

## AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE SEGURANÇA MICROBIOLÓGICA DE ISOLADOS DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS PROVENIENTES DE KEFIR

SILVANA DE SOUZA SIGALI<sup>1</sup>; KAROLINE MOREIRA MARQUES<sup>2</sup>;  
MARIA FERNANDA FERNANDES SIQUEIRA<sup>3</sup>; PATRÍCIA RADATZ THIEL<sup>4</sup>;  
GRACIELA VOLZ LOPES<sup>5</sup>; ÂNGELA MARIA FIORENTINI<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [silvanasigali@gmail.com](mailto:silvanasigali@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [marqueskarline16@gmail.com](mailto:marqueskarline16@gmail.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – [maria.fernanda.fs97@gmail.com](mailto:maria.fernanda.fs97@gmail.com)

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – [patiradatz@gmail.com](mailto:patiradatz@gmail.com)

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – [graciela.lopes@ufpel.edu.br](mailto:graciela.lopes@ufpel.edu.br)

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – [angefiore@gmail.com](mailto:angefiore@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

As bactérias ácido-láticas (BAL) desempenham uma importante função em vários processos biológicos e industriais e são caracterizadas como anaeróbias facultativas, catalase negativa e Gram-positivas (LEVIT *et al.*, 2021). São amplamente aplicadas na produção de alimentos fermentados, gerando principalmente ácido lático, produto importante para o sabor, textura e conservação de alimentos. Ainda, são capazes de proporcionar benefícios à saúde, em especial por equilibrar a microbiota intestinal, em virtude de suas propriedades probióticas (JEONG *et al.*, 2015).

Muitos alimentos fermentados são resultantes da fermentação do leite, denominados leites fermentados, como iogurte e kefir. Nos grãos de kefir estão presentes mais de 40 espécies complexas de bactérias ácido-láticas, acéticas e leveduras (MARSHALL, 1993), ou seja, constituídos por leveduras fermentadoras de lactose (*Kluyveromyces marxianus*) e leveduras não fermentadoras de lactose (*Saccharomyces omniporus* e *S. cerevisae* e *S. exiguis*), *Lacticaseibacillus casei*, *Bifidobacterium* sp. e *Streptococcus thermophilus* (BRASIL, 2007) e outras espécies de bactérias dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter*. Através dos grãos de kefir obtém-se uma bebida fermentada ácida e pouco alcoólica, denominada kefir (GUZEL-SEYDIM *et al.*, 2011).

Diante do exposto, os grãos de kefir apresentam-se como uma matriz alimentícia importante para explorar novas espécies de BAL que possam contribuir para a indústria alimentícia com características metabólicas diferenciadas, uma vez que a capacidade lipolítica, proteolítica e produção de compostos bioativos são cepa-dependente (FREIRE *et al.*, 2021).

As BAL são consideradas GRAS (*Generally Recognized As Safe*), ou seja, seguras para incorporação em alimentos para consumo humano (Food and Drug Administration-FDA; European Food Safety Authority-EFSA) (GAISER *et al.*, 2011; ZHANG *et. al.*, 2013), no entanto, realizar testes de segurança que avaliam a presença de fatores de virulência são essenciais, pois indicam se um isolado possui perfil patogênico com características que possam ser transmitidas por plasmídeos (DNA extra cromossomal) (GAISER *et al.*, 2011; VESTERLUND *et al.*, 2007). Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a segurança microbiológica de isolados de bactérias ácido-láticas provenientes de kefir.

### 2. METODOLOGIA

O isolamento de bactérias ácido-láticas seguiu a metodologia proposta por VITOLA *et al.* (2018), com modificações. Foram utilizadas amostras dos grãos (KG) e da bebida fermentada (KB). Para tornar o ágar MRS (De Man, Rogosa e Sharpe),

mais seletivo foi adicionado 0,02% de azida sódica, impedindo o crescimento de leveduras (SOBRUN *et al.*, 2012). Os isolados foram caracterizados em estudos anteriores como Gram-positivos (diferenciação da parede celular e morfologia) e catalase negativa (ausência da enzima catalase).

Os testes de segurança realizados foram DNase, gelatinase e hemolisina. Para o teste de DNase, os isolados foram inoculados em placas com ágar DNase e incubadas a 37 °C/24 h, após esse período, foi adicionado HCl 1 N, para interpretação dos resultados. Caracteriza-se como resultado positivo um halo transparente ao redor das colônias, após adição de HCl (KATEETE *et al.*, 2010).

