

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

**Atividade Antimicrobiana de
Microrganismos Presentes em Grãos
de *Kefir***

Priscila Alves Dias

PRISCILA ALVES DIAS

Atividade Antimicrobiana de Microrganismos Presentes em Grãos de *Kefir*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Veterinária Preventiva).

Orientador: Cláudio Dias Timm
Co-orientador: Fabrício Rochedo Conceição

Pelotas, 2011

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

D541a Dias, Priscila Alves

Atividade antimicrobiana de microrganismos presentes em grãos de kefir / Priscila Alves Dias. – Pelotas, 2011. – 44f. ; tab. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Área de concentração: Veterinária preventiva. Universidade Federal de Pelotas. Faculdade de Veterinária. Pelotas, 2011. - Orientador Cláudio Dias Timm ; co-orientador Fabricio Rochedo Conceição.

1.Veterinária. 2.Kefir. 3.Leite fermentado. 4.Ação antimicrobiana. I.Timm, Cláudio Dias. II.Conceição, Fabrício Rochedo. III.Título.

CDD:

637.146

Banca examinadora:

Prof. Dr. Cláudio Dias Timm, Orientador (Faculdade de Veterinária, UFPel)

Prof^a Dr^a Helenice de Lima González (Faculdade de Veterinária, UFPel)

Prof^a Dr^a Patrícia da Silva Nascente (Instituto de Biologia, UFPel)

Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva (Faculdade de Veterinária, UFPel)

Agradecimentos

A Universidade Federal de Pelotas, pela oportunidade de realização deste curso de Pós-Graduação em Veterinária.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos oferecida durante o curso e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro ao projeto.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Cláudio Dias Timm, pelos ensinamentos e confiança.

Aos colegas do Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA), pelo trabalho e amizade.

A Médica Veterinária Renata Costa Schramm, Laboratório de Doenças Infecciosas (FVet - UFPel) pelo trabalho e disposição em ajudar.

Ao pessoal do Laboratório de Imunologia Aplicada (Cenbiot - UFPel) e Parasitologia Molecular e Imunologia (IB - UFPel) pelo empréstimo dos equipamentos para realização do trabalho.

Em especial, a minha família, que sempre me incentivou e se dedicou para que eu atingisse meus objetivos. A conclusão do mestrado é um deles.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que, de alguma forma, estiveram ao meu lado e contribuíram para que esse trabalho pudesse ser realizado.

Muito obrigada!

Resumo

DIAS, Priscila Alves. **Atividade antimicrobiana de microrganismos presentes nos grãos de kefir**. 2011. 44f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

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. Porções de leite adicionadas de grãos de *kefir* foram experimentalmente contaminadas com *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipos Typhimurium e Enteritidis, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. Amostras foram analisadas quanto à presença dos microrganismos após 0, 6, 12, 24, 48 e 72 horas de fermentação. Sessenta microrganismos isolados de grãos de *kefir* foram testados quanto à atividade antimicrobiana frente às mesmas bactérias indicadoras. A partir de grãos macerados foram feitas sementeiras por esgotamento em ágar MRS para obtenção de colônias isoladas. A atividade antimicrobiana foi estudada através do teste do antagonismo. A ação antimicrobiana dos sobrenadantes das bactérias ácido-láticas que apresentaram atividade no teste do antagonismo foi testada. O experimento foi repetido usando sobrenadantes com pH neutralizado. *Salmonella* Typhimurium e Enteritidis sobreviveram por 24 horas no *kefir* em fermentação. *E. coli* O157:H7, *S. aureus* e *L. monocytogenes* foram recuperados até 72 após o início da fermentação. Todos isolados apresentaram atividade antimicrobiana contra pelo menos um dos patógenos usados no teste do antagonismo. Sobrenadantes de 25 isolados apresentaram atividade inibitória. Entretanto apenas três mantiveram essa atividade com pH neutralizado. As bactérias patogênicas estudadas sobreviveram por tempo superior àquele normalmente utilizado para a fermentação do *kefir* artesanal, o que caracteriza perigo em potencial para o consumidor quando a matéria-prima não apresentar segurança sanitária. *Lactobacillus* isolados de grãos de *kefir* apresentam atividade antimicrobiana contra cepas de *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipos Typhimurium e Enteritidis, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* além daquela exercida pela diminuição do pH.

Palavras- chave: leite fermentado, *kefir*, ação antimicrobiana.

Abstract

DIAS, Priscila Alves. **Antimicrobial activity of microorganisms present in kefir grains**. 2011. 44f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Kefir is fermented milk, acid, slightly alcoholic, home made from grains that contain a relatively stable population of symbiotic microorganisms, embedded in a matrix composed of polysaccharides and proteins. Servings of milk added kefir grains were experimentally contaminated with *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotypes Typhimurium and Enteritidis, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. Samples were analyzed for the presence of microorganisms after 0, 6, 12, 24, 48 and 72 hours of fermentation. Sixty bacterial strains isolated from kefir grains were tested for antimicrobial activity against the same pathogens. From grains were sown by spreading in MRS agar to obtain isolated colonies. The antimicrobial activity was studied through the test of antagonism. The antimicrobial activity of supernatants of lactic acid bacteria that were active in the test of antagonism was tested. The experiment was repeated using supernatants neutralized with pH. *Salmonella* Typhimurium and Enteritidis survived for 24 hours in the kefir fermentation. *E. coli* O157:H7, *S. aureus* and *L. monocytogenes* were recovered by 72 after the start of fermentation. All isolates showed antimicrobial activity against at least one of the pathogens used in the test of antagonism. Supernatants of 25 isolates showed inhibitory activity. However, only three retained the activity at pH neutralized. Pathogenic bacteria studied survived for longer than the time normally used for kefir fermentation of artisanal, characterizing potential danger to the consumer when the raw material does not provide health security. Lactobacillus isolated from kefir grains exhibit antimicrobial activity against strains of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotypes Typhimurium and Enteritidis, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in addition to that exerted by the lower pH values.

Keywords: fermented milk, kefir, antimicrobial activity.

Lista de Tabelas

Artigo 1

Table 1 - Recovery of pathogenic microorganisms from experimentally contaminated kefir in different fermentation times at 20° C.....23

Table 2 - Means of pH values of the experimentally contaminated kefirs and the positive controls in different fermentation times at 20° C.....24

Artigo 2

Tabela 1 - Largura dos halos de inibição do crescimento das bactérias indicadoras utilizadas ao redor das colônias dos isolados de grãos de *kefir*.....38

Tabela 2 - Densidades óticas das culturas das bactérias indicadoras que apresentaram valores estatisticamente diferentes ($P < 0,05$) dos controles (culturas sem sobrenadantes), quando adicionadas de sobrenadantes de culturas de isolados de grãos de *kefir*.....41

Lista de Abreviaturas

°C	Graus Celsius
DO	Densidade ótica
g	Gramas
M	Molar
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
N	Normal
NaCl	Cloreto de sódio
nm	Nanômetro
NaOH	Hidróxido de sódio
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotações por minuto
UFC	Unidade formadora de colônia
UHT	Ultra high temperature
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro

Sumário

RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
LISTA DE TABELAS	7
LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	10
2. ARTIGO 1	12
Pathogenic microorganisms survival in kefir	12
ABSTRACT	12
RESUMO	13
INTRODUCTION.....	14
MATERIAL AND METHODS.....	15
Bacterial strains and growth conditions	15
Kefir.....	15
Experimentally contaminated kefir	15
Microorganism survival.....	16
RESULTS AND DISCUSSION.....	16
REFERENCES	20
3. ARTIGO 2	25
INTRODUÇÃO.....	27
MATERIAL E MÉTODOS.....	28
Obtenção dos isolados	28
Bactérias indicadoras.....	29
Testes do antagonismo	29
Preparo do sobrenadante.....	29
Testes de inibição com sobrenadantes com pH não neutralizado	30
Testes de inibição com sobrenadantes com pH neutralizado	30
Análise Estatística	30
RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
CONCLUSÃO.....	33
REFERÊNCIAS	34
4. CONCLUSÕES.....	42
5. REFERÊNCIAS.....	43

1. INTRODUÇÃO GERAL

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). A fermentação do leite a partir de grãos de *kefir* dá origem a uma bebida de características *sui generis*. O sabor e aroma são resultados da atividade metabólica simbiótica de bactérias ácido-láticas, ácido-acéticas e leveduras que compõe os grãos de *kefir* (BOSCH et al., 2006).

A composição microbiana dos grãos de *kefir* pode ser bastante variável, dependendo de diversos fatores, como a origem dos grãos e a forma de cultivo (LIN & KUO, 1999; WITTHUHN et al., 2004). A maior parte da população microbiana dos grãos é formada por *Lactobacillus* (*L. brevis*, *L. casei*, *L. kefir*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens*, *L. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum*, *L. parakefir*), além de *Lactococcus* (*L. lactis* subsp. *lactis*), *Leuconostoc* (*L. mesenteroides*), *Streptococcus*, *Acetobacter* e leveduras (*Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces cerevisiae*) (GARROTE et al., 2001; CHEN et al., 2008).

