

ASPECTOS DE SEGURANÇA DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS ISOLADAS DE KEFIR E DE KOMBUCHA

JOSEANE CASTANHEIRA MACHADO¹; **GABRIELA ROSA DA ROSA²**;
NADRIELLI CHAVES DA CUNHA³; **TAICIANE GONÇALVES DA SILVA⁴**;
SIMONE PIENIZ⁵

¹*Universidade Federal de Pelotas – Joseanecastanheiram@gmail.com*

²*Universidade Federal de Pelotas – Gabrieladarosa09@hotmail.com*

³*Universidade Federal de Pelotas – Nadrielli.dacunha@gmail.com*

⁴*Universidade Federal de Pelotas – Tai.ici@hotmail.com*

⁵*Universidade Federal de Pelotas – Nutrisimone@yahoo.com.br*

1. INTRODUÇÃO

As bactérias-ácido lácticas (BAL), estão presentes na maioria dos produtos fermentados e são caracterizadas como Gram-positiva, catalase negativa, não formadoras de esporos, anaeróbias facultativas e fermentadoras de açúcares com produção de ácido láctico e/ou outros metabólitos. Propriedades de promoção a saúde tem sido atribuída a diversas linhagens de BAL, desta forma, aplicações probióticas são desenvolvidas com este grupo (OZYURT & ÖTLES, 2014).

Produtos probióticos são definidos desta forma por apresentarem em sua composição micro-organismos vivos, que ao serem ingeridos em quantidades adequadas, trazem benefícios à saúde do consumidor. Para que um micro-organismo seja considerado probiótico, ele deve atender alguns requisitos como permanecer viável após a passagem pelo trato gastrointestinal, aderir-se as células epiteliais, dentre outros (SIDIRA et al., 2015).

O consumo de produtos probióticos pode favorecer a saúde dos seres humanos, melhorando os sintomas de intolerância à lactose e de doenças inflamatórias intestinais, bem como de diarreias após a utilização de antibióticos, resistência à aderência de patógenos e estimulação do sistema imune (FAO/WHO, 2001; VASILJEVIC & SHA, 2008). Entretanto, para que possa ser comprovada a eficácia clínica de um probiótico é imprescindível que o mesmo seja submetido a análises *in vitro*, *in situ* e *in vivo*, que comprovem seu potencial probiótico e sua segurança para que possam ser aplicados em alimentos sem causar prejuízo a saúde do consumidor (SWETWIWATHANA & VISESSANGUAN, 2015; COSTA et al., 2019).

Apesar de já existir um número considerável de probióticos bem caracterizados e acessíveis para o uso comercial, é desejável o isolamento e caracterização de novas cepas, visto que muitos benefícios à saúde são exclusivos de cada uma (VASILJEVIC & SHA, 2008). Ademais, a composição exata da microbiota do kefir e da kombucha é variável, por depender da sua origem (GUZEL-SEYDIM et al, 2011; JAYABALAN et al., 2014). Nesse sentido, o isolamento e a caracterização de novas linhagens oriundas de nichos pouco explorados, podem ser favoráveis para obtenção de linhagens com propriedades funcionais interessantes (ORTU et al., 2007).

Dante do exposto, o presente estudo objetivou o isolamento, caracterização e avaliação de aspectos de segurança, por meio de ensaios *in vitro* de BAL provenientes de kefir e de kombucha com possível potencial probiótico.

2. METODOLOGIA

2.1 Isolamento de BAL:

O isolamento das BAL's foi realizado de acordo com o método de SILVA et al. (2001). As unidades analíticas (kefir) foram coletadas assepticamente e transferidos para sacos de Stomacher previamente esterilizados e tarados sobre uma balança, após foram homogeneizados. Amostras de 25ml de kefir foram transferidas para sacos de Stomacher e adicionados 225ml de Água Peptonada 0,1 %. As amostras sofreram diluição decimal seriada e foram plaqueadas por superfície em ágar Man Rogosa & Sharpe (MRS), sendo estas, invertidas e incubadas em jarras de anaerobiose a 37°C por 48h, para posteriormente selecionar as BAL's.