Quanto ao teste de gelatinase, foi preparado em tubos um meio contendo 1% de extrato de levedura, 1,5% de triptona e 12% de gelatina. Cada isolado foi inoculado em picada no meio de cultura e os tubos foram incubados a 30 °C/7 dias. Após, os tubos foram refrigerados por 30 min e em seguida os resultados foram analisados. Caracteriza-se como resultado negativo quando não há solidificação do meio, após refrigeração (PEREIRA *et al.*, 2009).

No teste de atividade hemolítica, os inóculos foram estriados em meio TSA (ágar Trypticase Soja), suplementado com 7% de sangue equino desfibrinado e, as placas foram incubadas a 37 °C/24 h. O resultado positivo para presença de hemolisinas foi identificado como  $\beta$ -hemólise: lise total, com presença de zonas transparentes,  $\alpha$ -hemólise: lise parcial formando zonas verdes no entorno das colônias dos isolados ou  $\gamma$ -hemólise: ausência de hemolisina.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram selecionados 16 isolados de BAL para a avaliação da segurança microbiológica, procedentes de kefir. Os resultados dos testes de segurança microbiológica realizados, estão dispostos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Resultados obtidos da avaliação dos parâmetros de segurança microbiológica de isolados de bactérias ácido-láticas provenientes de kefir.

Isolados	Morfologia	DNase	Gelatinase	Atividade hemolítica
KB61A	Cocos	-	-	$\alpha$ -hemólise
KB61	Cocos	-	-	$\alpha$ -hemólise
KB62A	Cocos	-	-	$\gamma$ -hemólise
KB63A	Cocos	-	-	$\gamma$ -hemólise
KB63	Cocos	-	-	$\gamma$ -hemólise
KB64A	Cocos	-	-	$\alpha$ -hemólise
KB64	Cocos	-	-	$\gamma$ -hemólise
KB65	Cocos	-	-	$\gamma$ -hemólise
KB66A	Cocos	-	-	$\alpha$ -hemólise
KB66	Cocos	-	-	$\alpha$ -hemólise
KG62A	Cocos	-	-	$\alpha$ -hemólise
KG62	Cocos	-	-	$\alpha$ -hemólise
KG63A	Cocos	-	-	$\gamma$ -hemólise
KG64A	Cocos	-	-	$\gamma$ -hemólise
KG64	Cocos	-	-	$\alpha$ -hemólise
KG65A	Cocos	-	-	$\gamma$ -hemólise

(-) ausência atividade da enzima; ( $\alpha$  – alfa e  $\gamma$  – gama hemólise) atividade hemolítica.

Todos os isolados (16) mostraram resultados negativos para o teste de DNase, sendo assim não produzem a enzima extracelular DNase. Este teste tem

o objetivo de detectar a presença da enzima DNAse (desoxirribonuclease) que degrada ácidos nucléicos (BARBOSA *et al.*, 2010).

No teste de gelatinase, têm-se o objetivo de identificar quais isolados expressam a enzima gelatinase que hidrolisa gelatina, colágeno e outras proteínas (SILVA *et al.*, 1997). O resultado apontou ausência de atividade da enzima para os 16 isolados, portanto nenhum isolado é produtor de gelatinase.

Em estudo de LIMA *et al.* (2022) com 73 cepas de BAL isoladas de 10 queijos, nenhuma cepa apresentou atividade para DNAse e gelatinase, concordando com os dados do presente estudo. No entanto, teve diferença na atividade hemolítica pois 7 cepas mostraram  $\alpha$ -hemólise, 2 apresentaram  $\beta$ -hemólise e 64  $\gamma$ -hemólise, enquanto no nosso estudo não foram obtidos casos de  $\beta$ -hemólise.

Os resultados obtidos no estudo foram 50% (8) dos isolados capazes de fazer ruptura parcial das hemácias ( $\alpha$ - hemólise) e 50% (8) sem a capacidade de ruptura das hemácias, ou seja, ausência de lise ( $\gamma$ - hemólise). A atividade hemolítica avalia a capacidade de um microrganismo de lisar hemácias do sangue (EATON; GASSON, 2001). REUBEN *et al.* (2020), avaliaram 63 isolados de leite de vaca e cabra, observaram que as amostras apresentaram características morfológicas típicas de BAL, e os testes de segurança indicaram que as cepas selecionadas não apresentaram atividade hemolítica, sendo consideradas seguras para aplicação em alimentos.