A fermentação é um dos métodos mais antigos e econômicos utilizados para produzir e preservar 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.

A produção de *kefir* em escala industrial não é possível devido à dificuldade de obter culturas iniciadoras com a composição estável para manutenção do padrão de qualidade do produto (FARNWORTH, 2005). Composto de unidades repetidas de galactose e glicose e parcialmente solúvel em água, o *kefiran*, exopolissacarídeo produzido pelas bactérias ácido-láticas dos grãos de *kefir*, tem sido responsabilizado por propriedades nutraceuticas atribuídas a bebida (RODRIGUES et al., 2005; POWELL et al., 2007).

O leite é um excelente meio de cultura para vários microrganismos, tendo destacada importância na epidemiologia de enfermidades transmitidas por alimentos. Dentre os microrganismos causadores de doenças eventualmente veiculados pelo leite e seus derivados, encontram-se bactérias do gênero

Salmonella, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e linhagens patogênicas de *Escherichia coli* (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2011).

Escherichia coli é a espécie predominante entre os diversos microrganismos aeróbios que fazem parte da microbiota intestinal de animais de sangue quente. Sua presença no alimento indica contaminação de origem fecal. Existem várias linhagens patogênicas de *E.coli*. Dentre elas, uma das mais importantes é *E. coli* O157:H7, patógeno emergente, responsável por causar colite hemorrágica, com dor abdominal severa e diarreia sanguinolenta (FRANCO & LANDGRAF, 2003). Produtos de origem bovina, especialmente carne mal cozida e leite cru, estão entre os alimentos mais comumente implicados em surtos (BLANCO et al., 2004).

Listeria monocytogenes é um patógeno de origem alimentar, com larga distribuição, que resiste a ambientes adversos, como baixo pH e altas concentrações de NaCl, sendo capaz de causar meningite, aborto e septicemia, com mortalidade entre 20% e 30% dos casos (SWAMINATHAN, 2001).

Ovos, carne, leite e produtos lácteos são os principais veículos de *Salmonella*. Essa bactéria está amplamente distribuída na natureza, sendo o trato intestinal do homem e dos animais seu principal reservatório (FRANCO & LANDGRAF, 2003). Enteritidis e Typhimurium são os sorotipos mais freqüentes em casos de salmonelose de origem alimentar nos Estados Unidos e seu isolamento vem aumentando em outras partes do mundo (MISHU et al., 1994).

Staphylococcus aureus está freqüentemente associado a doenças estafilocócicas, de origem alimentar ou não. Cavidade nasal de humanos, pele, mãos e feridas infectadas são a principal fonte do microrganismo. Os animais também são fontes de *S. aureus*, sendo a mastite estafilocócica do gado leiteiro um exemplo. Caso o leite contaminado seja consumido, haverá chances de ocorrer intoxicação, provocada pela ingestão da enterotoxina produzida pela bac (FRANCO & LANDGRAF, 2003).

O objetivo do trabalho foi avaliar a sobrevivência de *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipos Typhimurium e Enteritidis, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* durante o processo de fermentação do *kefir* e verificar a atividade antimicrobiana de microrganismos isolados de grãos de *kefir* contra essas bactérias patogênicas.

2. ARTIGO 1

Pathogenic microorganisms survival in kefir

Sobrevivência de patógenos em kefir**

Priscila Alves DIAS; Daiani Teixeira da SILVA; Talita Schneid TEJADA; Maria Cristina Garcia Moraes LEAL; Rita de Cássia dos Santos da CONCEIÇÃO; Cláudio Dias TIMM*

ABSTRACT

Kefir is a usually homemade kind of fermented milk produced by the addition of kefir grains to milk. Domestic handling and the use of raw materials from different standards and sources, together with the lack of inspection by qualified professionals, turn kefir into a kind of food which can present potential risks to human health. The aim of this study was to evaluate the pathogens survival during the kefir fermentation process. Milk experimentally contaminated with *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium and Enteritidis, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* was added with kefir grains. Milk samples were then analyzed as to microorganism presence at 0, 6, 12, 24, 48 and 72 hours of fermentation. *Salmonella* Typhimurium and Enteritidis survived for a 24-hour period in fermenting kefir. *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* were recovered up to 72 hours after the fermentation process was initiated. The pathogenic bacteria studied survived for a longer period than that used for homemade kefir fermentation and are a potential hazard for human consumption.

Keywords: kefir; fermented milk; inhibition; pathogens

** Artigo formatado de acordo com normas da Revista do Instituto Adolfo Lutz.

* Inspeção de Produtos de Origem Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, campus Capão do Leão, prédio 34, CEP 96010-900, Pelotas, RS. E-mail: inspleit@ufpel.tche.br

RESUMO

Kefir é um leite fermentado produzido de forma artesanal pela adição de grãos de *kefir* ao leite. A manipulação doméstica e o uso de matéria-prima de diferentes padrões e origens, aliados à falta de inspeção por profissional competente, fazem do *kefir* um alimento capaz de apresentar perigos potenciais para a saúde humana. O trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de sobrevivência de microrganismos patogênicos durante a fermentação do *kefir*. Leites experimentalmente contaminados com *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium e Enteritidis, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* foram adicionados de grãos de *kefir*. Amostras foram analisadas quanto à presença dos microrganismos após 0, 6, 12, 24, 48 e 72 horas de fermentação. *Salmonella* Typhimurium e Enteritidis sobreviveram por 24 horas no *kefir* em fermentação. *E. coli* O157:H7, *S. aureus* e *L. monocytogenes* foram recuperados até 72 horas após o início da fermentação. As bactérias patogênicas estudadas, nas concentrações e condições do presente trabalho, sobreviveram por tempo superior àquele normalmente utilizado para a fermentação do *kefir* preparado artesanalmente, representando perigo potencial para o consumo humano.

Palavras-chaves: *kefir*; leite fermentado; inibição; patógenos

INTRODUCTION

Kefir is a usually homemade kind of fermented milk originated in the Caucasus which is produced by the addition of kefir grains to milk. These grains consist of jellylike lumps that contain both bacteria and yeasts immersed in a protein and polysaccharide matrix. The most commonly isolated microorganisms in kefir grains included the *Lactobacillus* genera (*L. brevis*, *L. casei*, *L. kefir*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. kefiranoferiens* subsp. *kefiranoferiens*, *L. kefiranoferiens* subsp. *kefirgranum*, *L. parakefir*), *Lactococcus* (*L. lactis* subsp. *lactis*), *Leuconostoc* (*L. mesenteroides*), *Acetobacter*, *Kluyveromyces* (*K. marxianus*) and *Saccharomyces*^{1, 2, 3, 4,5}.

Kefir production at an industrial scale is limited due to the difficulty in obtaining starter cultures with the required stable composition for standard quality maintenance. Notwithstanding, the consumption of this kind of homemade fermented milk is widespread, mainly due to its alleged nutraceutical properties. Domestic handling and the use of materials of different standards and sources turn kefir into a kind of food which may offer potential hazards to human health. Milk is an excellent culture medium for different microorganisms, and plays a major role in food-transmitted disease epidemiology. Among disease-causing microorganisms eventually carried by dairy products are the *Salmonella* genus, and *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*⁶.

The awareness of the risks that pathogenic microorganisms eventually found in kefir present is essential to guarantee consumer safety.

The aim of this study was to evaluate *E. coli* O157:H7, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Typhimurium and Enteritidis serotypes, *S. aureus* and *L. monocytogenes* survival during the kefir fermentation process.

MATERIAL AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions

E. coli O157:H7, by courtesy of Dr. T. Yano (UNICAMP, Campinas, Brazil), *Salmonella* Typhimurium LIPOA 2023 previously isolated from pork sausage⁷, *Salmonella* Enteritidis LIPOA 2025 previously isolated from ground chicken meat⁸, *S. aureus* ATCC 14458 and *L. monocytogenes* ATCC 7644 were used. . When necessary, bacteria were recovered in brain and heart infusion (BHI, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) at 37⁰ C for 24 hours. The *E. coli* O157:H7 strain was successively cultivated on agar for Standard Plate Count (PCA, Acumedia) containing increasing concentrations of nalidixic acid with growth in PCA with 100 µg nalidixic acid per mL medium.

Kefir

Kefir grains were obtained from that used for homemade preparation of fermented milk. The grains were added to skim UHT milk at a 1:10 ratio and kept at 20⁰ C. The kefir was strained daily on a sterile strainer and the grains were once more mixed with the milk, returning to incubation. This process was repeated for a week. . The grains were separated with use of sterile strainer, identified as LIPOA CDT and stored at -18⁰ C. When necessary the grains were recovered and restored as described above.

