

UFRRJ

**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA
ORGÂNICA**

DISSERTAÇÃO

**Caracterização do processo fermentativo e da microbiota
envolvida na produção do kefir de água**

Renata Briata da Conceição

2012



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA ORGÂNICA

**CARACTERIZAÇÃO DO PROCESSO FERMENTATIVO DA
MICROBIOTA ENVOLVIDA NA PRODUÇÃO DO KEFIR DE ÁGUA**

RENATA BRIATA DA CONCEIÇÃO

Sob a orientação da Pesquisadora:

PhD. Norma Gouvea Rumjanek

Sob co-orientação do Pesquisador:

PhD. Raul de Lucena Duarte Ribeiro

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Agricultura Orgânica**, no curso de Pós-Graduação em Agricultura

Seropédica,RJ

Setembro de 2012

631.584

C744c

Conceição, Renata Briata da, 1981-

T

Caracterização do processo fermentativo da microbiota envolvida na produção do kefir de água / Renata Briata da Conceição - 2012.

69 f. : il.

Orientador: Norma Gouvea Rumjanek.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Agricultura Orgânica.

Bibliografia: f. 55-61.

1. Agricultura orgânica - Teses. 2. Kefir - Teses. 3. Probióticos - Teses. 4. Microorganismos - Teses. I. Rumjanek, Norma Gouvea, 1953-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Agricultura Orgânica. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA ORGÂNICA

RENATA BRIATA DA CONCEIÇÃO

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Agricultura Orgânica**, no Curso de Pós-Graduação em Agricultura Orgânica.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM ----/----/-----

Ph.D. – Norma Gouvea Rumjanek (Orientador)
EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Dr. Anelise Dias

D.Sc. Marcia Reed Rodrigues Coelho

Dedico este trabalho a
meus pais, como exemplo
de perseverança, força e
responsabilidade

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar ao meu lado em todos os momentos da minha vida; por me dar seriedade necessária para aceitar as coisas que não podemos modificar, coragem para modificar aquelas que podemos e sabedoria para distinguir uma da outra.

Aos meus pais, a qual devo a vida, a dignidade, competência, determinação, caráter, e tantas outras coisas a vocês, que se torna difícil agradecer. Amo vocês e até por saber amar, devo isso a vocês. Obrigada por tantas coisas. Hoje, posso até dizer que não sei se vencerei todas as batalhas, mas certamente, não tenho dúvida que irei lutar. Obrigada!

Ao meu noivo Wellington pela compreensão, que em alguns momentos teve que respirar fundo para suportar minhas histerias, mais sempre ao meu lado.

A minha orientadora Dra Norma Rumjanek que mesmo no meio tantas tarefas, sempre encontrava espaço para me orientar com toda paciência e dedicação, ensinando-me a ser mais observadora e que sempre devemos perseverar.

A Doutora Anelise, que com calma e competência me mostrou o caminho a seguir, consertou minhas falhas e me ajudou a concluir esse trabalho, fazendo com que fosse realizado com seriedade e determinação, me mostrando que tudo no final dar certo. Obrigado pela atenção e paciência. Dr. Raul de Lucena que com muita dedicação soube dividir suas experiências, fazendo com que este trabalho se tornasse enriquecedor.

Ao pesquisador Geraldo Baeta da Cruz, que esteve sempre solícito a responder minhas dúvidas e ensinar com dedicação, nunca perdendo seu carisma.

A minha amiga Marcela Monteiro, a primeira pessoa que me incentivou a dar início a essa jornada, me mostrou ainda mais como posso vencer obstáculos e lutar pelos meus objetivos, me ensinou a crescer ainda mais com as dificuldades e certamente, devo muito disso a você! Obrigada pelo carinho e a ajuda.

Aos meus amigos de trabalhos. Obrigado por compreender quando era necessário me ausentar, dando-me sempre força.

Ao toda equipe do laboratório de ecologia microbiana - EMBRAPA, Obrigada! Agradeço pela boa vontade, pois tenho certeza que foi feito o melhor.

A Bióloga Claudia Alexandrino, obrigada por ter se mostrado solícita e ter auxiliado este trabalho com presteza e carinho. Isso, apesar de não sua área de atuação, você se mostrou por livre e espontânea vontade, prestativa. Muito obrigada!

Ao meus amigos que não foram citados, mas que me ajudaram direto e indiretamente na realização deste trabalho.

“Não há nada impossível, porque os sonhos de ontem são as esperanças de hoje e podem converter-se em realidade amanhã”.

(Autor desconhecido)

RESUMO

CONCEIÇÃO, Renata Briata **Caracterização do processo fermentativo e da microbiota envolvida na produção do kefir de água** 56p Dissertação (Mestrado profissional em Agricultura orgânica. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2000.

O kefir de água é um produto fermentado com características probióticas capaz de melhorar o equilíbrio da flora intestinal e tem sido utilizado para acelerar os processos de decomposição da matéria orgânica utilizado na preparação de substratos importantes para uma agricultura de base ecológica. O kefir de água resulta de um processo de fermentação da sacarose com a subsequente formação de grãos. Dada a simplicidade de produção, o kefir de água pode ser preparado diretamente na propriedade dando ao agricultor independência evitando a aquisição de produtos similares no mercado. A produção de kefir na unidade de produção cria motivação para outros usos, tais como, atividades probióticas. O presente trabalho teve como objetivo determinar as condições de preparo do kefir de água para obtenção de um produto com células viáveis capaz de ser multiplicado diretamente pelo produtor rural. O trabalho foi realizado no laboratório de Ecologia Microbiana da Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ, Brazil. Uma solução de açúcar mascavo Arma Zen[®] (5%, 10% e 20% mv^{-1}) em água destilada estéril (350 mL) foi inoculada com grãos de kefir lavados (35 g). Procedeu-se à incubação das culturas na temperatura de 28°C durante 7 dias. Foram coletadas amostras ao 1, 3 e 7 dias de incubação. Foram avaliados os seguintes parâmetros: produção de massa de grãos, pH da fase líquida, teor de proteínas totais nas fases sólida e líquida, contagem e composição de microrganismos presentes na fase líquida a partir de cultivo nos meios MRS e DYGS. Foram realizadas três repetições para cada tratamento. A maior massa de grãos foi obtida com a concentração de 20% de açúcar após sete dias de crescimento. O pH decresceu ao longo do período de incubação, sendo o decréscimo nas primeiras 24 horas maior observado nas amostras com 5% de açúcar. Os maiores valores de proteína da fase líquida foram observados no início do período de incubação, enquanto a proteína dos grãos aumenta gradativamente ao longo do período atingindo um máximo aos 3 ou 7 dias dependendo da concentração de açúcar disponível. Esses resultados sugerem que a multiplicação dos microrganismos ocorre na fase líquida e, os mesmos, gradativamente, migram para os grãos. Foi obtido um total de 25 isolados representativos de diferentes tipos morfoculturais, sendo que desses, 11 foram isolados do meio MRS e 14 do meio Dygs. O seqüenciamento do 16S rDNA mostrou a presença de sete gêneros bacterianos (*Acetobacter*, *Burkholderia*, *Methylobacterium*, *Mucilagibacter*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* e *Stenotrophomonas*, um de actinobactéria (*Microbacterium*) e um de levedura (*Sacharomyces*). A recuperação dos isolados a partir das preparações de kefir com 5% de açúcar mascavo apresentou principalmente gêneros bacterianos, incluindo-se as actinobactérias, que foram comuns a todas as preparações de kefir independente da concentração de açúcar disponível. Leveduras só apareceram nas concentrações de 10 e 20% de açúcar. Em termos de sucessão microbiana, os gêneros bacterianos foram mais comuns no início do período de incubação, enquanto as concentrações de actinobactérias e leveduras aumentaram ao longo desse período.

Palavras-chave: Kefir, probióticos, microrganismos eficazes

ABSTRACT

CONCEIÇÃO, Renata Briata **Characterization of the fermentation and the microbiota involved in the production of water kefir**. 56 p Dissertation (Master in Professional Organic Agriculture. Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2000.

The water kefir is a fermented product with probiotic characteristics capable of improving the condition of intestinal flora and accelerate the decomposition of organic matter used in the preparation of substrates important for an ecologically-based agriculture. The water kefir results from a sucrose fermentation with subsequent grain formation. Given the simplicity of production, the water kefir can be prepared directly in the property giving the farmer independence regarding the acquisition of similar products on the market. The production of kefir on the farm is capable to improve other uses, such as probiotic activities. This study aimed to determine the conditions of preparation of kefir water to obtain a product with viable cells that can be multiplied directly by the farmer. The work was performed in the laboratory of Microbial Ecology at Embrapa Agrobiology, Seropédica, RJ, Brazil. A solution of brown sugar ArmaZen® (5%, 10% and 20% mv-1) in sterile distilled water (350 mL) was inoculated with washed kefir grains (35 g). Culture incubation was proceeded at 28 ° C for 7 days. Samples were collected at 1, 3 and 7 days of incubation. The following parameters were evaluated: mass production of grain, pH of the liquid phase, total protein content in solid and liquid phases, and microorganisms counting and composition in the liquid phase using MRS and DYGS culture media. Three repetitions were performed for each treatment. The largest grain mass was obtained with the 20% concentration of sugar after seven days of growth. The pH decreased over the incubation period and the highest decrease observed during the first 24 at 5% of sugar. The largest amounts of protein in the liquid phase were observed early in the incubation period, while the protein of the grains increased gradually over the period reaching a maximum at 3 or 7 days depending upon the concentration of sugar available. These results suggest that the multiplication of microorganisms occurs in the liquid phase while they gradually migrate to the grain. A total of 25 representative isolates of different morfocultural types was obtained: 11 were isolated from MRS medium and 14 from the DYGS medium. Sequencing of the 16S rDNA showed the presence of seven bacterial genera (*Acetobacter*, *Burkholderia*, *Methylobacterium*, *Mucilaginibacter*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* and *Stenotrophomonas*, one of actinobacteria (*Microbacterium*) and one yeast (*Saccharomyces*). Recovery of preparations isolated from kefir wiht 5% brown sugar presented primarily bacterial genera, including the actinobacteria, which were common to all kefir preparations independent of the sugar concentration. Yeasts appeared only at 10 and 20% sugar concentrations. The microbial succession established was characterized by the bacterial genera being more common at the beginning of the incubation period, while actinobacteria and yeast concentrations increased over this period.

Keywords: kefir; probiotics, effective microorganisms,

SUMÁRIO

Conteúdo

1 INTRODUÇÃO	1
2 HIPÓTESE	3
3 OBJETIVO GERAL	3
3.1 Objetivos específicos	3
4 REVISÃO DE LITERATURA	4
4.1 Bokashi.....	4
4.2 Microrganismos Eficazes (“EM [®] ”).....	5
4.3 Kefir.....	5
4.4 Bactérias do ácido láctico	10
4.5 Leveduras.....	11
4.6 Caracterização do Kefir de Água	11
4.7 Kefir na agricultura	13
4.8 Técnicas Moleculares	14
5 MATERIAL E MÉTODOS	16
5.1 Obtenção de grãos de kefir de água.....	16
5.2 Determinação da massa fresca dos grãos e do pH da fase líquida.....	16
5.3 Determinação de proteína total na fase líquida e nos grãos	16
5.4 Quantificação de bactérias e leveduras totais na fase líquida	17
5.5 Caracterização morfocultural.....	17
5.6 Extração de DNA e Amplificação do gene 16S rRNA e Internal Transcribed Spacer Region (ITS).....	17
5.7 Sequenciamento do gene 16S rRNA e ITS	18
5.8 Produção experimental do Bokashi	18
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
6.1 Influência da concentração de açúcar e do tempo de incubação no preparo do kefir de água.....	20
6.1.1 Massa fresca dos grãos e pH da fase líquida.....	20
6.1.2 – Concentração de proteína na fase líquida e nos grãos de kefir.....	22
6.2 Quantificação de bactérias e leveduras totais.....	24

6.3 Isolamento, caracterização morfo-cultural e seqüenciamento dos microrganismos cultivados nos meios MRS e DYGS	26
6.4 Composição da comunidade microbiana cultivada nos meios MRS e DYGS.....	28
6.5 Produção do bokashi.....	39
7 CONCLUSÕES.....	40
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

LISTA DE ABREVIATURAS

EM – Microrganismos Eficazes

BALs – Bactérias do ácido lático

BOD – Demanda Bioquímica de Oxigênio

BSA – Albumina de Soro Bovino

BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Microbiota dominante encontrada no Kefir e algumas características8
- Tabela 2.** Efeito da concentração de açúcar e período de incubação sobre a massa de grãos e pH da fase líquida de kefir de água.205
- Tabela 3.** Dosagem de proteína total da fase líquida e grãos de kefir de água com três concentrações de açúcar em três épocas de avaliação.22
- Tabela 4.** Caracterização morfocultural e seqüenciamento de isolados obtidos a partir da fase líquida do kefir de água em dois meios de cultura. 4 A. Meio MRS, 4B. Meio Dygs.....27
- Tabela 5.** Variabilidade microbiana a partir dos tipos morfoculturais presentes em kefir com diferentes concentrações de açúcar ao longo dos 7 dias. Meio MRS e meio DYGS29

