

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE MICRORGANISMOS ISOLADOS DE GRÃOS DE *KEFIR* CONTRA *Staphylococcus aureus*

DIAS, P.A.^{1*}; STEURER, K.²; ZONTA, M.N.³; TIMM, C.D.¹

INTRODUÇÃO

Desde que os antibióticos passaram a ser utilizados em larga escala, as bactérias têm desenvolvido crescente capacidade de resistência. Devido a isto, esforços têm sido despendidos no sentido de desenvolver e estudar novos compostos que possam representar alternativas à terapia antibiótica convencional (MARTINEZ & BAQUERO, 2000).

Kefir é um leite fermentado, ácido, levemente alcoólico, produzido artesanalmente a partir de grãos que contêm uma população relativamente estável de microrganismos simbióticos imersos em uma matriz composta de polissacarídeos e proteínas (ABRAHAM & DE ANTONI, 1999).

Muitos benefícios à saúde humana têm sido atribuídos ao *kefir*, incluindo atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (GARROTE et al., 2000). Bacteriocinas e um exopolissacarídeo (*kefiran*) produzidos pelas bactérias ácido-lácticas dos grãos de *kefir* são substâncias que têm sido responsabilizadas por suas propriedades antimicrobianas (RODRIGUES et al., 2005; POWELL et al., 2007).

Toxinas de *Staphylococcus aureus* produzidas em alimentos são causa de infecção estafilocócica. Os reservatórios principais deste microrganismo são as fossas nasais, pele e pêlos de animais de sangue quente, podendo chegar aos produtos alimentícios durante a preparação e o processamento (FRANCO & LANDGRAF, 2003). Pelo fato do *kefir* ser produzido de maneira artesanal, além da possível veiculação do patógeno pelo leite, há também riscos de contaminação pela manipulação.

O avanço no uso de prebióticos e probióticos, em substituição aos promotores de crescimento, é uma realidade vivida pela agroindústria. A restrição ao uso de antibióticos e quimioterápicos na produção de animais para o consumo humano representa um desafio para a indústria de alimentos. 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.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana de microrganismos isolados de grãos de *kefir* contra *S. aureus*.

¹ Professores Inspeção de Leite e Derivados

² Acadêmica de Química de Alimentos

³ Residente em Medicina Veterinária

Autor a ser contactado: Cláudio Dias Timm

Endereço: Inspeção de Leite e Derivados, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, campus universitário, prédio 34, Pelotas, RS, CEP: 96010-900.

E-mail: inspleit@ufpel.tche.br

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados grãos de *kefir* da coleção do Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA) da Universidade Federal de Pelotas (UFPeI). Grãos LIPOA CDT, LIPOA ABB e LIPOA MH foram recuperados e restabelecidos através de fermentações sucessivas. Os grãos foram adicionados a leite UHT desnatado, na proporção de 1:10, e incubados em banho-maria a 20°C. Diariamente, o *kefir* era 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) que foram incubadas a 37°C por 48 horas para obtenção de colônias isoladas. Todas as colônias com diferente morfologia de cada placa ou um máximo de 10 colônias para cada tipo de *kefir* foram transferidas para caldo MRS (Acumedia), 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.

A atividade antimicrobiana foi estudada através do teste do antagonismo, segundo JACOBSEN et al. (1999), utilizando-se como microrganismo indicador *S. aureus* LIPOA 4001. Dois microlitros de cultura de cada isolado foram dispostos isoladamente na superfície de ágar MRS (Acumedia) e incubadas por 24 horas a 37°C para desenvolvimento de colônias. Cem microlitros de cultura *overnight* de *S. aureus* foram misturados a 7 mL de Infusão de Cérebro e Coração (BHI, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) contendo 0,7% de ágar e espalhados sobre a superfície das placas com MRS. As placas foram incubadas a 37°C. Após 24 horas de incubação, foram lidas as zonas de inibição. Uma zona clara, sem crescimento da bactéria indicadora, ao redor das colônias dos isolados com 1 mm ou mais foi considerado resultado positivo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Onze (36,66%) isolados apresentaram ação inibitória frente a *S. aureus*. A largura dos halos observados está expressa na Tabela 1.

Tabela 1 – Microrganismos isolados de grãos de *kefir* com os respectivos halos de inibição de *S. aureus*.