Experimentally contaminated kefir

The bacterial strains were incubated in BHI at 37⁰ C until the stationary phase. From serial dilutions for each culture, approximately 10⁵ UFC mL⁻¹ bacterial concentration inocula were prepared. Five hundred mL UHT skim milk was inoculated with 5 mL inoculum so as to obtain a final concentration of about 10³ bacterial cells mL⁻¹. Following, 50 g kefir grains was added. This proceeding was made separately with each microorganism. Similarly prepared kefir without inoculation of the studied microorganisms was used as negative control. For

positive control, 500 mL milk inoculated with each microorganism at the same experimental kefir concentration was used, but without grain addition. Both the experimentally contaminated kefir and the controls were kept at 20° C.

Microorganism survival

Research on the studied microorganisms from a sample of each material after 0, 6 and 12 hours of fermentation was done. Two samples were analyzed at 24 hours of fermentation, and three at 48 and 72 hours. During each analysis, pH was determined by the use of a DMPH-2 Digimed pH meter. The *Salmonella* and *L. monocytogenes* research was performed according to US Food and Drug Administration (FDA)⁹ recommendations (Andrews & Hammack¹⁰, Hitchins¹¹). For *E. coli* O157:H7 research, 25 mL experimentally contaminated kefir was added to 225 mL Buffered Peptone Water (BPW, Acumedia) and incubated at 37° C for a 24-hour period. From this culture, spreads on MacConkey agar (Oxoid) added with nalixidic acid at 100 µg mL⁻¹ medium concentration and incubation at 37° C for a 24-hour period were done. For *S. aureus* research, 25 mL experimentally contaminated kefir was incubated at 37° C for a 24-hour period in 225 mL Tryptic Soy Broth (TSB, Acumedia) added with 1% (w/v) sodium pyruvate and 10% (w/v) sodium chloride. Following, spread on Baird Parker agar (Acumedia) and incubation at 37° C for 24 hours were done. Suspicious colonies were biochemically confirmed according to FDA⁹ recommendations (Bennett & Lancette¹¹). When growth on selective agar was not observed within the established incubation period, this period was extended for another 24 or 48 hours.

RESULTS AND DISCUSSION

The ability of pathogenic bacteria that are eventually carried by milk to survive in homemade produced kefir, similarly to that usually found under normal consumption conditions, was

researched. It was showed that milk fermentation caused by these microorganisms generates unfavorable conditions for the survival of the tested bacteria.

All bacteria were recovered from experimentally contaminated milk used as positive control up to 72 hours of storage. No one bacterium was recovered from the negative controls.

Among the pathogens studied, *E. coli* had the greatest resistance (Table 1). This microorganism is the most frequently found thermo tolerant coliform in unprocessed milk and dairy products that have not been submitted to thermal treatment, showing this bacterium can adapt to environments rich in milk components. Gulmez & Guven¹³ studied the *E. coli* O157:H7 behavior in kefir after a 24- and 48-hour fermentation period and observed a population growth which was kept viable for 21 days in cooled food. In their study, experimental kefir was prepared by inoculating milk with other previously prepared kefir, differently from this study, in which kefir was produced from the direct inoculation of kefir grains. The procedure adopted by Gulmez & Guven¹³ resulted in a much milder fermentation, which did not affect *E. coli* O157:H7 growth significantly. Besides, the ensuing cool storage maintenance inhibited the fermentation process and consequently the production of inhibitory factors, allowing the pathogen survival for a longer period. Kasimoglu & Akgun¹⁴ though not working with kefir, analyzed the behavior of *E. coli* O157:H7 in traditional and acidophilus yogurt. By experimentally inoculating milk before fermentation at a 10^4 UFC mL⁻¹ concentration, these authors did not succeed in recovering the microorganism after a 48-hour period. However, at an initial 10^6 UFC mL⁻¹ concentration, *E. coli* O157:H7 was recovered up to a 72- hour period in traditional yogurt.

Even though *Salmonella* Typhimurium and Enteritidis proved to be the least resistant bacteria among the studied pathogens, they managed to survive for up to 24 hours of kefir fermentation. It is possible that the strain used in this study were more adapted to the meat products, where they were from, than the fermented milk. Czamansky¹⁵, upon researching

kefir antimicrobial action on Gram negative microorganisms, observed *Salmonella* inactivation after a 60-minute exposition period. This fast inhibitory action was not observed in the present study, probably because of the inoculum concentration – 10^3 bacterial cells mL^{-1} – far higher than that used in Czamansky's¹⁵ (2003) study, which was 10 cells mL^{-1} .

S. aureus was viable under fermentation in kefir for up to 72 hours. Although it varies according to food conditions and characteristics, an effective dose of this enterotoxin can be produced when the *S. aureus* population exceeds 10^5 cells g^{-1} food^{9,16}. The initial concentration used in the experimental contamination of milk added with kefir grains was approximately 10^3 bacterial cells mL^{-1} in the present study, thus lower than that needed to offer a health hazard to consumers. The scope of this study was to evaluate the survival ability of this pathogen in kefir, and bacterial counts which could allow a follow-up of the *S. aureus* population behavior during the fermentation process were not performed. The likelihood of a quantitative increase of this microorganism during the first hours of fermentation, however, cannot be discarded based on the results obtained. Therefore, the *S. aureus* survival ability for up to 72 hours in the fermenting product represents a potential hazard to consumers.

L. monocytogenes was viable under the conditions generated by the kefir production process for up to 48 hours of fermentation. These results are in agreement with Gulmez & Guven's¹³ observations who, though working with a milder fermentation as compared to the one used in the present study, recovered *L. monocytogenes* from kefir after 24 and 48 hours of fermentation.

The fermentation that is caused by microorganisms in the kefir grains triggers a more intense acidification process in kefir than that in milk without the addition of these grains. Thus the pH values obtained during the fermentation of experimentally contaminated kefir, as well as the negative control values, were lower than those found in positive controls (milk without kefir grains) (Table 2). This fact is suggestive that the alterations as a result of pH decrease

are related to pathogen inhibition, once all inoculated microorganisms in the positive controls were recovered for up to 72 hours after contamination. Garrote et al², upon studying the kefir supernatant inhibitory action on Gram positive and Gram negative microorganisms, observed that the antimicrobial effect is mainly due to the role of the organic acids produced during the fermentation process. However, the possibility that the microorganisms of the kefir grains produce metabolites with antimicrobial activity can not be ruled out.

As under normal domestic preparation conditions kefir is generally consumed within 24 hours of fermentation, and rarely after 48 hours, because of palatability loss due to acidification, the risk represented by the likely presence of pathogenic microorganisms is high. The results obtained emphasize the importance of the sanitary quality of the milk used as raw material and the hygienic procedures of utensil cleaning and handling during homemade kefir preparation for food safety.

The studied pathogenic bacteria, in the concentrations and under the conditions of the present study, survived for a longer period of time than that normally used for homemade kefir preparation, representing a potential hazard to human consumption. *Salmonella* showed lower survival ability in the environment generated by fermenting kefir as compared to the other bacteria in this study. Milk fermentation with kefir grains promoted the conditions that exerted an inhibitory effect on the tested microorganisms. The pH decrease caused by the kefir process seems to be related to the inhibition of pathogenic bacteria.

REFERENCES

1. Chen HC, Wang SY, Chen MJ. Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture-independent methods. *Food Microbiol* 2008; 25: 492-501.
2. Garrote GL, Abraham AG, Antoni GL. Inhibitory Power of Kefir: The Role of Organic Acids. *Food Prot* 2000; 63: 364-369.
3. Takizawa S, Kojima S, Tamura S, Fujinagasa S, Benno Y, Nakase T. The composition of the *Lactobacillus* flora in kefir grains. *Syst Appl Microbiol* 1998; 21: 121-127.
4. Witthuhn RC, Schoeman T, Britz TJ. Characterization of the microbial population at different stages of kefir production and kefir grain mass cultivation. *Int Dairy Journal* 2005a; 15: 383-389.
5. Witthuhn RC, Schoeman T, Cilliers A, Britz TJ. Impact of preservation and different packaging conditions on the microbial community and activity of kefir grain. *Food Microbiol* 2005b; 22: 337-344.
6. Centers for Disease Control and Prevention [CDC]. Index for foodborne, bacteria and micotyc diseases, 2011. Aavailable from: <
<http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/index.html>>. Acessed: feb 20, 2011.
7. Dias PA, Conceição RCS, Coelho FJO, Tejada TS, Segatto M, Timm CD. Qualidade higiênico-sanitária de carne bovina moída e de embutidos frescais comercializados no sul do Rio Grande do Sul, Brasil. *Arq Inst Biol* 2008; 75: 359-363.