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Reações bioquímicas e microorganismos envolvido no processo de fermentação da sacarose para obtenção do kefir de água. 13
- Figura 2.** Recipiente de vidro cilíndrico contendo 350ml de água autoclavada, 35 de grãos de kefir com três diferentes concentrações de açúcar mascavo 16
- Figura 3.** Percentual de redução do pH da fase líquida do kefir de água com diferentes concentrações de açúcar mascavo.21
- Figura 4.** Teor de proteína total no sobrenadante e nos grãos de kefir de água com três concentrações de açúcar, no primeiro, terceiro e sétimo dias de crescimento a 28 °C.....24
- Figura 5.** Número total de colônias microbianas obtidas a partir da fase líquida do kefir de água (A) Meio MRS; (B) Meio DYGS25
- Figura 6 .** Frequência de isolados obtidos a partir do sobrenadante do kefir de água em meio MRS44
- Figura 7.** Número de unidades formadoras de colônias dos microrganismos obtidos em meio MRS a partir do sobrenadante do kefir de água com três concentrações de açúcar.....45
- Figura 8 .** Frequência de isolados obtidos a partir do sobrenadante do kefir de água em meio DYGS46
- Figura 9.** Número de unidades formadoras de colônias dos microrganismos obtidos em meio DYGS a partir do sobrenadante do kefir de água com três concentrações de açúcar.....47

1 INTRODUÇÃO

O kefir, originário do eslavo, significa “bem-estar”. É um produto com características probióticas capaz de melhorar o equilíbrio da flora intestinal (MIGUEL, 2010) e tem sido sugerido como capaz de acelerar os processos de decomposição da matéria orgânica. O produto é definido como uma suspensão de microrganismos formada por bactérias acidófilas e leveduras consistindo em uma interação tipo simbiótica. É um produto fermentado originário das montanhas Caucásicas da Rússia utilizado desde a idade média (MOREIRA, 2008). Os grãos do kefir de água são massas mucilaginosas transparentes pequenas contendo polissacarídeos (dextrans) com cadeias compostas apenas de glicose (GULITZ, 2011). A composição microbiana dos grãos de kefir varia conforme a região de origem, o tempo de utilização, o substrato utilizado para a proliferação dos grãos e as técnicas usadas em sua manipulação (WSZOLEK *et al.*, 2001; WITTHUHN *et al.*, 2004).

No Brasil, a divulgação da bebida kefir é relativamente nova e o seu consumo ainda é exclusivamente artesanal, obtido a partir da fermentação do leite (kefir de leite) ou da sacarose (kefir de água). A maioria das pessoas em nosso país desconhece o produto, bem como os possíveis benefícios da inclusão deste alimento probiótico na dieta (CARNEIRO, 2010). Já Bezerra e colaboradores (1999) comentaram que embora ainda não industrializado no Brasil, o kefir tem conquistado adeptos em várias regiões do país. A preparação em escala artesanal resulta em um produto com características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas ainda não bem definidas. Carneiro (2010) também acrescenta que apesar de formar um produto com valor nutricional e terapêutico, o método tradicional de obtenção do kefir por culturas sucessivas com reinoculação dos grãos gera produtos não padronizados. A composição da microbiota pode variar de uma produção para outra, ocorrendo perda de algumas cepas de leveduras ou bactérias durante a sequência de transferências, e também variar em função da fonte. Assim, dada a sua complexidade e a necessidade da presença de células viáveis é difícil a manutenção de um padrão de qualidade *stricto sensu*. No entanto, a aplicação de uma adequada combinação de bactérias ácido láctica e leveduras iniciadoras pode fornecer um kefir uniforme com propriedades morfológicas e organolépticas específicas que, podem vir reconhecidas de modo a garantir um produto dentro de uma faixa de qualidade.

Além das propriedades probióticas sobre a saúde animal, o kefir é também considerado como um biofertilizante caracterizado por alta atividade microbiana e bioativa que atua nutricionalmente sobre o metabolismo vegetal e na ciclagem de nutrientes do solo, sendo de baixo custo e podendo ser produzido *in loco* pelo agricultor (CHABOUSSOU, 1985). Sob condições adequadas, esses microrganismos benéficos podem controlar populações de fitopatógenos e/ou produzir substâncias e nutrientes fundamentais para as plantas e para o solo, representando um recurso importante para o desenvolvimento de plantas saudáveis e contribuindo para a sustentabilidade da agricultura (KIEHL, 1998).

O kefir de água é utilizado na preparação de substratos, como por exemplo o bokashi auxiliando o processo fermentativo e substituindo produtos comerciais. Dada a simplicidade de produção, o kefir de água pode ser preparado diretamente na propriedade dando ao agricultor independência evitando a aquisição de produtos similares no mercado. Deve ser considerado que além do custo, estes produtos nem sempre estão facilmente disponíveis. A produção de kefir na unidade de produção cria motivação para outros usos, tais como, atividades probióticas em animais domésticos e de produção e mesmo para consumo humano.

Apesar dos resultados promissores do uso dos grãos de kefir em sistemas orgânicos, ainda existe a escassez de informações com relação a produção adequada dos grãos de kefir para o seu uso na agricultura.

O desenvolvimento do presente trabalho orientou-se pelas seguintes questões técnicas:

- Quais as condições adequadas de preparo de kefir para a sua utilização na elaboração do bokashi?
- A utilização de água com sacarose em diferentes proporções, associado ao binômio tempo e temperatura de incubação influencia no desenvolvimento do kefir de água?
- O kefir de água pode substituir os microrganismos comerciais (inoculantes) com a mesma eficácia?
- Qual a quantidade e concentração de kefir de água para a preparação de um bokashi adequado?
- Qual a composição da microbiota do kefir?

Neste sentido o presente trabalho tem como objetivo determinar as condições de desenvolvimento do kefir de água para uso como inoculante na preparação do bokashi.

2 HIPÓTESE

- Pela sua composição microbiana, o kefir de água; pode auxilia com eficácia o processo fermentativo na preparação do Bokashi.
- O desenvolvimento do kefir de água é influenciado pela concentração de sacarose, pelo tempo de incubação e pela temperatura, entre outras características.
- A composição microbiana do kefir é bem diversificada, podendo variar com a origem do kefir.

3 OBJETIVO GERAL

O trabalho tem como objetivo determinar as condições de preparo do kefir de água para obtenção de um produto a base de microrganismos eficazes, capaz de ser multiplicado diretamente pelo produtor rural para ser usado como biofertilizante.

3.1 Objetivos específicos

Determinar a influência da concentração de açúcar e do tempo de incubação no preparo do kefir de água, através da incubação dos grãos de kefir de água com três diferentes concentrações de açúcar (5%, 10% e 20%), em três períodos incubação (1,3 e 7 dias).

Avaliar a produção de massa de grãos, o pH da fase líquida, o teor de proteínas totais presentes nas fases sólida e líquida e a composição de bactérias e leveduras presentes na fase líquida, pois a fase líquida é produzida em maior quantidade em relação aos grãos e manipulada com facilidade, podendo o produtor rural utilizar o produto com frequência.

4 REVISÃO DE LITERATURA

Nos últimos anos, o sistema de produção orgânica com a utilização de biofertilizantes teve um grande crescimento no Brasil. Uma das principais características dos biofertilizantes é a presença de microrganismos responsáveis pela degradação da matéria orgânica (BETTIOL et al., 1998), os quais produzem maiores proteções e induzem resistência das plantas ao ataque de agentes externos.

Uma das técnicas bem difundida entre os agricultores é a produção de bokashi, um composto orgânico feito com diversos tipos de farelos, fermentados por microrganismos benéficos que fornecem diversos tipos de micro e macronutrientes à planta. Estes microrganismos benéficos, também chamados de eficazes podem ser adquiridos comercialmente ou via produção caseira, tais como o Kefir, um produto com características probióticas, capaz de melhorar o equilíbrio, como também acelera a decomposição da matéria orgânica, pois nas condições adequadas os microrganismos benéficos podem controlar populações de fitopatógenos e/ou produzir substâncias e nutrientes importantes para as plantas e para o solo (vitaminas, aminoácidos, hormônios, enzimas, etc.), representando um recurso importante para o desenvolvimento de plantas saudáveis e contribuindo para a sustentabilidade da agricultura (KIEHL, 1998).

Tão importantes quanto as características físico-químicas do solo são seus componentes biológicos, ou seja, a diversidade genotípica e metabólica dos microrganismos edáficos. (TAYLOR et al., 2002).

4.1 Bokashi

No início dos anos 80 passou a haver um maior questionamento das práticas utilizadas na agricultura convencional. As publicações direcionadas para os produtores resgataram e divulgaram produtos e práticas conservacionistas que trazem benefícios para a agricultura, sendo que dentre estes, destaca-se o bokashi.

A palavra japonesa bokashi significa borrar ou diluir materiais orgânicos, por exemplo, farelos fermentados, evitando-se assim o seu uso concentrado que pode causar danos às plantas, podendo ser usado na adubação de cobertura e em covas (PENTEADO, 2006).

Bokashi é um mistura de diversos tipos de matéria orgânica farelada submetida à fermentação, predominantemente do tipo láctica e, em menor intensidade, dos tipos: acética, alcoólica, propiônica, butírica, entre outras. Em geral, a fermentação é obtida utilizando-se como inóculo material rico em microrganismos tais como bactérias e leveduras de ocorrência natural no ambiente. Na confecção do bokashi, esses microrganismos agem sobre a matéria orgânica fermentado-a produzindo ácidos orgânicos, vitaminas, enzimas, aminoácidos e polissacarídeos que beneficiam o desenvolvimento vegetal (HIGA & WIDIDANA, 1991).

Na produção do bokashi, os fatores umidade, temperatura, tipo e estado das matérias prima e proporções de carbono e nitrogênio, são os que mais interferem na obtenção de uma fermentação eficiente, que pode ser anaeróbica ou aeróbica (GREGORIO *et al.*, 2004).

A fermentação anaeróbica ocorre na ausência de oxigênio. Nestas condições, são estimuladas populações microbianas específicas e não é necessário o revolvimento do material para o controle da temperatura e aeração. Além disso, o processo de fermentação ocorre à temperatura ambiente (PENTEADO, 2006).

A fermentação é aeróbica quando os microrganismos utilizam oxigênio para o seu metabolismo e há elevação de temperatura, sendo necessário o revolvimento das leiras para fermentação, como ocorre nos processos comuns de compostagem, com a finalidade de aeração e controle da temperatura (PENTEADO, 2006).

Segundo HOMMA (2003), além do fornecimento de nutrientes, o bokashi também carrega microrganismos do tipo “regeneradores” que atuam promovendo a “fermentação” da biomassa, proporcionando rapidamente condições favoráveis à atuação de outros microrganismos benéficos ao solo e às plantas.

Os microrganismos que são usados para a elaboração do bokashi podem ser adquiridos através da aquisição de produtos comerciais, do tipo EM[®] (microrganismos eficazes) ou multiplicados de forma caseira através da produção do kefir de água.

4.2 Microrganismos Eficazes (“EM[®]”)

Desenvolvido por Teruo Higa, na universidade de Ryukyus, Okinawa, no Japão, em 1980, o produto contendo microrganismos eficazes (EM[®]) consiste de culturas mistas de bactérias produtoras de ácido láctico, bactérias fotossintetizantes, leveduras, actinomicetos, fungos filamentosos e outros microrganismos que ocorrem naturalmente no meio ambiente.

O EM[®] pode ser utilizado como inoculante visando o aumento rápido da diversidade e do número de microrganismos benéficos presentes no solo e associados às plantas. Sua utilização regenera o solo, aumenta a produção vegetal, integra equilíbrio biológico e qualidade do produto agrícola (HOMMA, 2003; CHAGAS et al., 1999).

Iwahori e Nakagawara (1996), Iwaishi (1994) e Suzuki (1985) demonstraram que a tecnologia de aplicação de microrganismos eficazes em conjunto com a aplicação de matéria orgânica ao solo é capaz de promover incremento da produção vegetal, proporcionando condições adequadas para que esses microrganismos possam produzir substâncias e nutrientes fundamentais para plantas e solo.

No entanto, em outros estudos não foi possível mostrar efeito do EM na produção do bokashi devido às flutuações de condições ambientais e falta de conhecimento científico na manipulação e aplicação do produto (KATO *et al.*, 1992.; NOPARATRARAPORN, 1996).

