
- YOU, X.; YANG, L.; ZHAO, X.; MA, K.; CHEN, X.; ZHANG, C.; WANG, G.; DONG, M.; RUI, X.; ZHANG, Q.; LI, W. Isolation, purification, characterization and immunostimulatory activity of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus pentosus* LZ-R-17 isolated from Tibetan kefir. **International Journal of Biological Macromolecules**, China, v. 158, p. 408–419, 2020.