8. Conceição RCS, Hentges A, Moreira AN, Vasconcellos FA, Ângelo IMR, Carvalho JB, Aleixo JAG, Timm CD. Isolamento de *Salmonella* de produtos de frango e perfil de suscetibilidade dos isolados a antimicrobianos. Rev Inst Adolfo Lutz 2007; 66: 31-34.
9. FDA, U. S. Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. *Staphylococcus aureus*. In: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. Available from: <<http://www.cfsan.fda.gov/~mow/chap3.html>>. Accessed: may 31, 2010.
10. Andrews WH, Hammack T. *Salmonella*. U.S. Food and Drug Administration, Bacteriological analytical manual online, chapter 5, 2007. Available from: <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-5.html>>. Accessed: may 31, 2010.
11. Hitchins AD. Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. U.S. Food and Drug Administration, Bacteriological analytical manual online, Chapter 10, 2003. Available from: <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-10.html>>. Accessed: may 28, 2010.
12. Bennett RW, Lancette GA. *Staphylococcus aureus*. U.S. Food and Drug Administration, Bacteriological analytical manual online, chapter 12, 2001. Available from: <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-12.html>>. Accessed: may 31, 2010.
13. Gulmez M, Guven A. Behaviour of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* 4b and *Yersinia enterocolitica* O3 in pasteurized and non-pasteurised kefir fermented for one or two days. Food Science and Tech Int 2003; 9: 365-369.

14. Kasimoglu A, Akgun S. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in the processing and postprocessing stages of acidophilus yogurt. Int Journal Food Science & Tech 2004; 39: 563-568.
15. Czamansky RT. Avaliação da atividade antimicrobiana de filtrados de quefir artesanal (Dissetação - Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) - Faculdade de Veterinária: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003. 96pp.
16. Jablonski LM, Bohach G.A. *Staphylococcus aureus*. In: Doyle GL, Abraham AG, Antoni GL. Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. 2nd ed. Washington: ASM, 2001. p.411-434.

TABLE 1 – Recovery of pathogenic microorganisms from experimentally contaminated kefir in different fermentation times at 20° C (three repetitions).

Microorganisms	Fermentation time (h)					
	0	6	12	24 ¹	48	72
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	+ ²	+	+	+	+	+
<i>Salmonella</i> Typhimurium	+	+	+	+	-	-
<i>Salmonella</i> Enteritidis	+	+	+	+	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	+	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	+	+	-	-	-	-
Positive controls	+	+	+	+	+	+
Negative controls	-	-	-	-	-	-

¹ Two analyses were performed at 24 hours fermentation and three at 48 and 72 hours, in each repetition.

² (+) presence in 25 g ; (-) absence in 25 g.

TABLE 2 – Mean and standard deviations of pH values of the experimentally contaminated kefirs and the positive controls in different fermentation times at 20° C.

Pathogens	0h	6h	12h	24h	48h	72h
	Mean (SD*)	Mean (SD)	Mean (SD)	Mean (SD)	Mean (SD)	Mean (SD)
<i>E.coli</i>	5,7 (0,1)	4,5 (0,3)	4,4 (0,3)	4,2 (0,4)	4,0 (0,2)	4,0 (0,0)
<i>S. Typhimurium</i>	5,8 (0,1)	5,0 (0,1)	4,6 (0,3)	4,0 (0,3)	3,8 (0,1)	3,8 (0,2)
<i>S. Enteritidis</i>	5,9 (0,1)	5,0 (0,2)	4,8 (0,2)	4,2 (0,1)	4,0 (0,2)	4,0 (0,0)
<i>S. aureus</i>	5,8 (0,1)	4,5 (0,1)	4,4 (0,6)	4,2 (0,3)	3,9 (0,2)	4,0 (0,0)
<i>L. monocytogenes</i>	5,7 (0,1)	4,7 (0,4)	4,6 (0,6)	4,3 (0,5)	4,1 (0,1)	4,0 (0,0)
Positive control	6,0 (0,0)	5,8 (0,1)	6,3 (0,1)	5,4 (0,2)	5,8 (0,4)	4,9 (0,1)

*SD - Standard deviation

3. ARTIGO 2

Atividade antimicrobiana de microrganismos isolados de grãos de *kefir*

Antimicrobial activity of microorganisms isolated from kefir grains**

Priscila Alves DIAS; Daiani Teixeira da SILVA; Cláudio Dias TIMM*

RESUMO

Kefir é o produto da fermentação do leite pelos grãos de *kefir*. Esses grãos contêm uma mistura simbiótica de bactérias e leveduras imersas em uma matriz composta de polissacarídeos e proteínas. Muitos benefícios à saúde humana têm sido atribuídos ao *kefir*, incluindo atividade antimicrobiana contra bactérias Gram positivas e Gram negativas. Ácidos orgânicos, bacteriocinas e um exopolissacarídeo (*kefiran*) produzidos pelas bactérias ácido-láticas dos grãos de *kefir* são substâncias que têm sido responsabilizadas por suas propriedades antimicrobianas. A atividade antimicrobiana de sessenta microrganismos isolados de grãos de *kefir*, frente à *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipos Typhimurium e Enteritidis, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, foi estudada através do teste do antagonismo. A ação antimicrobiana dos sobrenadantes das bactérias ácido-láticas que apresentaram atividade no teste do antagonismo foi testada. O experimento foi repetido usando sobrenadantes com pH neutralizado. *Salmonella* Typhimurium e Enteritidis sobreviveram por 24 horas no *kefir* em fermentação. *E. coli* O157:H7, *S. aureus* e *L. monocytogenes* foram recuperados até 72 após o início da fermentação. Todos isolados apresentaram atividade antimicrobiana contra pelo menos um dos patógenos usados no teste do antagonismo. Sobrenadantes de 25 isolados apresentaram atividade inibitória, e três mantiveram essa atividade com pH neutralizado. As bactérias patogênicas estudadas sobreviveram por tempo superior àquele normalmente utilizado para a fermentação do *kefir* artesanal, o que caracteriza perigo em potencial para o consumidor quando a matéria-prima não apresentar segurança sanitária. *Lactobacillus* isolados de grãos de *kefir* apresentam atividade antimicrobiana contra cepas de *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipos Typhimurium e Enteritidis, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* além daquela exercida pela diminuição do pH.

Palavras-chaves: *kefir*, atividade antimicrobiana

** Artigo formatado de acordo com normas da Revista do Instituto Adolfo Lutz.

* Inspeção de Produtos de Origem Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, campus Capão do Leão, prédio 34, CEP 96010-900, Pelotas, RS. E-mail: inspleit@ufpel.tche.br

ABSTRACT

Kefir is the product of milk fermentation by kefir grains. These grains contain a mixture of symbiotic bacteria and yeasts embedded in a matrix composed of polysaccharides and proteins. Many human health benefits have been attributed to kefir, including antimicrobial activity against Gram positive and Gram negative. Organic acids, bacteriocins and a exopolissacarídio (kefiran) produced by lactic acid bacteria of kefir grains are substances that have been responsible for its antimicrobial properties. The antimicrobial activity of sixty bacterial strains isolated from kefir grains, compared to *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotypes Typhimurium and Enteritidis, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* was studied through the test of antagonism. The antimicrobial activity of supernatants of lactic acid bacteria that were active in the test of antagonism was tested. The experiment was repeated using supernatants neutralized with pH. *Salmonella* Typhimurium and Enteritidis survived for 24 hours in the kefir fermentation. *E. coli* O157: H7, *S. aureus* and *L. monocytogenes* were recovered by 72 after the start of fermentation. All isolates showed antimicrobial activity against at least one of the pathogens used in the test of antagonism. Supernatants of 25 isolates showed inhibitory activity, and three have neutralized this activity with pH. Pathogenic bacteria studied survived for longer than the time normally used for kefir fermentation of artisanal, characterizing potential danger to the consumer when the raw material does not provide health security. Lactobacillus isolated from kefir grains exhibit antimicrobial activity against strains of *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotypes Typhimurium and Enteritidis *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in addition to that exerted by the lower pH values.

Keywords: *kefir*, antimicrobial activity

INTRODUÇÃO

Kefir é o produto da fermentação do leite pelos grãos de *kefir*. Esses grãos contêm uma mistura simbiótica de bactérias ácido lácticas, ácido acéticas e leveduras imersas em uma matriz composta de polissacarídeos e proteínas¹. A composição microbiana dos grãos de *kefir* pode ser bastante variável, dependendo de diversos fatores, como a origem dos grãos e o modo de cultivo, sendo os gêneros mais freqüentemente isolados *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* e leveduras como *Saccharomyces* e *Kluyveromyces*^{2, 3, 4}.

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 convencional⁵.