4.3 Kefir

O kefir, originário das montanhas Caucásicas da Rússia, vem sendo utilizado desde a idade média. O termo eslavo *keif* significa "bem-estar" ou "bem-viver".

O kefir apresenta características probióticas, ou seja, possui em sua composição microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo que o consome. Além disso, possibilita também a aceleração da decomposição da matéria orgânica e promove o equilíbrio da composição de microrganismos (FARNWORTH, 2005; VINDEROLA *et al.*, 2005).

Após mais de mil anos de uso não há indício da presença de microrganismos patogênicos no kefir. As suspensões de kefir são ainda capazes de suprimir o crescimento de alguns patógenos, tais como *Salmonella* e *Shigella* (KOROLEVA, 1988; VITORIA & LAUSADA, 2001).

A Instrução Normativa 46 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) do Brasil define kefir como um produto da fermentação do leite pasteurizado ou esterilizado. Nessa mistura distinguem-se a fase líquida - o sobrenadante, e a fase sólida - grãos precipitados que são usados como inóculo para o preparo do kefir.

O kefir de leite geralmente apresenta as seguintes características: pH entre 4,2 e 4,6; cerca de 0,8% (m/m) de ácido láctico; álcool na proporção de 0,1 a 2,0% (m/v), conteúdo de gordura dependente do leite utilizado; textura macia; e um sabor ácido, picante e levemente efervescente, resultando numa bebida muito refrescante. As características de sabor picante e sensação efervescente podem ser consideradas como o sabor típico do kefir, o qual é devido principalmente à ótima proporção (3:1) entre diacetil e diacetaldeído (MANUS, 1979; KEMP, 1984; DUITSCHAVER et al., 1987; GORSKI, 1994; MESQUIARI, 1999).

A composição microbiológica dos grãos de kefir é extremamente complexa e incerta dependendo de sua origem. Os fatores que interferem nesta natureza parecem ser, principalmente, de ordem geográfica e do substrato utilizado na proliferação dos grãos (OLIVEIRA, 2005). Embora originalmente os grãos fossem cultivados apenas em leite pasteurizado, outros substratos foram testados como meio de cultivo, como por exemplo, solução aquosa de açúcar mascavo na concentração de 3 a 10%, suco de frutas e soro de leite (MIGUEL, 2009).

Bezerra *et al.* (1999) relata que no Brasil o kefir é praticamente desconhecido e se restringe a algumas famílias que multiplicam regularmente o “fermento” ou os “grãos de kefir” e a ele adicionam leite ou água com açúcar mascavo, obtendo um produto fermentado, de qualidade e características variáveis. Popularmente, é dito que os grãos de kefir de leite representam a cultura mãe originária do Cáucaso, porém não há provas para fundamentar esse fato e as evidências científicas disponíveis até o momento indicam que as cepas microbianas podem variar dependendo do produto.

O Kefir é de difícil industrialização e atualmente somente alguns países do mundo industrializam o produto e investem em estudos para aperfeiçoar o kefir comercial.

No Brasil, a *Biologicus* é a única produtora de kefir industrializado, atualmente incubada no itep (acessado em : www.caminhosdocorpo.pro.br/mostranews.)

Bezerra et al. (1999) comentaram ainda que, embora ainda não industrializado em larga escala no Brasil, o kefir vem conquistando adeptos em várias regiões do país. Sua preparação, apenas em escala artesanal, resulta em um produto com características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas ainda não bem definidas. Existe diversos sites referentes ao kefir, onde adeptos ao produto trocam informações e até mesmo ocorre venda ou doação do kefir, tanto de água, quanto de leite (Anexo)

Na suspensão e nos grãos de kefir em geral são encontradas bactérias ácido lácticas dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Streptococcus* que são responsáveis pela produção de ácido láctico, etanol e dióxido de carbono, enquanto

Acetobacter produzem ácido acético a partir do etanol. Também estão presentes leveduras fermentadoras de lactose (*Kluyveromyces marxianus*) e leveduras não fermentadoras de lactose (*Saccharomyces omnisporus* e *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces exiguus*) *Candida* e *Torula* (Tabela 1).

A comunidade microbiana do kefir de água é fortemente influenciada pela origem do inóculo, e pelo substrato utilizado para a multiplicação dos grãos, assim como o método adotado para sua caracterização. Em geral, as populações de bactérias do ácido láctico e do ácido acético juntamente com leveduras dos gêneros *Saccharomyces* e *Kluyveromices* são mais freqüentes (SCHNEENDORF & ANFITEATRO, 2004).

No estudo conduzido por Bergmann et al. (2010) classificou-se as espécies *Lactobacillus cremoris lactis*, *Chryseomonas luteola*, *Candida coiloculosa*, *Candida magnoliae*, *Kloekera* sp. e *Candida famata* como espécies eventuais nos grãos e no sobrenadante de kefir de água porque não foram descritas em estudos anteriores levantados pelos autores.

Outro aspecto relacionado à composição microbiológica do kefir é a impossibilidade de produzir kefir a partir de microrganismos isolados. KOROLEVA (1991) afirmou que bactérias e leveduras do kefir, quando isoladas e separadas, não cresciam no leite ou tinham sua atividade bioquímica reduzida, dificultando o estudo da população microbiana dos grãos de kefir.

Apesar da intensa pesquisa de inúmeras tentativas realizadas para produzir grãos de kefir a partir de culturas puras ou mistas, normalmente presentes nos grãos, nenhum resultado positivo foi relatado (LIBUDZISZ & PIATKIEWICZ, 1990). Isto provavelmente pode ser atribuído ao fato de que o mecanismo de formação dos grãos ainda não é conhecido. É muito provável que uma combinação de diferentes fatores tenha influência no aumento da biomassa dos grãos de kefir, incluindo a renovação de leite em intervalos regulares, a temperatura de cultivo, lavagem dos grãos e a presença de nutrientes essenciais na concentração correta no meio de crescimento (CHEN et al., 2009).

Wyder, Spllermam e Puhan (1997) acreditam ser o próprio grão do kefir o melhor iniciador do seu crescimento. Assadi, Pourahmad e Moazami (2000) estudaram formas de proliferação do kefir e confirmaram que o crescimento é melhor quando se utiliza o próprio grão como colônia iniciadora para o seu cultivo.

Em suma, os grãos de kefir contêm uma microbiota grande e variada, como explicitado na Tabela 1 (OLIVEIRA,2005)

Tabela 1. Microbiota dominante encontrada no Kefir e algumas características

Microrganismo	Função	Referência
<u>Bactérias</u> <i>Lactobacillus (L. casei, L. paracasei)</i>	Produção de lactato	Pidoux et al., 1990; Ohara et al., 1997; Franzetti et al., 1998; Mitsue, Tachibana & Fujio, 1999; Marquina et al., 2002.
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	Produção de arabinose e polissacarídeo a partir de sacarose	Pidoux et al., 1990; Leroi & Couroux, 1996; Lin & Chen, Liu, 1999.
<i>Lactobacillus desidiosus</i>	Fermentação de L-arabionose e gluconato	Marshall, Cole & Farrow, 1984.
<i>Lactobacillus Kefiranofaciens</i>	Produção de kefirano interno	Arihara, Toba & Adachi, 1990; Garrote, Abraham & Antonini, 1997; Takizawa et al., 1998;
<i>Lactobacillus Kefir</i>	Produção de kefirano superficial	Arihara, Toba & Adachi, 1990; Ângulo Lopes & Lema, 1993; Garrote, Abraham & Antonini, 1997; Takizawa et al., 1998; Garrote, Abraham & Antonini, 2001.
<i>Lactobacillus Acidophilus</i>	Homofermentativo	Ângulo Lopes & Lema, 1993; Simova et al., 2002.
<i>Lactobacillus (L. brevis, L. helveticus, L. parakefir, L. kefirgranum, L. viridescens, L. fermentus, L. casei ssp. Rhamnosus, L. casei ssp. Tolerans, L. casei ssp. Pseudopantarum, L. gasseri, L. delbrueckii ssp. bulgarius, L. palntarum)</i>	Homofermentativa obrigatório; heterofermentativa facultativa e heterofermentativa obrigatório	Arihara, Toba & Adachi, 1990; Angulo, Lopes & Lema, 1993; Garrote, Abraham & Antonini, 1997; Takizawa et al., 1998; Watabe et al., 1998; Lin, Chen & Liu, 1999; Garrote, Abraham & Antonini, 2001; Marquina et al., 2002; Simova et al., 2002.
<i>Leuconostoc spp. e Leuconostoc mesenteroides</i>	Heterofermentativa Utilizada como culturas iniciais; Converte sacarose em dextrana; Altamente tolerante à	Ângulo Lopes & Lema, 1993; Ohara et al., 1997; Lin, Chen & Liu, 1999; Garrote, Abraham & Antonini, 2001.

	elevação da concentração de sal e açúcar.	
<i>Streptococcus spp.</i> (<i>S. salivarius ssp.Thermophilus, S.lactis ssp.Lactis, S. thermophilus</i>)	Produção de ácido láctico, etanol e dióxido de carbono; Produção de dextrana	Ângulo, Lopes & Lema, 1993; Garrote, Abraham & Antonini, 1997; Ohara et al., 1997; Mitsue, Tachibana & Fujio, 1999; Garrote, Abraham & Antonini, 2001; Simova et al., 2002.
<i>Lactococcus spp.</i> (<i>L. lactis ssp.Diacetylactis, L.lactis ssp. Lactis</i>)	Homofermentativa; Converte a lactose em ácido láctico.	Ângulo, Lopes & Lema, 1993; Garrote, Abraham & Antonini, 1997; Ohara et al., 1997; Mitsue, Tachibana & Fujio,1999; Garrote, Abraham & Antonini, 2001.
<i>Acetobacter</i>	Converte etanol em ácido acético em aerobiose	Mitsue, Tachibana & Fujio,1999; Garrote, Abraham & Antonini, 2001.
<u>Leveduras e bolores</u> <i>Sacharomyces spp.</i> (<i>S. lipolytic, S.florentinus, S. cerevisal, S.unisporus</i>)	Ação probiótica; Não fermentadora de lactose	Ângulo, Lopes & Lema, 1993; , Leroi & Courcoux, 1996; Garrote, Abraham & Antonini, 1997; Ohara et al., 1997; Mitsue, Franzetti et al., 1998; Tachibana & Fujio,1999; Simova et al., 2002.
<i>Kluyveromyces (K. lactis, K.marxianus)</i>	Fermentadora de lactose; Oxida a lactose e produz glicose, galactose e etanol	Ângulo, Lopes & Lema, 1993; Lin, Chen & Liu, 1999; Garrote, Abraham & Antonini, 2001; Simova et al., 2002.
<i>Candida spp.</i> (<i>C. kefir, C.friedrich, C. inconspícua, C.maris</i>)	Não fermentadora de lactose	Ângulo, Lopes & Lema, 1993; Ohara et al., 1997; Mitsue, Tachibana & Fujio,1999; Simova et al., 2002.
<i>Torulaspóra spp.e Torulaspóra delbruechii</i>	Não fermentadora de lactose	Ângulo, Lopes & Lema, 1993;Ohara et al., 1997; Mitsue, Tachibana & Fujio,1999.
<i>Hansenula yalbensis</i>	Função não determinada	Franzetti et al.,1998.
<i>Geotrichum candidum</i>	Função não determinada	Garrote, Abraham &

		Antonini, 1997.
<i>Pichia fermentans</i>	Função não determinada	Ângulo, Lopes & Lema, 1993; Leroi & Courcoux, 1996; Lin, Chen & Liu, 1999.

4.4 Bactérias do ácido láctico

As bactérias do ácido láctico (BALs) são bacilos Gram positivos, que não esporulam. Geralmente são imóveis, catalase negativo e anaeróbios aerotolerantes (OLIVEIRA, 2005). São consideradas bactérias mesofílicas, embora possam apresentar crescimento em extremos de temperatura. Crescem em pH ácido e requerem para o seu crescimento aminoácidos pré-formados, tais como purina, pirimidina e vitaminas do complexo B devido à reduzida atividade proteolítica e lipolítica (JAY, 2005).

BALs são largamente utilizadas para a produção de alimentos fermentados e seu consumo traz benefícios para os seres humanos, tais como a produção de enzimas que favorecem a digestão e absorção de alimentos. A produção de lactases, por exemplo, é de extrema importância para pessoas intolerantes à lactose porque não conseguem digerir produtos lácteos, (http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/143.pdf).

Devido à produção de ácidos orgânicos, compostos antagonistas e competição por nutrientes, BALs podem controlar fungos produtores de micotoxinas em alimentos (DALIÉ et al., 2010).