Isolados com atividade antimicrobiana	Largura do halo (mm)
LIPOA ABB 1.2	6
LIPOA ABB 1.3	6
LIPOA ABB 1.5	7
LIPOA ABB 2.4	4
LIPOA CDT 1.2	5
LIPOA CDT 1.3	7
LIPOA CDT 1.5	3
LIPOA MH 1.4	5
LIPOA MH 1.5	4
LIPOA MH 2.1	3
LIPOA MH 2.3	5

RODRIGUES et al. (2005) e KWON et. al. (2003) em estudos sobre a ação inibitória dos microrganismos presentes nos grãos de *kefir* também observaram atividade antimicrobiana contra *S. aureus*. O ambiente desfavorável propiciado pela produção de ácido láctico, ácido acético, bem como a ação de substâncias bioativas (POWEL et al., 2007) pode ter sido fator determinante para a inibição do *S. aureus*.

A diferença nas medidas das zonas de inibição dos isolados é sugestiva de que os microrganismos são diferentes espécies ou linhagens. Tal hipótese é reforçada pelo fato de que a constituição microbiana dos grãos é variável e depende da região geográfica de origem, tempo de utilização e substrato para proliferação dos grãos (GARROTE et. al., 1997; WSZOLEK et. al., 2001). SANTOS et al. (2003) sugerem que pelo menos parte da composição dos grãos é específica e estável: *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Sacharomyces* são comumente isolados de diferentes grãos. Por outro lado, o tipo ou quantidade de metabólitos por eles produzidos pode ter influenciado a largura dos halos. A produção de um polissacarídeo denominado kefiran tem sido associada a linhagens do gênero *Lactobacillus* (MAEDA et. al., 2004).

CONCLUSÃO

Microrganismos isolados de grãos de *kefir* apresentam atividade antimicrobiana contra *S. aureus*. A identificação destes microrganismos e caracterização de suas substâncias bioativas abre a possibilidade de novos estudos no sentido da utilização dos mesmos em formulações de alimentos nutracêuticos e na indústria farmacêutica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, A.G.; DE ANTONI, G.L. Characterization of kefir grains grow in cow's milk and soya milk. **J. Dairy Res.**, v.66, p. 327-335, 1999.

- FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. Microrganismos Patogênicos de Importância em Alimentos In: FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2003, p. 33-81.
- GARROTE, G.L.; ABRAHAM, A.G.; DE ANTONI G.L. Inhibitory Power of Kefir: The Role of Organic Acids. **J. Food Prot.**, v. 63, p. 364-369, 2000.
- GARROTE, G.L.; ABRAHAM, A.G.; DE ANTONI G.L. Preservation of kefir grains, a comparative study. **Lebensm. Wiss. U. Technol.**, v. 30, p. 77-84, 1997.
- MAEDA, H.; ZHU, X.; SUZUKI, S.; SUZUKI, K.; KITAMURA, S. Structural characterization and biological activities of an exopolysaccharide kefiran produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* WT-2BT. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 5533-5538, 2004.
- MARTINEZ, J.L.; BAQUERO, F. Mutation frequencies and antibiotic resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p. 1771-1777, 2000.
- POWELL, J.E.; WITTHUHN, R.C.; TODOROV, DICKS, L.M.T. Characterization of bacteriocin ST8KF produced by a kefir isolate *Lactobacillus plantarum* ST8KF. **Int. Dairy J.**, v. 17, p. 190-198, 2007.
- RODRIGUES, K.L.; CAPUTO, L.R.G.; CARVALHO, J.C.T.; EVANGELISTA, J.; SCHNEEDORF, J.M. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefiran extract, **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 25, p. 404-408, 2005.
- SANTOS A, SAN MAURO M, SANCHEZ A, TORRES JM, MARQUINA D. The antimicrobial properties of different strains of *Lactobacillus* spp. isolated from kefir. **System Appl Microbiol**. 2003; 26: 434-43.
- WSZOLEK, M.; TAMINE, A. Y.; MUIR, D. D., BARCLAY, M. N. Properties of kefir made in Scotland and Poland using bovine, ovine and caprine milk with different starter cultures. **Lebensm. Wiss. U. Technol.**, v. 34, p. 251-261, 2001.