Muitos benefícios à saúde humana têm sido atribuídos ao *kefir*, incluindo atividade antimicrobiana contra bactérias Gram positivas e Gram negativas⁶. Ácidos orgânicos, bacteriocinas e um exopolissacarídeo (*kefiran*) produzidos pelas bactérias ácido-lácticas dos grãos de *kefir* são substâncias que têm sido responsabilizadas por suas propriedades antimicrobianas^{7, 8}.

A identificação de cepas bacterianas com atividade antimicrobiana gera inúmeras possibilidades para linhas de pesquisa no sentido da aplicação prática destas bactérias e das substâncias bioativas por elas produzidas. Seu uso não está restrito à terapêutica ou à medicina preventiva humana e veterinária. A agroindústria tem pela frente um grande desafio provocado pela restrição ao uso de antibióticos e quimioterápicos na produção de animais para o consumo humano. A tendência é que ocorra um avanço no uso de prébióticos e probióticos em substituição aos aditivos e promotores de crescimento. Também a indústria de alimentos tem interesse na utilização de microrganismos com estas características como

conservantes naturais, pois são capazes de inibir o desenvolvimento de bactérias deteriorantes e patogênicas, contribuindo para a melhoria das condições higiênico-sanitárias dos produtos.

O presente estudo teve como objetivo isolar dos grãos de *kefir* microrganismos com atividade antimicrobiana.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção dos isolados

Grãos de *kefir* utilizados artesanalmente foram obtidos de três diferentes fontes e denominados, para fins desse experimento, LIPOA CDT, LIPOA ABB e LIPOA MH. Para recuperação e restabelecimento dos grãos, estes foram adicionados a leite UHT desnatado, na proporção de 1:10, e incubados em banho-maria a 20°C. Diariamente, o *kefir* foi 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 almofariz 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 contendo DeMan Rugosa Sharpe (MRS) ágar (Acumedia, Lansing, Michigan), as quais foram incubadas a 37°C por 48 horas em aerobiose e anaerobiose para obtenção de colônias isoladas. Dez colônias aeróbicas e dez anaeróbicas, preferencialmente com morfologia distinta, para cada tipo de *kefir* foram transferidas para caldo MRS (Acumedia, Lansing, Michigan), 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.

Os isolados foram identificados de acordo com suas características morfológicas, coloração de Gram, catalase e fermentação de carboidratos, proposta por Barrow e Feltham⁹.

Alguns isolados, que não se enquadraram na classificação proposta por esses autores, foram identificados através do kit GP Test Vitek 2[®] (BioMérieux) para bactérias Gram positivas.

Bactérias indicadoras

Cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipos Typhimurium (LIPOA 2046) e Enteritidis (LIPOA 2024), previamente isoladas de doce de leite¹⁰ e de salsichão de frango¹¹, respectivamente, *Escherichia coli* O157:H7 (LIPOA 1001), gentilmente cedida pelo prof. Dr. T. Yano (Unicamp), *Staphylococcus aureus* (LIPOA 4001) e *Listeria monocytogenes* (LIPOA 3002), isoladas de queijo, foram usadas como bactérias indicadoras. Quando necessário, as bactérias foram recuperadas em Infusão de Cérebro e Coração (BHI, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) a 37°C por 24 horas.

Testes do antagonismo

A atividade antimicrobiana foi estudada através do teste do antagonismo, segundo Jacobsen et al.¹². Dois microlitros de cultura de cada isolado foram dispostos isoladamente na superfície de ágar MRS (Acumedia) e incubados por 24 horas a 37°C para desenvolvimento de colônias, sob aerobiose ou anaerobiose, conforme as características de crescimento dos isolados. Duzentos microlitros de cultura *overnight* de cada bactéria indicadora foram misturados a 12 mL de BHI contendo 0,75% 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. A presença de zona clara com 1 mm ou mais, indicando área sem crescimento da bactéria indicadora ao redor das colônias dos isolados, foi considerada como resultado positivo. Os testes foram realizados em triplicata.

Preparo do sobrenadante

A separação do sobrenadante foi realizada de acordo com Lin et al.¹³. Culturas dos isolados em caldo MRS com 48 horas de incubação foram centrifugadas a 7000 rpm por 5

min e o sobrenadante foi filtrado através de filtro estéril com poros de 0,22 µm (Millipore, Bedford, Massachusetts).

Testes de inibição com sobrenadantes com pH não neutralizado

O método utilizado foi a microdiluição em caldo em placas de microtitulação, segundo Kruger et al.¹⁴. Cada cavidade das placas de microtitulação foi preenchida com 100 µL de BHI, 100 µL de sobrenadante da cultura de cada isolado e 1µL de cultura da bactéria indicadora. Como controle, o sobrenadante foi substituído por 100µL de caldo MRS. As densidades óticas (DO) foram lidas após 0, 2, 4, 6 e 8 horas de incubação a 37°C em espectrofotômetro, utilizando comprimento de onda de 540 nm. Os testes foram realizados em triplicata.

Testes de inibição com sobrenadantes com pH neutralizado

O pH de cada sobrenadante foi medido após a filtração usando fitas indicadoras de pH (MERCK®) e neutralizado ($\text{pH } 7,0 \pm 0,1$) com solução de NaOH 10N. O teste foi repetido, conforme descrito anteriormente, com os sobrenadantes que apresentaram atividade antimicrobiana.

Análise Estatística

Os resultados dos testes com sobrenadantes foram avaliados através do teste de Tukey ($P < 0,05$) com uso do programa STATISTIX®¹⁵.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sessenta microrganismos isolados de grãos de *kefir* foram testados através do teste do antagonismo. Todos demonstraram capacidade de inibir pelo menos uma das bactérias indicadoras usadas. Sobrenadantes de 25 desses isolados apresentaram atividade

antimicrobiana e três mantiveram a capacidade inibitória após a neutralização do pH para 7,0 $\pm$ 0,1.

Todos os isolados foram identificados como pertencentes ao gênero *Lactobacillus*.

O número de isolados com média de halos com 1 mm ou mais foi 59 para *E. coli*, 58 para *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*, 56 para *S. aureus* e 52 para *L. monocytogenes* (tabela 1). Cinquenta e um (85%) isolados apresentaram atividade inibitória contra os cinco patógenos. Lima et. al.¹⁶ utilizando o mesmo método do antagonismo verificou ação antagonica de *Lactobacillus* spp. frente a *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, e *L. monocytogenes*.

Os resultados demonstram que a sensibilidade às substâncias produzidas pelas bactérias lácticas e liberadas no meio extracelular varia de acordo com o patógeno e com o isolado dos grãos de *kefir*. Muitas espécies de *Lactobacillus* são capazes de produzir uma variedade de compostos antimicrobianos, como ácidos orgânicos, dióxido de carbono, etanol, polissacarídeos e bacteriocinas que apresentam potencial no controle de patógenos e bactérias de deterioração durante a produção e armazenamento dos alimentos¹⁷. As médias dos halos de inibição observadas contra *S. Enteritidis*, *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium* foram, respectivamente, 5,0 mm, 4,7 mm, 4,1 mm, 3,9 mm e 3,6 mm. A diferença nas medidas das zonas de inibição dos isolados é sugestiva de que os microrganismos pertencem a diferentes espécies ou linhagens. Em estudo similar, Santos et al.¹⁸, trabalhando com microrganismos de grãos de *kefir*, isolaram *Lactobacillus* com atividade antimicrobiana contra *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*. No teste do antagonismo, esses autores observaram maiores halos de inibição contra *L. monocytogenes*. Diferentemente do presente trabalho, o que pode ser devido ao uso de espécies ou cepas de *Lactobacillus* distintas.

Sobrenadantes de 25 isolados (41,67%) apresentaram atividade inibitória contra *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. aureus* e *E. coli* (tabela 2) após 6 e/ou 8 horas de incubação. Não houve diferença significativa entre as DO lidas nas horas 0, 2 e 4. Ação inibitória contra *L. monocytogenes* não foi observada. Sobrenadantes de três (12%) isolados, LIPOA 5075, LIPOA 5088 e LIPOA 5098, mantiveram a atividade antimicrobiana nos testes com sobrenadantes com pH neutralizado. Os valores de pH dos sobrenadantes, antes da neutralização, variaram entre 4,0 e 5,0 (resultados não mostrados).