No kefir, BALs produzem ácido láctico, diminuindo o pH até que sua produção seja inibida e componentes que dão sabor, tais como acetaldeídos, sejam produzidos e contribuam para que a bebida tenha o aroma típico do leite fermentado (LOPITZ-OTSOA et al., 2006). Além do ácido láctico, essas bactérias também produzem outros metabólitos a partir da fermentação de carboidratos e, de acordo com o produto formado, são classificadas como homoláticas quando produzem principalmente ácido láctico e heteroláticas quando também produzem etanol e CO₂ (MADIGAN, 1997; JAY, 2005; LEISNER et al., 2000).

Lactobacillus é o maior gênero de BALs do qual fazem parte espécies homofermentativas obrigatórias, heterofermentativas facultativas e heterofermentativas obrigatórias. Esse tipo de metabolismo leva à acidificação dos alimentos e por isso são consideradas bactérias acidúricas ou acidofílicas, (FERREIRA, 2003; CRISPIM, 2008). BALs constituem um grupo diversificado e amplamente distribuído, podendo ser encontradas em substratos fermentáveis com certas vitaminas, sais e aminoácidos. Já foram isoladas do solo, água, matéria orgânica, cavidade oral, trato intestinal e urogenital de seres humanos e outros animais (DELLAGLIO & FELIS, 2007).

Lactococcus são bactérias homofermentativas, sendo a espécie *Lactococcus lactis* largamente utilizada na indústria alimentícia para a produção de diversos tipos de queijos, manteiga, leite desnatado e kefir. Quando a lactose é convertida em ácido láctico ocorre redução do pH do produto, o que previne o crescimento de uma gama de bactérias e fungos indesejáveis (JAY, 2005; NOMURA et al., 2006; disponível em: http://textbookofbacteriology.net/lactics_5.html)

Leuconostoc são BALs heterofermentativas, altamente tolerantes à elevadas concentrações de sal e de açúcar (JAY, 2005). Linhagens de *Leuconostoc* também são utilizadas como culturas iniciadoras em fermentações lácteas e por meio da utilização do citrato, produzem compostos aromáticos, como diacetil e acetoina. Algumas linhagens produzem quantidades grandes de dextrana quando cultivados em sacarose (JAY, 2005; MADIGAN et al., 1997).

4.5 Leveduras

As leveduras são fungos unicelulares do grupo dos ascomicetos e basidiomicetos, que possuem fases de reprodução sexuada (teleomórfica) e assexuada (anamórfica). Crescem em uma variedade de substratos e podem tolerar condições extremas ocupando uma gama de nichos ecológicos (QUEROL & BELLOCH, 2003).

Historicamente, as leveduras assumem grande importância biotecnológica para a produção de alimentos, com destaque para os pães e as bebidas alcoólicas. As leveduras do kefir de leite são divididas em dois grupos de acordo com a capacidade de fermentar a lactose. O grupo de espécies que não oxida a lactose, utiliza a galactose que é um produto da assimilação de lactose pelo grupo de leveduras e de BALs, homofermentativas ou heterofermentativas que favorecem as populações de leveduras. Por sua vez, as leveduras têm atividade lipolítica e proteolítica e aumentam o conteúdo de aminoácidos livres, podendo produzir vitaminas que estimulam a população de BALs (LOPITZ-OTSOA et al., 2006)

No estudo conduzido por Cheirsilp e colaboradores (2003) demonstrou-se que quando *L. kefiranofaciens* e *Saccharomyces cerevisiae* foram cultivados no mesmo meio de cultura, a população de *L. kefiranofaciens* foi estimulada em comparação ao cultivo isolado com conseqüente aumento da produção de kefiran (polímero de glicose e galactose).

O gênero *Saccharomyces* compreende aproximadamente quatorze espécies distribuídas em três grupos. As espécies do complexo *Saccharomyces stricto sensu* têm aplicação biotecnológica na indústria de alimentos, sendo considerados microrganismos domesticados. Em geral, um reduzido número de espécies de *Sacharomyces* pode fermentar a lactose, enquanto a maioria pode fermentar a galactose (QUEROL & BELLOCH, 2003).

O gênero *Kluyveromyces* contém cerca de dezoito espécies das quais se destaca *Kluyveromyces lactis*. Essa espécie compreende duas variedades que podem ou não fermentar a lactose, var. *lactis* e var. *drosophilarum*, respectivamente. A espécie *K. marxianus* pode oxidar a lactose e produzir glicose, galactose e etanol (QUEROL & BELLOCH, 2003).

4.6 Caracterização do Kefir de Água

O kefir de água é produzido a partir de processo fermentativo onde a sacarose (açúcar minimamente processado) é utilizada como substrato. Durante a fermentação os grãos aumentam de peso e assim é obtida nova biomassa que após ser coada do substrato pode ser reutilizada para obtenção de nova bebida (GARROTE, et al, 2001). Ele também é preparado adicionando-se à solução de açúcar, figos secos e fatias de limão que são retiradas antes da bebida ser consumida (GULITZ et al., 2011). A bebida resultante é turva, ácida, levemente alcólica e carbonatada (LOPITZ-OTSOA et al., 2006).

Os grãos do kefir de água e de leite são massas mucilaginosas transparentes, pequenas e leves, que contêm proteínas lipídeos e polissacarídeos solúveis que formam um complexo que envolve os fungos e as bactérias (LOPITZ-OTSOA et al., 2006).

Os polissacarídeos solúveis presentes no kefir são representados principalmente pelas dextranas que têm elevado peso molecular e constituem uma larga classe de biopolímeros extracelulares. São flexíveis, biodegradáveis e não apresentam toxidez; (<http://www.s bq.org.br/ranteriores/23/resumos/0176-2/index.html>). São empregadas nas indústrias químicas, alimentícia, médica, etc. Bactérias dos gêneros *Acetobacter* e *Streptococcus* produzem dextranas, sendo *Leuconostoc mesenteroides* a principal espécie utilizada para a produção industrial de dextrana sacarase que converte a sacarose em dextrana (RODRIGUES, 2003).

No kefir, as dextranas são produzidas com os esforços simbióticos compartilhados entre as BALs e os fermentos da matriz (GULITZ, 2011). OLIVEIRA (2005) acrescenta que os grãos de kefir e seu sobrenadante são compostos de microrganismos, polissacarídeos, moléculas aminadas, vitaminas, álcool e substâncias voláteis.

Os grãos de kefir de água têm textura e cor características, diferentes dos grãos do kefir de leite tradicional. São mais transparentes, frágeis e rompem-se mais facilmente. Além disso, existem relatos de que o kefir de água pode ser ingerido em maior quantidade em comparação ao de leite e a sua absorção para a corrente sanguínea é mais rápida.

A distribuição dos microrganismos no kefir de água e de leite são diferentes. Enquanto o kefir de leite tem elevada distribuição de células bacterianas tanto na parte interna quanto externa do grão comparável à população de fungos (CHEIRSILP et al. 2003; MAGALHÃES et al., 2011).. Magalhães et al. (2010) observaram através da microscopia eletrônica de varredura, que as células fúngicas dominavam os grãos de kefir de água, enquanto as bactérias não foram visualizadas.

Tem sido considerado que a atividade fermentativa do kefir de água é diferente do kefir de leite, ocorrendo maior produção de CO₂ e álcool no primeiro (dependendo da concentração de açúcar e do tempo de fermentação). (disponível em www.vegetariano.org).

O processo fermentativo do kefir de água durante vinte e quatro horas foi caracterizado por Magalhães e colaboradores (2010). Observou-se que houve redução na concentração de sacarose e aumento de açúcares redutores, tais como glicose e frutose. A produção de ácido láctico decresceu no período, em contraste com a produção de ácido acético aumentou e o pH da bebida ficou mais ácido. A concentração de etanol aumentou e atingiu o máximo às 12 h. Houve aumento da quantidade de proteínas e massa dos grãos. A

Figura 1 mostra um esquema simplificado das reações bioquímicas e de microrganismos que participam do processo de fermentação da sacarose até à obtenção do kefir de água.

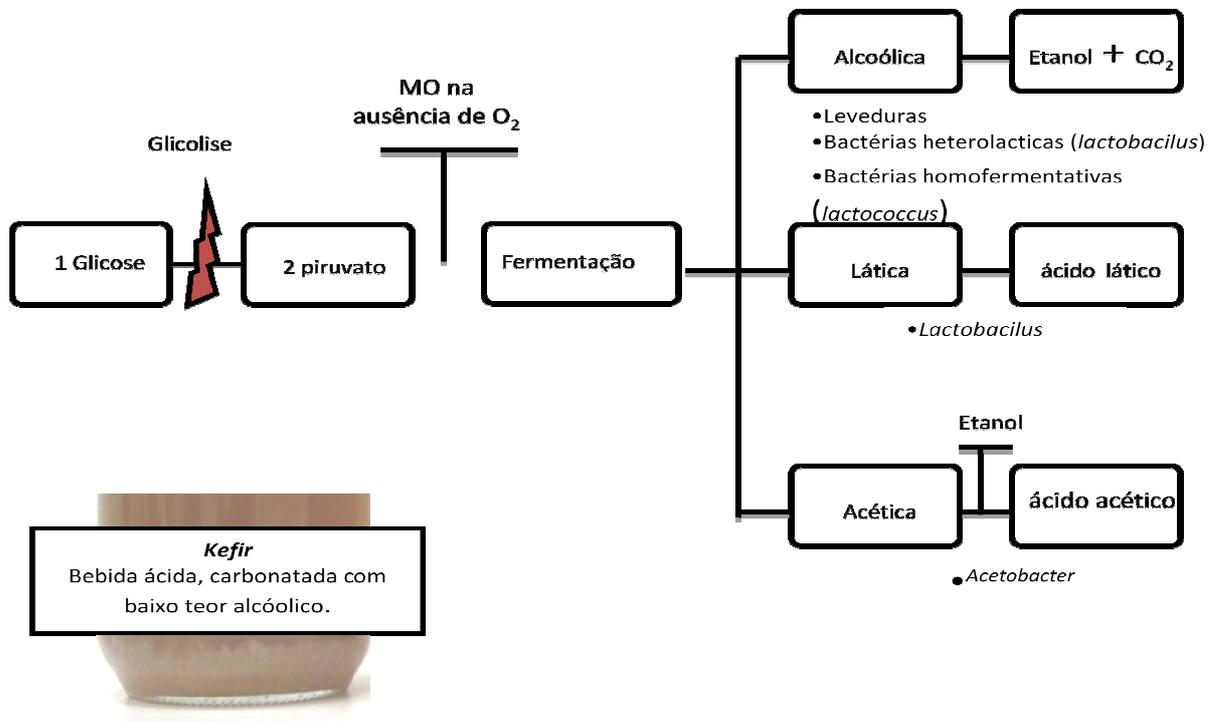


Figura 1. Reações bioquímicas e microrganismos envolvido no processo de fermentação da sacarose para obtenção do kefir de água.

4.7 Kefir na agricultura

Desde o início dos anos 80, passa a haver um maior questionamento com ênfase às contradições da agricultura convencional. Assim as publicações direcionadas para os produtores resgatam e divulgam produtos e práticas conservacionistas que trazem benefícios para a agricultura, e entre estes, o bokashi, dando ênfase à agricultura orgânica.

Dada à simplicidade de produção, o kefir pode ser preparado domesticamente dando ao agricultor independência na preparação do bokashi, que do contrário exigiria a aquisição de produtos similares no mercado. Deve-se considerar que além do custo, nem sempre estes produtos estão disponíveis. A produção de kefir como um substrato na unidade de produção cria motivação para outros usos, tais como, aceleradores de compostagem, controle biológico, produtos probióticos para animais domésticos e de produção e mesmo para consumo humano. Os substratos têm sua utilização mundial incrementada anualmente por proporcionarem melhores condições físicas, químicas e biológicas ao desenvolvimento das plantas (KÄMPF, 2001; BATAGLIA e ABREU, 2001; PENTEADO, 2006).

Mesquini (2011) avaliou o controle e o progresso temporal da ferrugem asiática da soja, causada por *Phakopsora pachyrhizi*, sob manejo com tratamentos alternativos. Dentre estes, a biomassa cítrica e os grãos de kefir apresentaram os maiores índices de controle e menores taxas de progresso da doença, superando os tratamentos com extrato bruto e óleo essencial de *Eucalyptus citriodora*.

Em outro trabalho Mesquini (2007) verificou que o efeito do extrato bruto de grãos de kefir (20%), autoclavado, e não autoclavado interferiram na germinação de uredíniosporos de *Phakopsora pachyrhizi*. Verificando também que o extrato bruto de grãos de kefir induziu a síntese de fitoalexinas em cotilédones de soja em todos os tempos testados, porém quando submetidos a autoclavagem, houve aumento na produção de gliceolina, mostrando que os grãos de kefir apresenta alterações quando submetidos ao tratamento térmico o que altera a produção das fitoalexinas.

Já Machado (2011), evidenciou a possibilidade de utilização do kefir como biofertilizante na produção de mudas de cedro (*Cedrela fissilis* Vell), na dose e de 25 ml/ dm³.