Também será necessário avaliar os isolados de BAL, do presente estudo, quanto à suscetibilidade aos antimicrobianos de uso clínico, antes da aplicação na produção de alimentos.

#### 4. CONCLUSÕES

Conclui-se que os isolados de bactérias ácido-láticas obtidos de kefir, apresentam-se seguros quanto aos parâmetros de segurança microbiológica avaliados, tornando-os aptos para futura aplicação em alimentos.

Os autores agradecem o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBOSA, J.; GIBBS, P. A.; TEIXEIRA, P. Virulence factors among enterococci isolated from traditional fermented meat products produced in the North of Portugal. **Food Control**, vol. 21, no. 5, p. 651–656, 2010.

BRASIL. Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Brasil, 2007.

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**, vol. 67, no. 4, p. 1628–1635, 2001.

FREIRE, T. T.; SILVA, A. L. T. e; FERREIRA, B. K. O.; SANTOS, T. M. dos. Bactérias ácido lácticas suas características e importância: revisão. **Research, Society and Development**, vol. 10, no. 11, 2021.

GAISER, R.A.; RIVAS L.; LÓPEZ P.; Production of eukaryotic antimicrobial peptides by bacteria: A review. **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**. ed. Méndez-Villas, v.2. p. 992-1002, 2011.

GUZEL-SEYDIM, Z. B.; KOK-TAS, T.; GREENE, A. K.; SEYDIM, A. C. Review: functional properties of kefir. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, vol. 51, no. 3, p. 261–268, 2011.

JEONG, J. H.; LEE, C. Y.; CHUNG, D. K. Probiotic Lactic Acid Bacteria and Skin Health. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, vol. 56, no. 14, p. 2331–2337, 2015.

KATEETE, D. P.; KIMANI, C. N.; KATABAZI, F. A.; OKENG, A.; OKEE, M. S.; NANTEZA, A.; JOLOBA, M. L.; 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**, vol. 9, no. 1, p. 23, 2010.

LEVIT, R.; SAVOY DE GIORI, G.; MORENO DE LEBLANC, A.; LEBLANC, J. G. Recent update on lactic acid bacteria producing riboflavin and folates: application for food fortification and treatment of intestinal inflammation. **Journal of Applied Microbiology**, vol. 130, no. 5, p. 1412–1424, 2020.

LIMA, C. H.; CARBONERA, N.; HELBIG, E. Avaliação de aspectos fenotípicos de segurança de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijos artesanais do tipo Colonial do Sul do Brasil. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, vol. 77, no. 1, p. 12–20, 2022.

MARSHALL, V. M. Starter cultures for milk fermentation and their characteristics. **International Journal of Dairy Technology**, vol. 46, no. 2, p. 49–56, 1993.

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**, vol. 26, no. 3, p. 278–282, 2009.

REUBEN, R. C.; ROY, P. C.; SARKAR, S. L.; RUBAYET UL ALAM, A. S. M.; JAHID, I. K. Characterization and evaluation of lactic acid bacteria from indigenous raw milk for potential probiotic properties. **Journal of Dairy Science**, vol. 103, no. 2, 2019.

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 Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. Brasil: Blucher, 2018.

SOBRUN, Y.; BHAW-LUXIMON, A.; JHURRY, D.; PUCHOOA, D. Isolation of lactic acid bacteria from sugar cane juice and production of lactic acid from selected improved strains. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, vol. 03, no. 04, p. 398–407, 2012.

VESTERLUND, S.; VANKERCKHOVEN, V.; SAXELIN, M.; GOOSSENS, H.; SALMINEN, S.; OUWEHAND, A. C. Safety assessment of *Lactobacillus* strains: Presence of putative risk factors in faecal, blood and probiotic isolates. **International Journal of Food Microbiology**, vol. 116, no. 3, p. 325–331, 2007.

VITOLA, H. R.; DANNENBERG, G. da S.; MARQUES, J. de L.; LOPES, G. V.; DA SILVA, W. P.; FIORENTINI, Â. M. Probiotic potential of *Lactobacillus casei* CSL3 isolated from bovine colostrum silage and its viability capacity immobilized in soybean. **Process Biochemistry**, vol. 75, p. 22–30, 2018.

ZHANG, H.; XIE, L.; ZHANG, W.; ZHOU, W.; SU, J.; LIU, J. The Association of Biofilm Formation with Antibiotic Resistance in Lactic Acid Bacteria from Fermented Foods. **Journal of Food Safety**, vol. 33, no. 2, p. 114–120, 2013.