Metabólitos formados durante a fermentação ou produtos de degradação podem ser responsáveis pelos efeitos inibitórios¹⁹. Essas substâncias podem exercer atividade antimicrobiana por diferentes mecanismos, desestabilização da membrana, lise celular, degradação de ácidos nucleicos e inibição da síntese de proteínas. Os ácidos orgânicos, láctico e acético, resultantes do catabolismo dos carboidratos contribuem para o decréscimo do pH, tornando o ambiente hostil para a maioria dos microrganismos²⁰. Segundo Eklund²¹, a ação inibidora dos ácidos orgânicos é atribuída à redução direta do pH intracelular por ionização dos ácidos não dissociados que podem permear a membrana celular por difusão e liberar prótons no citoplasma celular. O influxo de prótons induz a acidificação do citoplasma e dissipa o potencial de prótons da membrana inibindo a geração de energia²². Garrote et al.⁶ demonstraram que o efeito bacteriostático do *kefir* sobre *E. coli* deve-se principalmente aos ácidos orgânicos produzidos durante o processo de fermentação. Estes autores não observaram efeito inibitório quando utilizaram sobrenadantes com pH neutralizado. Rivas e Rivero²³, estudando a atividade inibitória de *Lactobacillus*, observaram que o ácido láctico é o principal responsável por esse efeito. Entretanto, Garrote et al.⁶ em estudo da ação de ácidos orgânicos, concluíram que apesar do ácido láctico ser importante para a inibição, a presença de ácido acético potencializa o efeito inibitório. A ausência de efeito inibitório dos sobrenadantes sobre *L. monocytogenes* pode ser devida a insuficiente diminuição do pH, uma

vez que essas bactérias são capazes de adaptação, tornando-se mais resistentes a ambientes ácidos²⁴, ou pouca quantidade de substância bioativa. O mecanismo de ação dos *Lactobacillus* sobre o crescimento de microrganismos patogênicos não foi elucidado neste estudo, contudo é provável que esse efeito se deva principalmente à liberação de produtos como ácidos orgânicos. Entretanto, a produção de outras substâncias bioativas com ação antimicrobiana parece ter ocorrido em pelo menos três dos isolados estudados. A produção por alguns *Lactobacillus* isolados de grãos de *kefir* de um exopolissacarídeo denominado *kefiran* tem sido responsabilizada por suas propriedades antimicrobianas⁷.

O conhecimento a respeito de bactérias que apresentem ação inibitória sobre microrganismos indesejáveis abre a perspectiva da sua utilização na indústria de alimentos. Além de conferir aroma, sabor e textura aos derivados lácteos, as bactérias ácido-láticas podem ser empregadas como bioconservantes, em substituição aos conservantes tradicionais.

CONCLUSÃO

Lactobacillus isolados de grãos de *kefir* apresentam atividade antimicrobiana contra cepas de *Samonella* sorotipos Enteritidis e Typhimurium, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*.

A atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes* não é mantida quando é utilizado o sobrenadante da cultura.

A produção de substâncias, produzidas por microrganismos isolados de grãos de *kefir*, provavelmente ácidos orgânicos, é capaz de controlar o crescimento microbiano.

O pH tem papel importante na inibição dos patógenos testados, mas não é o único fator responsável por esse efeito.

REFERÊNCIAS

1. IRIGOYEN, A.; ARANA, I.; CASTIELLA, M.; TORRE, P.; IBÁÑEZ, F. C. Microbiological, physicochemical and sensory characteristics of kefir during storage. **Food Chemistry**, v.90, p. 613-620, 2005.
2. LIN, C. H. W.; KUO, C. H. Y. Identification and characterization of lactic acid bacteria and yeasts isolates from kefir grains in Taiwan. **Australian Journal of Dairy Technology**, v.54, p.14-18, 1999.
3. GARROTE G. L., ABRAHAM A. G., DE ANTONI G. L. Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. **Journal of Dairy Research**, V.68, p.639-652, 2001.
4. WITTHUHN, R. C.; SCHOEMAN, T.; BRITZ, T. J. Isolation and characterization of the microbial population of different South African kefir grains. **International Journal of Dairy Technology**, v.57, p.33–37, 2004.
5. MARTINEZ, J. L.; BAQUERO, F. Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. **Clinic Microbiology Reviews**, v.15, n.4, p.647-679, 2002.
6. GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; DE ANTONI G. L. Inhibitory power of kefir: the role of organic acids. **Journal of Food Protection**, v.63, n.3, p.364-369, 2000.

7. 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, **International Journal of Antimicrobiol Agents**, v.25, p.404-408, 2005.
8. POWELL, J.E.; WITTHUHN, R.C.; TODOROV, DICKS, L.M.T. Characterization of bacteriocin ST8KF produced by a kefir isolate *Lactobacillus plantarum* ST8KF. **International Dairy Journal**, v.17, p.190-198, 2007.
9. BARROW, G. I.; FELTHAM, R. K. A. **Manual for identification of medical bacterial**. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University, 1993.
10. TIMM, C. D.; CONCEIÇÃO, R. C. S.; COELHO, F. J. O.; ROOS, T. B.; TEJADA, T. S.; QUEVEDO, P. S.; HENTGES, A.; BRASIL, N. D. A. Avaliação microbiológica de doce de leite pastoso. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.66, n.3, p.275-277, 2007.
11. CONCEIÇÃO, R. C. S.; HENTGES, A.; MOREIRA, A. N.; VASCONCELLOS, F. A.; ÂNGELO, I. M. R.; CARVALHAL, J. B.; ALEIXO, J. A. G., TIMM, C. D. Isolamento de *Salmonella* de produtos de frango e perfil de suscetibilidade dos isolados a antimicrobianos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.66, p.33-36, 2007.
12. JACOBSEN, C. N.; ROSENFELDT NIELSEN, V.; HAYFORD, A. E.; MØLLER, P. L.; MICHAELSEN, K. F.; PAERREGAARD, A.; SANDSTRÖM, B.; TVERDE, M.; JAKOBSEN, M. Screening of Probiotic Activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.4949-4956, 1999.

13. LIN, W.H.; HWANG, C. F.; CHEN, L. W.; TSEN, H. Y. Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acidic bacteria products. **Food Microbiology**, v.23, p.74-81, 2006.
14. KRÜGER, C. C. H., SILVA, C. A., VEDANA, M. I. S., TIENE, C., CÂNDIDO, L. M. B. Atividade antimicrobiana de peptídeos obtidos de caseína bovina. **Alimentos e Nutrição**, v.17, n.1, p.7-12, 2006.
15. STATISTIX[®]. **Statistix 8 Analytical Software**. User's manual. Tallahassee. FL. 2003. 396p.
16. LIMA, E. T.; ANDREATTI FILHO, R. L.; OKAMOTO, A. S., NOUJAIM, J. C.; BARROS, M. R.; CROCCI, A. J. Evaluation in vitro of the antagonistic substances produced by *Lactobacillus* spp. isolated from chickens. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.71, n.2, p.103–107, 2007.
17. MESSES, W.; DE VUYST, L. Inhibitory substances produced by lactobacilli isolated from sourdoughs - a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.72, p.31-43, 2002.
18. SANTOS, A.; SAN MAURO, M.; SANCHEZ, A.; TORRES, J. M.; MARQUINA, D. The antimicrobial properties of different strains of *Lactobacillus* spp. isolated from kefir. **Systematic and Applied Microbiology**, v.26, p.434-43, 2003.
19. FARNWORTH, E. R. Kefir - a complex probiotic, **Food Science & Technology Bulletin: Functional Foods**, v.2, n.1, p.1-17, 2005.

20. BOSCH A.; GOLOWCZYC M. A.; ABRAHAM A. G.; GARROTE G. L.; DE ANTONI G. L.; YANTORNO O. Rapid discrimination of lactobacilli isolated from kefir grains by FT-IR spectroscopy. **International Journal of Food Microbiology**, v.111, n.3, p.280-287, 2006.
21. EKLUND, T. The antimicrobial effect of dissociated and undissociated sorbic acid at different pH levels. **Journal of Applied Bacteriology**. v.54, p.383-389, 1983.
22. DIEZ-GONZALES, F.; RUSSEL, J. B. The ability of *Escherichia coli* O157:H7 to decrease its intracellular pH and resist the toxicity of acetic acid. **Microbiology**, v.143, p.1175-1180, 1997.
23. RIVAS, C. C. A.; RIVERO, C. G. D. Efecto antagónico de *Lactobacillus plantarum* aislado de pastizal de finca lechera. **Respyn Revista de Salud Pública y Nutrición**, Venezuela, v. 10, n.1, 2009.
24. VAN SCHAIK, W.; GAHAN, C. G. M.; HILL, C. Acidadapted *Listeria monocytogenes* displays enhanced tolerance against the lantibiotics nisin and lactacin 3147. **Journal of Food Protection**, v.62, n.5, p.536-539, 1999.

TABELA 1 – Largura dos halos de inibição do crescimento das bactérias indicadoras utilizadas ao redor das colônias dos isolados de grãos de *kefir*.