Oliveira (2005) adicionou diferentes formas de kefir (suspensão, grãos e liofilizado) na ração de coelhos. O kefir no estado liofilizado foi o que apresentou maior densidade populacional em comparação as outras amostras, provavelmente devido ao maior teor de bactérias no material liofilizado.

Outros usos têm sido apontados, como relatado no estudo de Huseini (2011) que avaliou o processo de cicatrização em ratos utilizando o kefir gel. O tratamento mostrou-se eficaz após queimadura grave em comparação com o tratamento convencional com sulfadiazina de prata.

4.8 Técnicas Moleculares

A partir da década de 70, tecnologias foram desenvolvidas permitindo o isolamento e a purificação de genes específicos, devido a deste avanço tecnológico, foi possível que no presente estudo fossem utilizadas técnicas moleculares para identificação dos tipos morfoculturais, através do PCR (Polymerase Chain Reaction), que envolve a síntese enzimática in vitro de milhões de cópias de um segmento de DNA na presença da enzima DNA polimerase, consistindo em uma polimerização em cadeia, na qual se obtém o enriquecimento de um fragmento específico de DNA por meio de sua duplicação em modo exponencial. Um gene presente no genoma como cópia única pode ser amplificado a partir de DNA genômico complexo, podendo assim ser posteriormente visualiza como uma banda discreta, constituída por moléculas de DNA, por meio de eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo.

O princípio da PCR envolve em três etapas básicas, que são repetidas várias vezes, em ciclo:

- 1- Desnaturação térmica do DNA molde, através da elevação de temperatura para 92 a 95°C
- 2- Anelamento de oligonucleotídeos sintéticos, que funcionam como iniciadores da reação de polimerização, a cada uma das fitas do DNA molde, a temperatura é rapidamente reduzida para 35 a 60 °C, dependendo do tamanho e sequencia do “primer” utilizado. Estes primers são sintetizados artificialmente de maneira que suas sequências de nucleotídeos sejam complementares às sequências específicas que flanqueiam a região alvo.

- 3- Polimerização das novas fitas de DNA a partir de cada um dos iniciadores, utilizando cada um dos quatro dNTP (substrato de reação de síntese) como substrato da reação de polimerização. Nesta etapa a temperatura é elevada a 72°C para que a enzima DNA polimerase realize a extensão a partir de cada terminal 3' dos primers. Esta extensão envolve a adição de nucleotídeos como molde a sequência alvo, assim uma cópia deste sequência é feita no processo.

O modelo atual da taxonomia de bactérias reside no entendimento das relações evolutivas baseadas, quase que exclusivamente, na filogenia de seqüências de RNAr 16S (Gupta & Griffiths, 2002).

O RNA 16s é uma macromolécul amplamente utilizado em estudos de filogenia e taxonomia Bacterial. Sua aplicação como temporizador molecular foi proposto por Carl Woese (University of Illinois) no início da 1970, pois possui características relevantes para utilização como uma ferramenta filogenética e taxonômica.

O método molecular de identificação de bactérias pelo 16S rDNA sequenciamento inclui três etapas:

- 1- Amplificação do gene a partir da amostra adequada; alcançado, pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Substrato é normalmente usada como DNA purificado a partir de uma cultura pura do agente patógeno
- 2- a determinação da sequência de nucleótidos do fragmento amplificado, Nesta fase são realizadas as reações de sequenciamento e análise dos produtos por electroforese.
- 3- análise da sequência comparação da sequência 16S r DNA depositada nos bancos de dados., cujo acesso é livre através da internet. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), permitino o sequenciamento comparativo de genes homólogos entre linhagens microbianas, sendo este o procedimento padrão em sistemática microbiana.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Obtenção de grãos de kefir de água

Foram utilizados grãos de kefir lavados oriundo de manipulação familiar. Os grãos de kefir foram preparados em um recipiente de vidro (500 ml), cilíndrico (13 cm x 7,5 cm). Para a inoculação dos grãos de kefir de água foi utilizada 350 ml de água destilada e autoclavada com três diferentes concentrações de açúcar mascavo (substrato) Arma Zen[®] (5%, 10% e 20% mV^{-1}), acrescentando a esta solução 35 g de grão de kefir (Figura 2). Procedeu-se a incubação das culturas na temperatura de 28°C durante 1, 3 e 7 dias.



Figura 2. Recipientes de vidro cilíndrico contendo 350ml de água autoclavada, 35 de grãos de kefir com três diferentes concentrações de açúcar mascavo

5.2 Determinação da massa fresca dos grãos e do pH da fase líquida

Após a retirada dos recipientes da incubadora BOD, cada qual no seu período de incubação, os grãos de kefir sofreram tamisagem, em uma peneira plástica e foram lavados com 1 litro de água destilada. Em seguida, pesados em uma balança Mettler Toledo PL 3002[®], diretamente da peneira com auxílio de uma barca de plástico, para minimizar o efeito da temperatura e umidade na pesagem dos grãos, a fim de se verificar a influencia da concentração de grãos/substrato no peso dos grãos. Determinou-se também o pH da fase líquida, utilizando um pHmetro. Foram realizadas três repetições para cada tratamento. As diferenças entre as médias foram avaliadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

5.3 Determinação de proteína total na fase líquida e nos grãos

O teor de proteínas totais foi determinado de acordo com o método de Lowry et al (1959) (anexo1), utilizando como padrão albumina de soro bovino (BSA). As proteínas totais foram dosadas na fase líquida e sólida. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro ($\lambda=750$ nm). O método de Lowry para a determinação da concentração da proteína é usado extensamente, porém pode ser sujeito à interferência por muitas substâncias e produtos

químicos como, por exemplo: citrato, cloreto de cézio, tampões, EDTA, barbital, TRIS e fenol.

O método de Lowry foi descrito primeiramente por Lowry et al. (1951), sendo esta a metodologia mais utilizada para a determinação de proteínas. O princípio do método baseia-se numa mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico, (reagente Folin-Ciocalteu), que sofre uma redução quando reage com proteínas, na presença do catalisador cobre (II), e reduz um composto com absorção máxima em 750 nm. Apesar do método de Lowry apresentar uma grande sensibilidade para proteínas, o mesmo possui algumas desvantagens como estar sujeito a diversos interferentes. Na literatura são encontradas muitas substâncias interferentes e estas normalmente causam aumento na absorbância do branco, diminuição da absorvidade específica ou formação de algum tipo de precipitado. Para a eliminação da maioria dos interferentes deste método, sugere-se a precipitação das proteínas utilizando-se: ácido tricloroacético e co-precipitantes misturas de metanol-clorofórmio-água ou hexano-isopropanol. Os interferentes mais comuns são: Compostos fenólicos, Lipídios, Detergentes, Ácido úrico, Guanina e xantina, Sulfato de amônio, Melanina, Bilirrubina, 4-metilumbeliferona, Mercaptanas e cisteína, Tampão tris-HCl, Açúcares e RNA.

5.4 Quantificação e isolamento de bactérias e leveduras totais na fase líquida

Alíquotas de 50 µl das diluições 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} do sobrenadante foram espalhadas na superfície de placas de Petri contendo os meios de cultivo DYGS (anexo2) e MRS (anexo3). A escolha dos meios foi determinada a partir de estudos anteriores, onde na sua maioria foi encontradas bactérias do ácido láctico, por este motivo a utilização do meio MRS, que é utilizado para isolamento de BALs, caracterizando uma rica base nutricional, porém não muito seletivo. Por outro lado a pouca seletividade do meio MRS, o desconhecimento da microbiota específica do kefir e sua variedade influenciada por diversos fatores fez com que optássemos também pelo meio DYGS, que é um meio rico em nutrientes e vitaminas, utilizado para o crescimento de uma ampla variedade de microrganismos

Foram feitas três repetições. As placas de Petri foram acondicionadas na incubadora BOD a 28°C por quatro dias. Após esse período foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônias. O isolamento foi realizado no meio de origem DYGS ou MRS e os isolados com características morfo culturais distintas foram purificados e armazenados em microtubos contendo o meio de origem com 50 % de glicerol ($v v^{-1}$) a -20 °C. .

5.5 Caracterização morfo cultural

Os isolados foram caracterizados de acordo com os seguintes parâmetros: tamanho (diâmetro em mm), forma (circular ou irregular), bordo (liso ou recortado), aspecto (homogênea ou heterogênea) e cor. Devido à semelhança entre as colônias foi feito um esfregaço em lâmina para diferenciação entre bactérias e leveduras através de microscópio óptico utilizando as objetivas de 40 x e de 100 x.

5.6 Extração de DNA e Amplificação do gene 16S rRNA e *Internal Transcribed Spacer Region* (ITS)

Para a extração de DNA dos isolados, foi seguido o protocolo descrito por Schwieger & Tebbe (1998) modificado por Xavier et al. (2004). Uma suspensão de células foi centrifugada (9.000 rpm, 10 min) e o precipitado foi resuspendido em 0,6 ml de tampão TES (0,05 M NaCl; 0,01 M EDTA; 0,05 M Tris HCL pH 8,0; 1% SDS) e agitado em vórtex. Em seguida, foram efetuadas 5 etapas de congelamento/descongelamento em nitrogênio líquido (5

min), agitação (180 rpm; 10 seg) e aquecimento (65 °C; 5 min). Foi adicionada à amostra Proteinase K (8,4 µL; 20 µg mL⁻¹), procedendo-se à incubação sob agitação (180 rpm; 65°C; 1h). Em seguida, foi acrescentado 0,6 ml (1 volume) de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e, novamente, uma centrifugação (5.000 rpm; 6 min). O sobrenadante foi transferido para novos tubos, adicionando-se 0,6 ml (1 volume) de clorofórmio-álcool isoamílico e repetindo-se a centrifugação nas condições anteriores. Uma alíquota de aproximadamente 0,5 ml do sobrenadante foi transferida para um novo tubo, adicionando-se 0,5 volume de isopropanol gelado. A amostra foi incubada (60 min; -20 °C), centrifugada (13.000 rpm; 20 min) e após remoção do sobrenadante, o precipitado foi centrifugado a vácuo para a secagem e ressuspendido em 50 µL de tampão TE (10 mM Tris; 1 mM NA-EDTA; pH 8,0).

O gene 16S RNAr dos isolados bacterianos foi amplificado usando os iniciadores 27f (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') e 1492f (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') (AUSUBEL et al., 1992) A reação de PCR foi realizada de acordo com Wang *et al.* (2006). Para o preparo do PCR-mix (volume final de 25 µl), uma alíquota de 1 µl de suspensão de colônia em água destilada e esterilizada. foi adicionada em µl: 15,73 de água, 5 de tampão, 0,9 de MgCl₂, 0,6 de dNTP, 0,5 dos iniciadores NS3 e YM951r e 0,2 de Taq polimerase (500 U). O controle negativo consistiu da adição de mix 1µl de água destilada e esterilizada.

Para identificação das leveduras foram amplificadas as regiões ITS1 utilizando os iniciadores NS3 (3'CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGCAAGTCTGGTGCC AGCAGCC 5') e YM951r (3'TTGGCAAATG CTTTCGC 5') de acordo com Naumova *et al.* (2005). A reação de PCR foi realizada com um volume final de 50 µl. Para o preparo do PCR-mix a uma alíquota de 1 µl de suspensão de colônia em água destilada e esterilizada. foi adicionada em µl: 31,5 de água, 10 de tampão, 2,5 de MgCl₂, 1,3 dNTP, 1 µl dos iniciadores NS3 e YM951r e 0,2 de Taq polimerase (500 U). O controle negativo consistiu da adição de mix 1µl de água destilada e esterilizada.

Ambos os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose (0,8% mv⁻¹) com voltagem de 60-65 V no tampão TAE (1x) por 1 h e os géis foram corados em brometo de etídio por 5 minutos, descorados em água por 20 minutos e posteriormente visualizados no fotodocumentador Kodac.

5.7 Sequenciamento do gene 16S RNAr e ITS

As reações de sequenciamento foram realizadas com o Kit BigDye terminator 3.1 num sequenciador automático ABI 3730, (Applied Biosystems, USA). Os contigs foram montados com auxílio do programa DNA Baser Sequence Assembler. Foi feito sequenciamento a partir do produto do PCR e as seqüências de cerca de 1200 bp foram então comparadas com o banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>).

5.8 Produção experimental do bokashi

Em um estudo preliminar, foram produzidos bokashi na Fazendinha Agroecologica da EMBRAPA com várias concentrações de kefir de 1 e 7 dias, preparados domesticamente (fase líquida e sólida); inoculante comercial “EM[®]” seguindo-se as recomendações comerciais e uma outra amostra sem adição de nenhum microrganismo (somente água), conforme demonstrado no anexo3. Os tratamentos foram mantidos em casa de vegetação sem controle de temperatura e umidade.