O isolado (KAC) proveniente de kombucha artesanal, foi obtido da coleção em estoque conservado no Laboratório de Nutrifisiogenômica e Metabologia da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) localizada na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

2.2 Caracterização dos isolados

Todos os micro-organismos isolados foram submetidos aos testes de coloração de Gram e de catalase. Apenas os isolados classificados como Gram-positivos e catalase negativa foram submetidos às análises posteriores, por serem já aceitas como características de BAL. Para a execução de todos os testes, os isolados foram previamente ativados em caldo MRS por 24 horas a 37 °C.

2.3 Aspectos de segurança:

2.3.1 Gelatinase

Para a avaliação da atividade da enzima proteolítica os isolados foram transferidos para um meio de cultura contendo 1% de extrato de levedura, 1,5% de triptona e 12% de gelatina. Os tubos foram incubados a 37 °C por sete dias, ao final do sétimo dia os mesmos foram mantidos sob refrigeração (8 °C) por 30 minutos. A transformação do estado sólido para líquido do meio significou um resultado positivo para atividade da enzima (PEREIRA et al., 2009). Como controle positivo e negativo foram utilizados *S. aureus* ATCC 25923 e *E. coli* ATCC 8739, respectivamente

2.3.2 DNase

A produção da enzima DNase foi determinada a partir da inoculação dos isolados em um meio contendo ágar DNase (Acumedia, EUA). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas e para leitura dos resultados foi utilizado solução de ácido clorídrico na concentração de 1 N. O aparecimento de zonas transparentes ao entorno dos isolados denotou resultado positivo para produção da enzima. Como controle positivo e negativo foram utilizados *S. aureus* ATCC 25923 e *L. sakei* subesp. *sakei* ATCC 15521 respectivamente (KATEETE et al., 2010).

2.3.3 Atividade β-hemolisina

Os isolados foram testados quanto a atividade hemolítica segundo Foulquié-Moreno et al. (2003), utilizando ágar Sangue (7% v/v de sangue de cavalo) e incubados a 37°C por 48 horas. A interpretação dos resultados foi realizada da seguinte forma: α-hemólise - linhagens que produziram zonas verdes em torno das colônias; γ-hemólise - não produziram qualquer efeito sobre as placas de Agar Sangue (não hemolíticas). Linhagens que apresentassem zonas de lise de sangue ao redor das colônias foram classificadas como hemolíticas (β-hemólise). Como controle positivo foi utilizado *L. monocytogenes* ATCC 19114.

2.3.4 Avaliação da suscetibilidade a antimicrobianos

A suscetibilidade a antimicrobianos foi avaliada pelo teste de difusão em ágar Müller- Hinton (MH, Oxoid®), realizado de acordo com as normas do documento M100-S22 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2017).

Após o cultivo em caldo MRS a 37°C por 24h, os micro-organismos isolados foram repicados para solução salina estéril (0,85%) e mensurados espectrofotometricamente a $0,150 \pm 0,02$ (Densidade Óptica - DO600nm). Em seguida, com o auxílio de swab, a cultura foi semeada em ágar MH e foram adicionados os discos impregnados com diferentes tipos de antimicrobianos. Foram utilizados cinco agentes antimicrobianos: cloranfenicol (CLO), meropen (MER), vancomicina (VAN) penicilina (PEN) e eritromicina (ERI). Após, as placas foram incubadas a 37°C por 24h e os diâmetros das zonas de inibição foram medidos utilizando-se paquímetro Digimess® e expressos em milímetros.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos oito isolados selecionados, todos foram caracterizados como Gram-positivos e catalase negativa e destes, cinco com morfologia de cocos (A1, A3, A4, A5, A6) e três de bacilos (A2, A7, KAC) sendo: A1, A2, A3, A4, A5, A6 e A7 provenientes de kefir e KAC, proveniente de kombucha artesanal.