Isolados¹	<i>E. coli</i> Média ² (DP ³)	<i>Salmonella</i> Enteritidis Média (DP)	<i>Salmonella</i> Typhimurium Média (DP)	<i>L. mono-</i> cytogenes Média (DP)	<i>S. aureus</i> Média (DP)
LIPOA 5063	0,0 (0,0)	0,7(1,2)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)
LIPOA 5065	3,3 (3,1)	3,0 (3,0)	2,3 (2,1)	2,3 (2,1)	4,0 (0,0)
LIPOA 5075	4,0 (1,0)	4,0 (1,0)	3,7 (1,5)	3,3 (0,6)	4,7 (1,5)
LIPOA 5077	4,0 (1,6)	3,7 (0,6)	3,3 (1,5)	4,0 (1,0)	4,3 (1,5)
LIPOA 5078	3,0 (0,8)	3,3 (0,6)	3,7 (1,5)	3,7 (0,6)	3,3 (0,6)
LIPOA 5079	3,4 (1,2)	3,3 (0,6)	3,3 (1,5)	3,0 (1,0)	3,7 (1,5)
LIPOA 5080	4,0 (0,8)	4,0 (1,0)	3,7 (1,5)	4,0 (1,0)	3,7 (1,2)
LIPOA 5081	3,7 (0,9)	4,7 (2,1)	4,0 (1,0)	4,0 (0,0)	3,3 (1,5)
LIPOA 5082	4,4 (1,2)	4,0 (1,7)	3,0 (1,0)	4,0 (1,0)	4,3 (1,2)
LIPOA 5083	3,7 (0,6)	4,0 (1,0)	4,3 (2,1)	3,7 (0,6)	4,3 (1,5)
<u>LIPOA 5001</u>	2,3 (4,0)	1,3 (2,3)	1,7 (2,9)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)
<u>LIPOA 5002</u>	2,7 (4,6)	1,0 (1,7)	1,3 (2,3)	0,0 (0,0)	0,3 (0,6)
<u>LIPOA 5003</u>	2,3 (4,0)	0,0 (0,0)	1,7 (2,9)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)
<u>LIPOA 5004</u>	3,0 (5,2)	1,0 (1,7)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)
<u>LIPOA 5005</u>	2,3 (2,5)	2,3 (2,1)	2,0 (2,6)	0,0 (0,0)	0,3 (0,6)
<u>LIPOA 5084</u>	4,0 (0,0)	7,0 (2,0)	2,7 (0,6)	2,0 (0,0)	5,0 (1,0)
<u>LIPOA 5085</u>	4,7 (1,2)	8,3 (0,6)	3,7 (1,2)	1,7 (0,6)	7,3 (0,6)
<u>LIPOA 5086</u>	6,7 (1,5)	5,3 (1,5)	3,0 (1,0)	3,7 (0,6)	7,7 (2,5)
<u>LIPOA 5087</u>	3,3 (1,5)	1,7 (1,5)	4,0 (1,0)	3,7 (0,6)	4,3 (1,5)
<u>LIPOA 5088</u>	4,0 (1,7)	2,0 (1,7)	3,3 (0,6)	3,0 (0,0)	4,3 (1,5)
<i>LIPOA 5021</i>	5,7 (3,1)	6,3 (2,9)	2,7 (0,6)	4,7 (1,5)	4,3 (0,6)
<i>LIPOA 5022</i>	6,3 (2,5)	5,7 (1,2)	3,0 (0,6)	3,7 (0,6)	4,0 (0,0)

<i>LIPOA 5023</i>	6,0 (2,6)	7,0 (1,7)	4,3 (1,2)	5,0 (1,0)	4,7 (1,2)
<i>LIPOA 5024</i>	6,3 (3,2)	6,7 (1,2)	4,0 (1,7)	5,0 (1,0)	4,3 (0,6)
<i>LIPOA 5025</i>	6,0 (3,6)	6,7 (0,6)	3,7 (1,5)	4,7 (1,2)	4,0 (1,7)
<i>LIPOA 5027</i>	6,3 (2,3)	6,3 (1,2)	3,7 (1,2)	5,0 (1,7)	4,3 (1,2)
<i>LIPOA 5031</i>	5,0 (1,0)	6,3 (1,0)	4,3 (1,2)	5,3 (3,2)	5,3 (2,3)
<i>LIPOA 5033</i>	4,0 (1,0)	7,0 (1,0)	4,0 (1,0)	4,7 (1,5)	6,3 (2,5)
<i>LIPOA 5039</i>	5,3 (3,2)	7,3 (1,2)	3,0 (0,0)	5,7 (2,5)	5,0 (1,7)
<i>LIPOA 5040</i>	4,3 (0,6)	7,3 (2,1)	3,7 (1,2)	7,7 (3,2)	5,7 (2,5)
<u><i>LIPOA 5007</i></u>	3,0 (3,0)	3,0 (3,0)	1,3 (1,5)	0,0 (0,0)	1,0 (1,7)
<u><i>LIPOA 5089</i></u>	4,0 (1,7)	7,0 (1,0)	3,3 (1,5)	0,3 (0,6)	10,7 (3,1)
<u><i>LIPOA 5090</i></u>	4,3 (1,5)	7,0 (0,0)	8,0 (0,0)	2,3 (0,6)	7,7 (2,5)
<u><i>LIPOA 5091</i></u>	4,7 (0,6)	1,3 (1,2)	3,3 (0,6)	3,3 (1,5)	4,0 (0,0)
<u><i>LIPOA 5092</i></u>	3,7 (0,6)	1,7 (1,5)	4,0 (1,0)	2,7 (0,6)	3,7 (0,6)
<u><i>LIPOA 5093</i></u>	3,0 (1,0)	7,3 (2,5)	3,7 (1,2)	0,3 (0,6)	8,0 (0,0)
<u><i>LIPOA 5094</i></u>	2,0 (1,0)	10,7 (0,6)	5,0 (2,0)	1,3 (0,6)	7,0 (0,0)
<u><i>LIPOA 5095</i></u>	4,0 (1,0)	5,3 (3,2)	3,7 (1,5)	0,0 (0,0)	2,7 (2,5)
<u><i>LIPOA 5096</i></u>	4,0 (1,0)	7,0 (1,7)	4,3 (1,5)	1,7 (0,6)	10,7 (3,1)
<u><i>LIPOA 5097</i></u>	4,3 (1,5)	0,0 (0,0)	5,0 (3,0)	3,7 (0,6)	4,0 (1,0)
LIPOA 5042	4,7 (1,2)	8,3 (2,9)	4,0 (1,0)	6,3 (3,1)	7,3 (2,9)
LIPOA 5045	4,3 (0,6)	7,7 (2,5)	3,0 (1,0)	5,0 (1,0)	7,7 (1,5)
LIPOA 5046	5,0 (1,0)	8,3 (1,5)	4,0 (1,0)	6,3 (2,1)	6,7 (2,9)
LIPOA 5047	5,3 (1,2)	6,3 (2,1)	4,3 (0,6)	6,0 (2,0)	7,0 (2,6)
LIPOA 5048	4,3 (0,6)	7,7 (2,5)	2,7 (0,6)	6,7 (3,2)	7,7 (2,9)
LIPOA 5051	4,3 (0,6)	6,3 (2,3)	3,7 (1,5)	6,0 (1,7)	6,7 (0,6)
LIPOA 5053	4,7 (1,5)	5,3 (1,2)	3,3 (1,5)	5,0 (1,0)	4,0 (1,0)
LIPOA 5054	4,3 (0,6)	6,0 (1,7)	5,0 (1,7)	5,7 (0,6)	4,3 (1,2)
LIPOA 5058	4,7 (1,2)	7,0 (1,0)	3,7 (0,6)	5,0 (1,0)	5,0 (1,0)

LIPOA 5059	4,3 (2,3)	7,0 (1,7)	2,7 (0,6)	3,7 (0,6)	4,0 (2,0)
<u>LIPOA 5098</u>	3,0 (1,0)	3,7 (1,2)	3,7 (0,6)	4,0 (1,0)	5,0 (1,7)
<u>LIPOA 5099</u>	3,0 (0,0)	3,7 (1,2)	3,3 (0,6)	3,7 (0,6)	3,0 (3,0)
<u>LIPOA 5100</u>	3,7 (1,2)	3,0 (1,0)	4,7 (1,2)	3,7 (0,6)	3,7 (0,6)
<u>LIPOA 5101</u>	3,3 (0,6)	5,7 (2,1)	4,7 (1,2)	2,3 (0,6)	4,0 (1,0)
<u>LIPOA 5102</u>	3,3 (0,6)	3,7 (1,2)	3,7 (2,1)	3,0 (1,0)	3,7 (0,6)
<u>LIPOA 5103</u>	3,7 (0,6)	4,0 (1,7)	4,0 (2,6)	3,7 (0,6)	4,0 (1,0)
<u>LIPOA 5104</u>	4,0 (1,7)	4,3 (1,5)	5,0 (1,0)	3,3 (0,6)	4,7 (1,5)
<u>LIPOA 5105</u>	2,7 (2,3)	3,7 (1,2)	5,0 (3,5)	3,7 (1,2)	4,0 (0,0)
<u>LIPOA 5106</u>	4,3 (0,6)	4,3 (0,6)	4,7 (1,5)	3,0 (0,0)	2,7 (2,5)
<u>LIPOA 5107</u>	3,0 (1,0)	3,7 (1,2)	5,0 (3,5)	4,3 (0,6)	1,0 (1,7)

¹ Fonte normal = Isolados *kefir* CDT; Fonte *itálico* = Isolados *kefir* ABB; Fonte **negrito** = Isolados *kefir* MH;

Sublinhados = Isolados obtidos anaerobicamente

² Média de três repetições

³ Desvio Padrão

TABELA 2 – Densidades óticas das culturas das bactérias indicadoras que apresentaram valores estatisticamente diferentes ($P < 0,05$) dos controles (culturas sem sobrenadantes), quando adicionadas de sobrenadantes de culturas de isolados de grãos de *kefir*.