A mistura homogeneizada foi armazenada em sacos plásticos pretos e lacrada, devidamente identificada de acordo com sua composição. Os tratamentos foram mantidos em casa de vegetação sem controle de temperatura e umidade.

O bokashi foi aberto após 40 dias, e analisado por seis alunos do Programa de pós graduação em Agricultura Orgânica, realizando assim uma análise sensorial do produto.

Segundo o projecto de Norma Portuguesa 4263 (1994) podemos definir Análise Sensorial como o “exame das características organolépticas de um produto pelos órgãos dos sentidos”. Foi estabelecido um perfil sensorial de livre escolha, onde os participante, adquiriam uma amostra referente a 25-30 gramas para analisar o parâmetro de textura, odor e cor. O objetivo da análise sensorial era observar os diferentes preparados de bokashi e assim denominar o bokashi com características mais acentuadas como: textura firme, odor cítrico e com coloração matéria prima inicial, sem sofrer qualquer alteração na cor.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Influência da concentração de açúcar e do tempo de incubação no preparo do kefir de água

6.1.1 Massa fresca dos grãos e pH da fase líquida

Foi observado um aumento da massa de grãos ao longo do período de incubação na presença de 10% e 20% de açúcar, enquanto que a 5% não houve diferença significativa (Tabela 2). A maior massa de grãos foi obtida com a concentração de 20% de açúcar após sete dias de crescimento. O pH decresceu ao longo do período de incubação independente da concentração de açúcar. No início da incubação (tempo zero) o pH foi de 5,5, o que indica que o período mais acentuado de acidificação ocorreu nas primeiras 24 horas. Os dados sugerem uma relação indireta entre a taxa de redução do pH e concentração de açúcar. Ao final de 7 dias de incubação o pH de todos os tratamentos estavam próximos a 3,3, não havendo diferença significativa entre as concentrações de 5 e 10% de açúcar.

Tabela 2. Efeito da concentração de açúcar e período de incubação sobre a massa de grãos e pH da fase líquida de kefir de água.

Tempo de crescimento (dias)	Massa de grãos (g) ¹			pH ¹		
	1	3	7	1	3	7
Açúcar (%)						
5	35,14 Aa	35,99 Ab	36,47 Ac	3,96 Ac	3,39 Bc	3,26 Cb
10	36,01 Ba	38,63 ABb	39,81 Ab	4,27 Ab	3,59 Bb	3,30 Cb
20	37,19 Ca	45,82 Ba	52,73 Aa	4,72 Aa	3,76 Ba	3,49 Ca

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os grãos de kefir são formados por microrganismos, principalmente por leveduras, dextrana (polissacarídeo) e água (LOPITZ-OTSOA, 2006). O aumento da massa de grãos pode estar relacionado à maior produção de dextrana a partir da disponibilidade de sacarose associada à maior retenção de água nos grãos.

A dextrana é solúvel em água e no kefir se precipita devido à produção de álcool por leveduras num processo análogo ao industrial onde a precipitação alcoólica que é usada para remover a dextrana de caldo de fermentação (RODRIGUES, 2003). A enzima dextranase produzida por bactérias dos gêneros *Leuconostoc*, *Acetobacter* e *Streptococcus* é induzida por sacarose que influencia na quantidade e na massa molar da dextrana produzida (RODRIGUES, 2003).

Além disso, a capacidade de retenção de água própria da dextrana durante o processo fermentativo pode também ter contribuído para o aumento da biomassa fresca de grãos de

kefir. Garrote et al. (2001) analisaram grãos de kefir de leite proveniente de quatro locais na Argentina e encontraram cerca de 80% de água, 10% de polissacarídeos e 5% de proteínas.

Franco e Landgraf (1996) classificam o kefir como um alimento muito ácido que inibe o desenvolvimento de microrganismos patogênicos. A acidificação da fase líquida do kefir é um processo comumente associado à obtenção dessa bebida caracterizada pela fermentação da sacarose que é convertida em ácidos por bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Acetobacter*.

Magalhães et al. (2010) caracterizaram o processo de fermentação do kefir de água com 5% de sacarose após 0, 6, 12, 18 e 24 horas de crescimento. Os autores observaram a maior produção de ácido láctico nas primeiras 12 h. Nesse estudo a redução de pH observada nas primeiras 24 horas pode estar associada a produção de ácidos, que após esse período foi decrescendo, enquanto a fermentação alcoólica e acética se mantiveram elevadas simultaneamente, a concentração de sacarose diminuía.

No presente estudo, a maior acidez do sobrenadante ao final de 7 dias de incubação foi relacionada à menor concentração de açúcar disponível, o que pode estar associado à maior taxa de metabolização desse substrato nas primeiras 24 horas, considerando-se que a quantidade de inóculo (35 g) foi a mesma para todos os tratamentos (**Figura 3**). Nesse caso, a razão massa de inóculo sobre concentração de açúcar a 5% de sacarose é igual a 2 (35g de inóculo; 17,5 g de açúcar), a 10% de sacarose, igual a 1 (35 g de inóculo; 35 g de açúcar) e a 20% de sacarose, igual a 0,5 (35 g de inóculo; 70 g de açúcar).

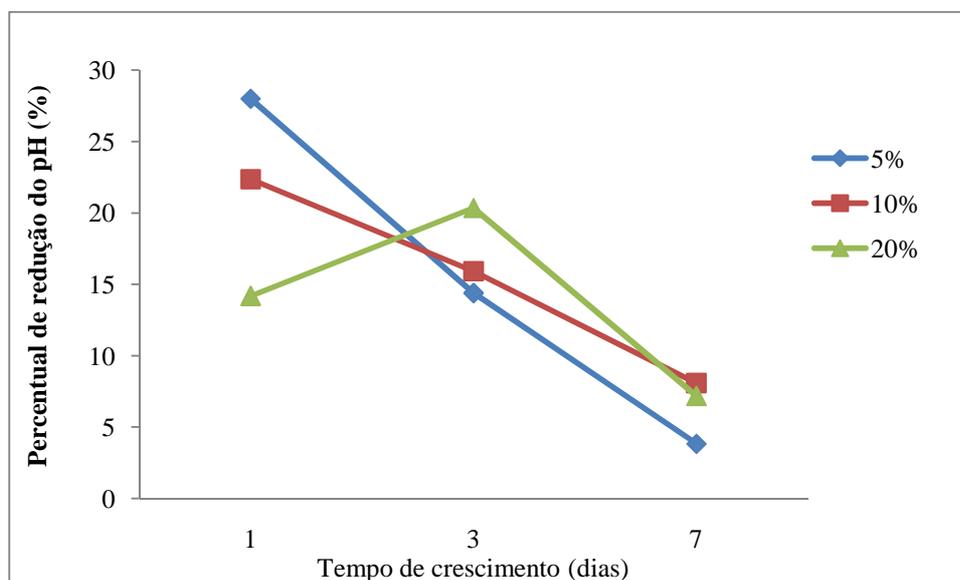


Figura 3. Percentual de redução do pH da fase líquida do kefir de água com diferentes concentrações de açúcar mascavo no decorrer do tempo de crescimento.

6.1.2 – Concentração de proteína na fase líquida e nos grãos de kefir

Tabela 3. Dosagem de proteína total da fase líquida e de grãos de kefir de água com três concentrações de açúcar em três tempos de incubação.

Tempo de crescimento (dias)	Fase líquida			Grãos		
	1	3	7	1	3	7
Açúcar (%)	-----mg/ ml-----			-----mg/ mg-----		
5	0.0119 Ca	0.0114 Ba	0.0041 Ba	0.1264 Bb	0.1512 Bb	0.2851 Aa
10	0.0328 Ba	0.0255 Ba	0.0109 Bb	0.2082 Bb	0.3061 Aa	0.2060 Ab
20	0.0584 Aa	0.0448 Ab	0.0321 Ac	0.3224 Aab	0.3492 Aa	0.2524 Ab

A concentração de proteínas na fase líquida e nos grãos, exceto aos sete dias de incubação, é proporcional à concentração de açúcar disponível o que deve estar relacionado a um aumento da biomassa microbiana (**Tabela 3**). Porém, enquanto na fase líquida a maior concentração de proteína é observada após 24 horas de incubação, nos grãos os valores máximos são observados após 3 dias para as concentrações de 10 e 20% de açúcar e após sete dias de incubação para a concentração de 5%.

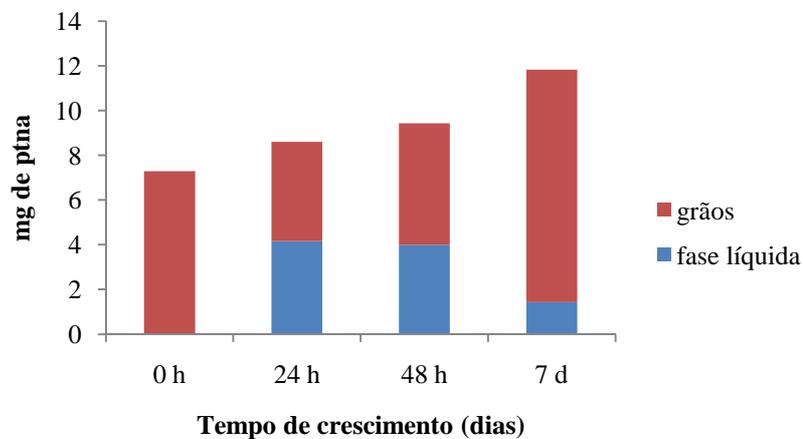
A Figura 4 apresenta os dados de proteína total contabilizada a partir das duas frações, fase líquida e grãos. Os valores de proteína obtidos nas primeiras 24 horas foram os mais altos observados e se mantém até às 72 horas após o início da incubação, indicando que a atividade de síntese proteica ocorreu logo no início da incubação simultaneamente à redução dos valores de pH decorrente da quebra do açúcar disponível, possivelmente devido à produção de ácidos pirúvico e láctico pela glicólise. Aos sete dias, no entanto, há uma redução desses valores principalmente para as concentrações de 10 e 20% de açúcar. Por outro lado, quando se observa a distribuição da proteína nas duas frações, é possível concluir que a quantidade de proteína presente na fração líquida diminui ao longo do período de incubação, enquanto aumenta nos grãos, sugerindo que a proteína produzida na fração líquida é gradativamente imobilizada nos grãos.

Na produção de kefir tradicional utilizando o leite, o produto é considerado pronto para ser consumido após 18 a 24 h de crescimento (Lopitz-Otsoa, 2006). A redução observada aos sete dias na fração proteica pode ser uma consequência de se ter ultrapassado esse tempo ótimo indicado para a obtenção do kefir. A redução da quantidade de proteína pode indicar que a mesma esteja sendo utilizada como uma fonte energética alternativa em substituição à sacarose. Conforme discutido por Lopitz-Otsoa (2006) as leveduras podem mudar seu metabolismo de acordo com a concentração de açúcar disponível, apresentando atividade proteolítica ou lipolítica o que garante a obtenção de aminoácidos livres e ácidos graxos que serão utilizados para o seu crescimento. Esses resultados sugerem que a obtenção de grãos de kefir ocorra dentro de um intervalo de tempo considerado ótimo, quando se observa multiplicação sucessiva e manutenção da viabilidade do inóculo. Apesar de não existir informação na literatura, é possível que a extensão do período de incubação possa comprometer a qualidade do kefir de água. Nas condições do presente estudo sob concentração de 5% de açúcar, talvez em função de um metabolismo mais lento, pode-se retirar o produto até o sétimo dia, ao passo que nas concentrações de 10% a 20%, o produto é

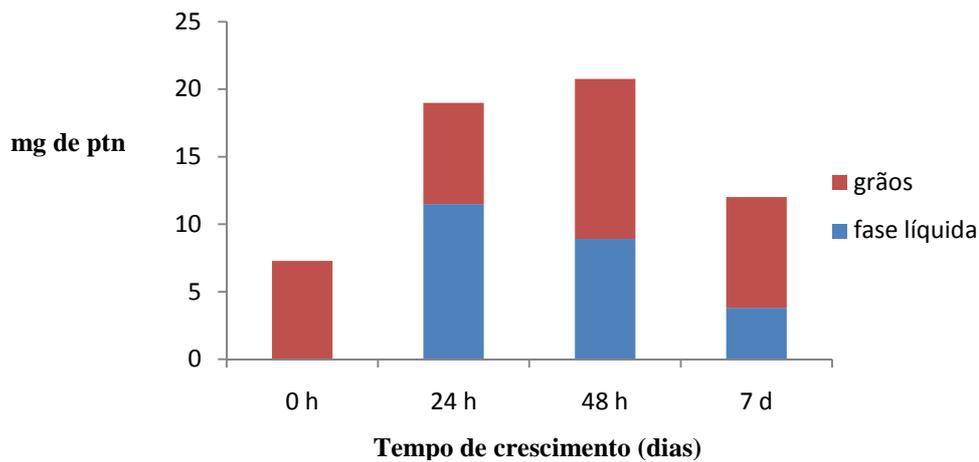
aceitável até o terceiro dia. Nessas concentrações, após sete dias, a quantidade de proteína é reduzida o que deve prejudicar a qualidade do inóculo.