Ressalta-se que todos os isolados apresentaram resultados negativos para o teste de gelatinase, o qual indica capacidade de hidrólise de gelatina, colágeno, caseína, hemoglobina e outros peptídeos bioativos; para o teste de DNase, que indica a capacidade de degradação de ácidos nucleicos e, todos apresentaram resultado negativo para a atividade hemolítica, a qual indica a capacidade de degradar eritrócitos do sangue humano.

Quanto ao teste de susceptibilidade a antimicrobianos, foi observado que todos os isolados apresentaram ser sensíveis a todas as classes citadas anteriormente, característica desejável, uma vez que os isolados não apresentarão risco de transmissão de resistência para micro-organismos patogênicos (CLSI, 2015).

4. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados dos testes apresentados, conclui-se que todos os isolados demonstraram ser seguros para o consumo humano, característica esta promissora visando futura aplicação em alimentos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- OZYURT, V. H., & ÖTLES, S. Properties of Probiotics and Encapsulated Probiotics in Food. *ACTA Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 13(4), 413–424, 2014.
- SIDIRA, M., KANDYLIS, P., KANELLAKI, M., & KOURKOUTAS, Y., Effect of immobilized *Lactobacillus casei* on volatile compounds of heat treated probiotic dry-fermented sausages Running title : Volatiles in heat treated sausages with immobilized *L. casei*. *Food chemistry*, 2015
- FAO/WHO. Health and nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria – **Joint Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report**, Córdoba, 2001.
- VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Probiotics- From Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal*. Barking, v.18, p.714, 2008.
- SWETWIWATHANA, A.; VISESSANGUAN, W. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for safety improvements of traditional Thai fermented meat and human health. *Meat Science*, v. 109, p. 101-105, 2015.
- COSTA, R. J. **Isolamento e caracterização de bactérias ácido láticas obtidas de carne ovina e aplicação de substâncias**

antimicrobianas em linguiça ovina frescal no controle de Listeria monocytogenes Scott A. 2019. Tese (doutorado em microbiologia de alimentos) curso de pós graduação em ciências e tecnologia de alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

- GUZEL-SEYDIM, Z. ; KOK-TAS, T. C.; GREENE, A. K. Review: functional properties of kefir. **Critical Reviews Science and Nutrition**. V. 51, n.3 p.261-268, 2011
- JAYABALAN R., MALBASA R. V., LONCAR E.S., VITAS J.S., SATHISHKUMA M. A Review on Kombucha Tea – Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 13(4): 538-50, 2014.
- ORTU, S.; FELIS, G. E.; MARZOTTO, M.; DERIU, A.; MOLICOTTI, P.; SECHI, L. A.; DELLAGLIO, F.; ZANETTI, S. Identification and Functional Characterization of Lactobacillus Strains Isolated from Milk and Gioddu, a Traditional Sardinian Fermented Milk. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 1312–1320, 2007.
- SILVA, N. da; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. de A.; TANIWAKI, M. H.; GOMES, R. A. R.; OKAZAKI, M. M. Manual de Métodos de Análises Microbiológicas de Alimentos. **Livraria Varela**, p. 317. São Paulo, 2001.
- 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**, 26(3), 278–282, 2009.
- KATEETE, D. P., KIMANI, C. N., KATABAZ, 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**, 9, 23, 2010.
 - FOULQUIÉ-MORENO, M. R.; CALLEWAERT, R.; DEVREESE, B.; VAN B., J.; DE VUYST, L. Isolation and Biochemical Characterisation of Enterocins Produced by Enterococci from Different Sources. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 214-229, 2003.
 - CLSI. (Clinical and Laboratory Standards Institute). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; **Twenty-Fifth Informational Supplement**. M100S26, Wayne, PA, 2017.