Isolados	<i>E. coli</i>		<i>S.</i> Enteritidis	<i>S. Typhimurium</i>		<i>S. aureus</i>	
	6 h Média ¹ (DP ²)	8 h Média (DP)	8 h Média (DP)	6 h Média (DP)	8 h Média (DP)	6 h Média (DP)	8 h Média (DP)
5021	SDE ³	SDE	SDE	SDE	SDE	0,07 (0,05)	0,41 (0,52)
5024	SDE	SDE	SDE	0,37 (0,31)	0,48 (0,44)	SDE	SDE
5033	SDE	SDE	SDE	0,34 (0,19)	0,38 (0,16)	SDE	SDE
5048	SDE	SDE	SDE	SDE	SDE	0,42 (0,36)	0,45 (0,36)
5058	SDE	SDE	SDE	SDE	SDE	0,24 (0,32)	0,28 (0,30)
5065	SDE	SDE	SDE	0,38 (0,19)	0,45 (0,18)	SDE	SDE
5075	0,17 (0,17)	0,07 (0,12)	0,08 (0,11)	0,15 (0,13)	0,16 (0,15)	0,13 (0,12)	0,12 (0,13)
5077	0,24 (0,28)	0,07 (0,11)	0,05 (0,06)	0,11 (0,14)	0,09 (0,15)	0,09 (0,09)	0,08 (0,12)
5078	SDE	0,07 (0,12)	0,05 (0,09)	0,15 (0,19)	0,15 (0,22)	0,12 (0,08)	0,12 (0,10)
5079	SDE	0,06 (0,11)	0,05 (0,07)	0,08 (0,09)	0,08 (0,14)	0,12 (0,12)	0,13 (0,14)
5080	0,27 (0,33)	0,06 (0,10)	0,04 (0,07)	0,10 (0,12)	0,08 (0,15)	0,11 (0,10)	0,11 (0,11)
5081	0,22 (0,28)	0,05 (0,09)	0,04 (0,06)	0,10 (0,11)	0,10 (0,14)	0,10 (0,09)	0,10 (0,08)
5082	SDE	0,07 (0,12)	0,03 (0,05)	0,12 (0,14)	0,11 (0,16)	0,10 (0,11)	0,09 (0,12)
5084	SDE	SDE	SDE	0,39 (0,26)	0,47 (0,26)	0,32 (0,36)	0,42 (0,46)
5087	SDE	0,11 (0,10)	0,05 (0,09)	0,10 (0,12)	0,10 (0,14)	0,11 (0,06)	0,10 (0,08)
5088	0,26 (0,32)	0,09 (0,09)	0,04 (0,07)	0,10 (0,14)	0,09 (0,16)	0,14 (0,14)	0,11 (0,16)
5091	0,13 (0,15)	0,04 (0,07)	0,03 (0,05)	0,06 (0,10)	0,07 (0,12)	0,11 (0,10)	0,09 (0,13)
5092	SDE	0,14 (0,14)	0,04 (0,06)	0,07 (0,11)	0,07 (0,12)	0,11 (0,11)	0,09 (0,11)
5093	SDE	SDE	SDE	0,36 (0,21)	0,78 (0,38)	SDE	SDE
5094	SDE	SDE	SDE	0,33 (0,19)	0,54 (0,03)	SDE	SDE
5095	SDE	0,14 (0,12)	0,04 (0,06)	0,07 (0,10)	0,07 (0,13)	0,14 (0,12)	0,14 (0,12)
5097	SDE	0,08 (0,14)	SDE	0,07 (0,10)	0,07 (0,13)	0,10 (0,10)	0,09 (0,12)
5098	0,22 (0,27)	0,05 (0,09)	0,04 (0,05)	0,07 (0,11)	0,07 (0,13)	0,09 (0,09)	0,08 (0,10)
5104	SDE	0,07 (0,09)	0,03 (0,05)	0,06 (0,10)	0,07 (0,13)	0,10 (0,09)	0,08 (0,09)
5107	SDE	SDE	0,04 (0,07)	0,14 (0,11)	0,19 (0,18)	0,06 (0,06)	0,08 (0,06)

¹ Média de três repetições

² Desvio Padrão (DP)

³ Sem Diferença Estatística (SDE)

4. CONCLUSÕES

A fermentação do leite pelos grãos de *kefir* promoveu um ambiente desfavorável para o crescimento cepas de *Samonella* sorotipos Enteritidis e Typhimurium, *E. coli*, *Staphylococcus aureus* e *L. monocytogenes*.

A sobrevivência em *kefir* dos microrganismos patogênicos estudados ultrapassou o tempo de fermentação costumeiramente usado até o momento de consumo da bebida artesanal, o que representa perigo potencial em termos de segurança alimentar.

Lactobacillus isolados de grãos de *kefir* apresentam atividade antimicrobiana contra *Samonella* sorotipos Enteritidis e Typhimurium, *E. coli*, *Staphylococcus aureus* e *L. monocytogenes*.

O pH tem papel importante no mecanismo de inibição, mas não é o único fator responsável por esse efeito.

Alguns microrganismos isolados de grãos de *kefir* apresentam potencial para uso na indústria de alimentos, com vistas à segurança alimentar.

5. REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, A. G.; DE ANTONI, G. L. Characterization of kefir grains grow in cow's milk and soya milk. **Journal of Dairy Research**, v.66, p.327-335, 1999.
- BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; MORA, A.; DAHBI, G.; ALONSO, M. P.; GONZÁLEZ, E. A.; BERNÁRDEZ, M. I.; BLANCO, J. Serotypes, virulence genes, and intimin types of shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (eae-ξ). **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p.645-651, 2004.
- BOSCH A.; GOLOWCZYC M. A.; ABRAHAM A. G.; GARROTE G. L.; DE ANTONI G. L.; YANTORNO O. Rapid discrimination of lactobacilli isolated from kefir grains by FT-IR spectroscopy. **International Journal of Food Microbiology**, v.111, n.3, p.280-287, 2006.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION [CDC]. Index for foodborne, bacteria and micotyc diseases, 2011. Disponível em : <<http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/index.html>>. Acesso em março 2011.
- CHEN, H. C.; WANG, S. Y.; CHEN, M. J. Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture-independent methods. **Food Microbiology**, v.25, p.492-501, 2008.
- FARNWORTH, E. R. Kefir - a complex probiotic, **Food Science & Technology Bulletin: Functional Foods**, v.2, n.1, p.1-17, 2005.
- 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. Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. **Journal of Dairy Research**, v.68, p.639-652, 2001.
- LIN, C. H. W.; KUO, C. H. Y. Identification and characterization of lactic acid bacteria and yeasts isolates from kefir grains in Taiwan. **Australian Journal of Dairy Techonology**, v.54, p.14-18, 1999.
- MISHU, B.; KOEHLER, J.; LEE, L. A.; RODRIGUE, D.; HICKMAN-BRENNER, F.; BLAKE, P.; TAUXE, R. V. Outbreaks of *Salmonella* Enteritidis infections in the United States, 1985-1991. **Journal Infection Disease**, v.169, p.547-552, 1994.
- POWELL, J. E.; WITTHUHN, R. C.; TODOROV, DICKS, L. M. T. Characterization of bacteriocin ST8KF produced by a kefir isolate *Lactobacillus plantarum* ST8KF. **International Dairy Journal**, 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 kefir extract, **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.25, p.404-408, 2005.

SWAMINATHAN, B. *Listeria monocytogenes*. In: DOYLE, G.L.; ABRAHAM, A.G.; ANTONI, G.L. **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**. 2nd ed. Washington: ASM, 2001, p.383-409.

WITTHUHN, R. C.; SCHOEMAN, T.; BRITZ, T. J. Isolation and characterization of the microbial population of different South African kefir grains. **International Journal of Dairy Technology**, v.57, p.33–37, 2004.