A redução de proteína nos grãos também pode estar associada à diminuição da biomassa microbiana nos grãos e das proteínas que em conjunto com polissacarídeos formam a matriz dos grãos. Pode estar ocorrendo morte de células, redução no crescimento e degradação das proteínas.

Incubação com 5% de açúcar mascavo



Incubação com 10% de açúcar mascavo



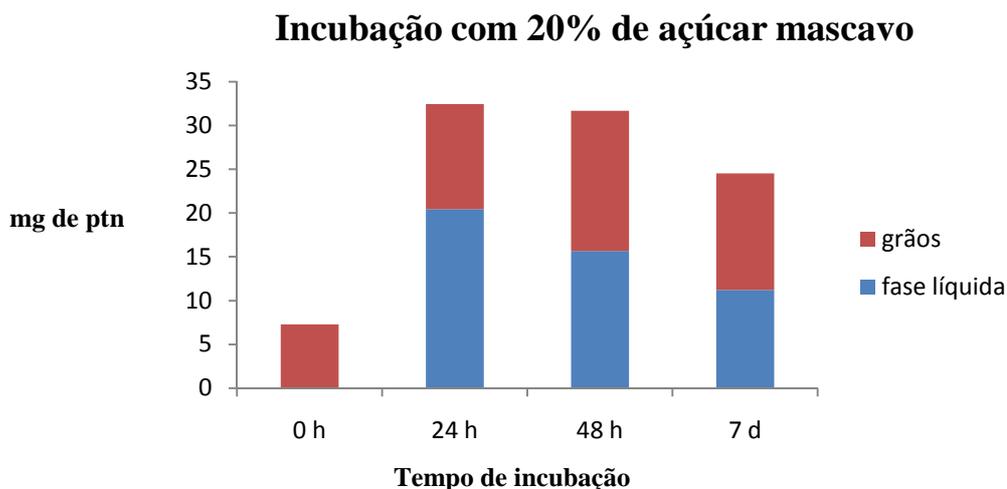


Figura 4. Teor de proteína total no sobrenadante e nos grãos de kefir de água com três concentrações de açúcar, no primeiro, terceiro e sétimo dias de crescimento a 28 °C.

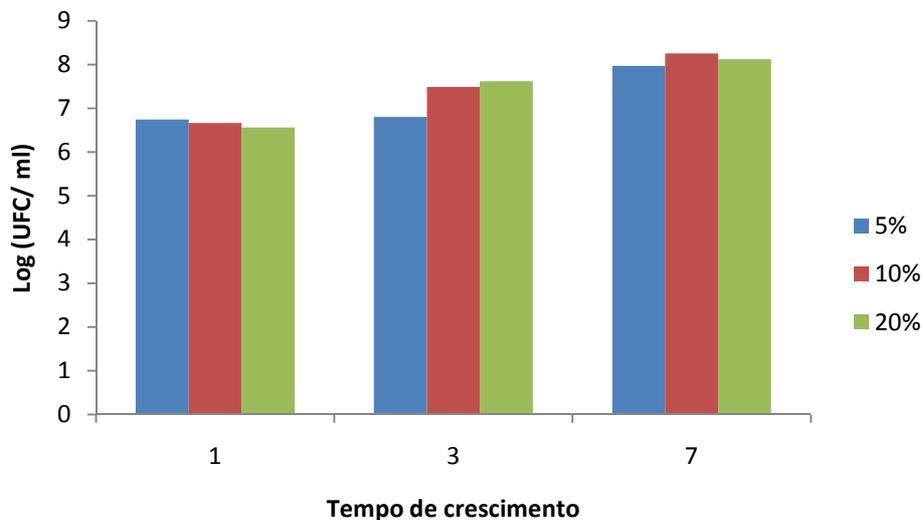
6.2 Quantificação de bactérias e leveduras totais

Dentro do âmbito da agricultura orgânica, além da possibilidade de uso como probiótico para a criação animal, outra aplicação do kefir seria na aceleração do processo de compostagem e como tal, tem sido recomendado para a preparação de bokashi. O bokashi é preparado a partir da mistura complexa dos microrganismos eficazes presentes na fase líquida do kefir. Visando determinar quais grupos microbianos são prevalentes na fase líquida e qual a relevância para a preparação de substratos foi estudada a sua composição microbiológica a partir do plaqueamento em dois meios de cultura: MRS e DYGS.

O meio MRS é utilizado para isolamento de BALs (bactérias ácido lácticas) do kefir em vários estudos realizados, anteriormente sendo recomendado para cultivo de *Lactobacillus*, pois contém fatores especiais de crescimento (polisorbato, acetato, magnésio e manganês) caracterizando uma rica base nutricional, porém não é considerado um meio seletivo (deMan J. et al Rogosa M. And Sharpe M., 1960)- <https://catalog.hardydiagnostics.com/>. Já o meio DYGS (dextrose yeast glucose sucrose) é um meio rico em nutrientes e vitaminas e utilizado para o crescimento de uma ampla variedade de microrganismos (DOBEREINER. et al, 1995).

Independente do meio de cultivo foi obtido um elevado número de microrganismos total a partir da fase líquida do kefir de água (de 10^5 a 10^8 UFC ml⁻¹). Quanto maior a concentração de açúcar, maior foi o número de colônias observado nos dois meios de cultura a partir do terceiro dia de incubação (**Figura 5**).

A. Meio MRS



B. Meio Dygs

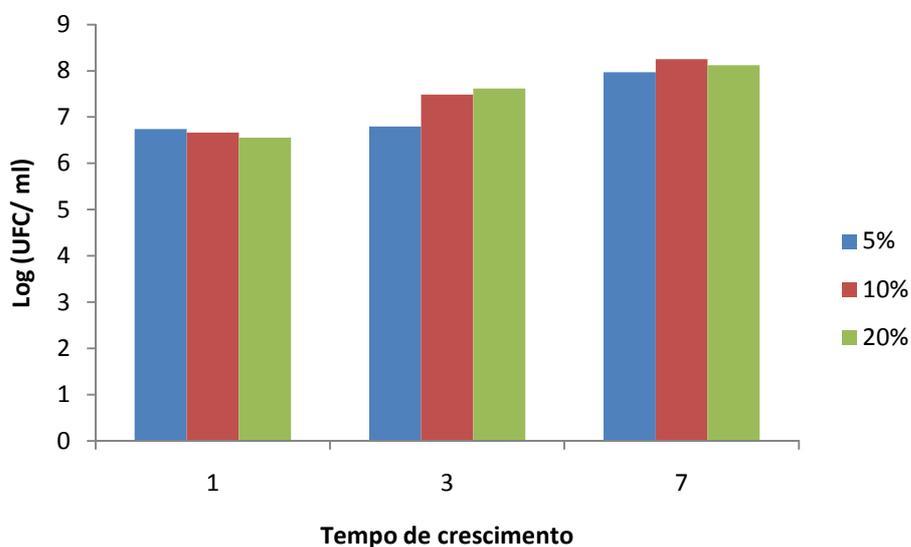


Figura 5. Número total de colônias microbianas obtidas a partir da fase líquida do kefir de água (A) Meio MRS; (B) Meio DYGS

O maior número de colônias obtido ao longo do período de incubação para todas as concentrações de açúcar não se relaciona diretamente à concentração de proteína da fase líquida, onde foi detectada uma queda de proteína a partir do terceiro dia de incubação. É comum que o plaqueamento em função da seletividade dos meios de cultura não reflita a abundância total da comunidade presente na fase líquida do kefir. O uso de meios de cultura para estimar a contagem de microrganismos totais apresenta uma série de limitações, a

começar com o baixo percentual de microrganismos que podem ser recuperados, geralmente menos de 1% da riqueza total (OLIVEIRA et al., 2006) http://www.multiciencia.rei.unicamp.br/artigos_07/a_08_7.pdf). Possivelmente, isso se deve à pressão de seleção exercida sobre a comunidade microbiana em função dos constituintes dos meios, relação O₂/ CO₂, pH, temperatura de incubação, dentre outros fatores. Por outro lado, a concentração de proteína é uma medida que está diretamente relacionada à biomassa total da amostra (CHEN et al, 2009).

Magalhães et al. (2010) enfatiza que a despeito das limitações conhecidas, os métodos dependentes de cultivo representam a única maneira válida de se isolar microrganismos, e por essa razão são ainda bastante utilizados na investigação da sucessão microbiana durante os processos de fermentação.

6.3 Isolamento, caracterização morfofocultural e sequenciamento do gene 16S e ITS dos microrganismos cultivados nos meios MRS e DYGS

Foi obtido um total de 25 isolados representativos de diferentes características morfofoculturais, sendo que desses, 11 foram isolados a partir do meio MRS e 14 do meio DYGS. Por meio de microscopia ótica, vinte isolados foram identificados como bactérias e cinco como leveduras. Entre as colônias identificadas como bactérias, predominaram as de formato circular, borda inteira, cor creme, sem elevação, aparência homogênea e opaca (Tabela 4). A maioria das colônias de leveduras apresentou de 3 a 5 mm de diâmetro e cor branca, exceto o isolado 28 que apresentou colônia de coloração creme.

A região do 16S rDNA dos isolados bacterianos e ITS1 dos isolados fúngicos foi sequenciada, o que permitiu a determinação dos respectivos gêneros. Optou-se por mostrar os resultados do sequenciamento ao nível de gênero por ser necessário o estudo de outras características para a definição de espécies de acordo com a moderna taxonomia que utiliza estudos polifásicos para identificação de procariotos (GILLIS et al., 2005). No anexo xx pode se visualizar uma tabela com as espécies que os isolados apresentaram homologia e o grau de similaridade.

Tabela 4. Caracterização morfo cultural e seqüenciamento de isolados obtidos a partir da fase líquida do kefir de água em dois meios de cultura. 4 A. Meio MRS, 4 B. Meio Dygs.

4A. Meio MRS

Isolado	Sequenciamento	Tam	Forma	Borda	Cor	Elevação	Aparência	Transparência
13	<i>Acetobacter sp.</i>	2	circular	inteira	creme	convexa	homogênea	opaca
13.1	<i>Staphylococcus sp.</i>	1	circular	inteira	creme	plana	homogênea	opaca
34	<i>Staphylococcus sp.</i>	1	circular	inteira	branca	plana	homogênea	opaca
36	<i>Acetobacter sp.</i>	1	circular	inteira	creme	plana	homogênea	translúcida
41	<i>Acetobacter sp.</i>	2	circular	recortada	creme	plana	heterogênea	opaca
42	<i>Sacharomyces sp.</i>	5	circular	recortada	branca	convexa	homogênea	opaca
42.1	<i>Sacharomyces sp.</i>	3	circular	recortada	branca	convexa	homogênea	opaca
44	<i>Staphylococcus sp.</i>	1	circular	recortada	branca	Plana	heterogênea	translúcida
45	<i>Acetobacter sp.</i>	3	circular	inteira	creme	plana	homogênea	translúcida
46	<i>Acetobacter sp.</i>	2	circular	inteira	creme	plana	homogênea	translúcida
48	<i>Sacharomyces sp.</i>	3	circular	inteira	branca	convexa	homogênea	opaca

4B. Meio Dygs

Isolado	sequenciamento	Tam	Forma	Borda	Cor	Elevação	Aparência	Transparência
12	<i>Acetobacter sp.</i>	3	circular	inteira	creme	plana	homogênea	opaca
19	<i>Burkholderia sp.</i>	3	circular	inteira	creme	convexa	heterogênea	opaca
19,1	<i>Burkholderia sp.</i>	2	circular	inteira	creme	convexa	homogênea	opaca
26	<i>Burkholderia sp.</i>	4	circular	inteira	creme	plana	heterogênea	translúcida
21	<i>Methylobacterium sp.</i>	Punt.	circular	inteira	rosa	convexa	homogênea	opaca
27	<i>Microbacterium sp.</i>	3	circular	inteira	amarela	convexa	homogênea	translúcida
6	<i>Microbacterium sp.</i>	4	circular	inteira	amarela	convexa	heterogênea	translúcida
23	<i>Microbacterium sp.</i>	2	circular	inteira	creme	plana	homogênea	translúcida
24	<i>Mucilagibacter sp.</i>	1	circular	inteira	rosa	convexa	homogênea	translúcida
52	<i>Pseudomonas sp.</i>	5	circular	recortada	amarela	plana	heterogênea	opaca
28	<i>Sacharomyces sp.</i>	5	circular	recortada	creme	plana	homogênea	opaca
29	<i>Sacharomyces sp.</i>	3	circular	inteira	branca	plana	heterogênea	opaca
30	<i>Staphylococcus sp.</i>	4	circular	inteira	branca	plana	homogênea	opaca
32	<i>Stenotrophomonas sp.</i>	4	circular	recortada	creme	plana	heterogênea	translúcida

Foram encontrados um total de 17 isolados identificados como bactérias pertencentes aos gêneros *Acetobacter* (6), *Burkholderia* (3), *Methylobacterium* (1), *Mucilagibacter* (1), *Pseudomonas* (1), *Staphylococcus* (4) e *Stenotrophomonas* (1). Três isolados foram caracterizados como actinomicetos, gênero *Microbacterium*, e cinco isolados como leveduras, gênero *Saccharomyces*. Em geral não é encontrada uma alta diversidade de microrganismos recuperados a partir do kefir de água. No estudo de Magalhães et al. (2010) foram obtidos a

partir da fase líquida do kefir de água dois grupos principais de microrganismos: BALs e leveduras.

Alguns microrganismos são frequentes no kefir: as BALs e o gênero *Acetobacter*, bem como, os gêneros de leveduras, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* e *Candida*, dentre estas sendo o mais comum o grupo *Saccharomyces* (OLIVEIRA, 2005).

No meio MRS prevaleceram isolados obtidos dos gêneros *Acetobacter*, *Saccharomyces* e *Staphylococcus*, enquanto maior riqueza de espécies foi recuperada em meio DYGS a partir do qual foram obtidos além dos citados, seis gêneros: *Burkholderia*, *Methylobacterium*, *Mucilaginibacter*, *Microbacterium*, *Pseudomonas* e *Stenotrophomonas*, possivelmente como consequência da maior seletividade do meio MRS.

Nenhum isolado obtido foi identificado como pertencente ao grupo das BALs, o que talvez tenha ocorrido em função da pressão de seleção das condições de cultivo utilizadas ou devido ao tempo da primeira coleta ter sido muito logo, podendo as BALs estarem presente num período anterior as 24 horas, como foi detectado por Magalhães (2011). Magalhães et al. (2010) também não conseguiram detectar a partir de cultivo em meio MRS algumas bactérias do ácido láctico que, no entanto, foram detectadas por DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) após 24 h de fermentação. No presente estudo foram ineditamente identificados grupos de bactérias que até então não haviam sido citados em outros estudos com kefir de água, tais como, *Burkholderia*, *Methylobacterium*, *Mucilaginibacter*, *Pseudomonas*, e *Stenotrophomonas*. Esses gêneros foram obtidos a partir do meio DYGS que não é rotineiramente utilizado para esse tipo de produto. É possível que esses grupos possam ser considerados eventuais, uma vez que não são de ocorrência frequente nas amostras analisadas, segundo trabalhos publicados por outros autores (BERGAMANN et al., 2010).

6.4 Composição da comunidade microbiana cultivada nos meios MRS e DYGS

Analisando os gêneros microbianos obtidos não se observa nenhuma tendência na distribuição dos mesmos quando se comparam as três preparações de kefir de água com diferentes concentrações de açúcar. Em relação ao tempo de incubação, no entanto, o número de gêneros recuperados em meio DYGS ao final do período de 7 dias é menos da metade daqueles observados nas amostragens dos primeiro e terceiro dias, quando foram encontrados apenas os seguintes gêneros *Microbacterium*, *Pseudomonas* e *Saccharomyces*. Uma vez que a recuperação no meio DYGS parece ser bastante eficiente quando se considera os nove gêneros encontrados, esse resultado pode indicar uma sucessão ao longo do período estabelecido. Quando se utilizou esse meio de cultivo, *Acetobacter* foi o único gênero não recuperado após o primeiro dia e *Staphylococcus* não foi recuperado após o terceiro. Como esses gêneros são comuns em praticamente todas as amostras cultivadas em meio MRS, a presença pontual no meio DYGS talvez indique uma baixa seletividade do meio em relação a esses gêneros bacterianos.

A Tabela 6 mostra a variabilidade dos tipos morfo Culturais cultivados nos meios MRS e DYGS. No meio MRS a presença de isolados identificados do gênero *Acetobacter* e *Staphylococcus* é consistente ao longo do período de observação independente da concentração de açúcar utilizada na preparação de kefir de água. Foram isolados cinco e três tipos morfo Culturais, posteriormente caracterizados como *Acetobacter* e *Staphylococcus*, respectivamente. As principais diferenças consistiram na borda da colônia, aparência e transparência do muco. As colônias caracterizadas como *Acetobacter* apresentaram cor creme

e diâmetro variando de 1 a 3 mm, enquanto as de *Staphylococcus* mostraram 1 mm de diâmetro e geralmente cor branca. Ainda foram obtidos três tipos morfoculturais caracterizados como leveduras do gênero *Saccharomyces sp.* que compreenderam colônias brancas variando de 3 a 5 mm de diâmetro. Ao contrário dos tipos morfoculturais bacterianos encontrados, as colônias de levedura não foram isoladas a partir das amostras de kefir de água produzido com 5% de açúcar. Essa observação não foi confirmada quando se utilizou o meio DYGS (vide a seguir) e, portanto, qualquer conclusão a respeito da presença de leveduras em função da concentração de açúcar deve ser vista com cautela e demanda novos ensaios visando a sua confirmação.

Quando se compara o número de gêneros recuperados no meio DYGS em relação ao MRS, nota-se que apesar da maior diversidade encontrada no primeiro, seis dos nove gêneros só apresentaram um tipo morfocultural o que pode estar associado a uma baixa representatividade nas amostras. Encontram-se nessa categoria os gêneros *Acetobacter sp.*, *Methylobacterium*, *Mucilaginibacter sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Staphylococcus sp.* e *Stenotrophomonas sp.*. Como visto anteriormente, colônias caracterizadas como *Acetobacter* e *Staphylococcus* foram bastante comuns no meio MRS enquanto as de *Pseudomonas* aparecerem em todas as amostras de kefir analisadas independente da concentração de açúcar e tempo de incubação. Esses dados sugerem que esses gêneros não sejam de ocorrência eventual nas amostras estudadas. Três tipos morfoculturais caracterizados como *Burkholderia* foram recuperados a partir do meio DYGS representados por colônias cremes com diâmetro variando de 2 a 4 mm. Além das bactérias propriamente ditas, foram recuperados três tipos morfoculturais nesse meio caracterizados como gênero *Microbacterium* pertencente a actinobacteria. Os tipos morfoculturais apresentaram colônias de cores variadas: amarela, creme e rosa variando de 2 a 4 mm, além de pequenas variações na elevação da colônia e aparência do muco. E por fim foram isolados dois tipos morfoculturais que foram posteriormente caracterizados como *Sacharomyces*, cujas colônias creme ou branca variaram de 3 a 5 mm.

Tabela 5. Variabilidade microbiana a partir dos tipos morfoculturais presentes em kefir com diferentes concentrações de açúcar ao longo dos 7 dias. Meio MRS (5A) e meio DYGS (5B)

Tabela 5A:

Gêneros Microbianos e número do isolado	Concentração de açúcar								
	5%			10%			20%		
	Tempo de crescimento (dias)								
	1	3	7	1	3	7	1	3	7
Bactéria	13	X			x			x	
	36	X	x			x			x
	41					x			
	45			x			x		x
	46			x			x		
<i>Staphylococcus</i>	13.1	X			x			x	
	34		x			x			x
	44	X	x	x	x	x	x		
Levedura <i>Saccharomyces</i>	42				x	x	x	x	x
	42.1				x	x	x	x	x
	48						x		x

Tabela 5B:

Gêneros Microbianos e número do isolado	Concentração de açúcar									
	5%			10%			20%			
	Tempo de crescimento (dias)									
	1	3	7	1	3	7	1	3	7	
Bactéria	<i>Acetobacter</i>	12	x							
		19						x		
	<i>Burkholderia</i>	19, 1						x		
		26		x			x			x
	<i>Methylobacterium</i>	21	x	x		x			x	
	<i>Mucilaginibacter</i>	24	x	x			x			
	<i>Pseudomonas</i>	52	x	x	x	x	x	x	x	x
	<i>Staphylococcus</i>	30					x			
	<i>Stenotrophomonas</i>	32	x			x	x			x
Actinobacteria		6		x	x			x		
	<i>Microbacterium</i>	23	x	x		x	x		x	x
		27	x	x		x	x			x
Levedura	<i>Saccharomyces</i>	28		x			x			x
		29	x	x	x	x	x	x	x	x

As figuras 6 e 8 mostram a abundância dos gêneros microbianos isolados nos meios MRS e DYGS, respectivamente, nas amostras da fase líquida de kefir de água preparado com diferentes concentrações de açúcar ao longo de uma semana de incubação.

No meio MRS (figura 6 e 7) há uma predominância de isolados caracterizados como pertencentes ao gênero *Acetobacter* ao longo de todo o período de incubação e independente da concentração de açúcar disponível. Essas bactérias conhecidas como bactérias do ácido acético realizam a oxidação de alcoóis, no caso mais comum do etanol, resultando na produção de ácido acético (OLIVEIRA, 2005). No kefir, a produção de ácido acético confere o odor característico à bebida quando se ultrapassa o tempo de incubação ideal. O grupo tolera bem a acidez suportando pHs abaixo de 4,0 encontrados nesse estudo. O processo de oxidação do etanol pelo gênero *Acetobacter* leva a formação de ácido acético, liberado durante o processo de incubação.

Acetobacter possui a enzima dextrana-sacarase que é induzida pela sacarose e que resulta na síntese do exopolissacarídeo dextrana, cujo monômetro é o alfa-D-glucacopiranosil (RODRIGUES, 2003). A dextrana produzida é solúvel em água e na presença de etanol e é precipitada formando os grãos do kefir. Esse gênero bacteriano influencia a quantidade de dextrana produzida, o que parece estar associado a uma etapa posterior à massa de grãos de kefir. Os gêneros *Leuconostoc* e *Streptococcus*, que não foram detectados pela metodologia empregada nesse estudo, também possuem a enzima dextrana-sacarase.

Lactobacillus, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, e *Streptococcus* são gêneros frequentemente encontrado no kefir, conjunto com *Acetobacter* (SCHNEENDORF & ANFITEATRO, 2004), porém não foram detectados nas amostras. Esses resultados corroboram que a composição microbiana do kefir é variável de acordo com a sua origem, devendo prevalecer, no entanto, as funções microbianas capazes de garantir as características do produto. Essa variabilidade pode ser decorrente de vários fatores, citando-se entre eles, temperatura, umidade, qualidade da água e do açúcar, qualidade do substrato e origem do inóculo.

No meio MRS (figura 6) foram ainda recuperados quatro isolados que apresentaram elevada similaridade com espécies do gênero *Staphylococcus*. Esse gênero foi comum principalmente a 5% de açúcar aos três dias de incubação. Os isolado 44 foi identificado como *Staphylococcus* possivelmente *S. warneri*. *Staphylococcus* são bactérias do filo Firmicutes. São Gram positivas, e podem ser associadas a doenças em seres humanos e animais. Porém nem todas as espécies são patogênicas, e a diversidade do grupo é dividida com base na reação de coagulase negativa e positiva, sendo consideradas patogênicas as cepas que coagulam o plasma sanguíneo.

Na Europa, as bactérias do ácido láctico e staphylococci coagulase-negativa são usadas em conjunto para a produção em pequena e larga escala de salsichas levemente fermentadas que adquirem sabores específicos de acordo com as culturas de bactérias usadas. Nesse processo Aymerich *et al.* (2003) cita uma série de estudos que identificam *S. xylosus* como a principal espécie, seguida de *S. carnosus*, *S. simulans*, *S. saprophyticus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri* e *S. equorum* que são usadas para estabilização da cor devido a capacidade de reduzir nitrato a nitrito, decomposição de peróxidos e atividade lipolítica e proteolítica (STAHNK, 1994). *Staphylococcus* também são produtoras da enzima lactato desidrogenase (também chamada desidrogenase lática) que catalisa a conversão de piruvato a lactato gerando poder redutor (NADH+) quando o oxigênio está ausente ou em baixa pressão (ISOBE, 2002).

Já no meio DYGS foram obtidos isolados identificados pelo sequenciamento do 16S rDNA como pertencentes ao grupo das pseudomonas (figura 8). Esses isolados foram recuperados em praticamente todas as amostras analisadas independente da quantidade de açúcar e tempo de incubação, mas foi mais comum após três dias do início da incubação no kefir produzido com 5% de açúcar, distribuição semelhante aos isolados de *Staphylococcus*.

O grupo *Pseudomonas* vive nos solos, de forma saprofítica, atuando na mineralização da matéria orgânica complexa em formas simples, disponíveis para as plantas (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002). Esta espécie possui isolados com alto potencial biotecnológico, sendo utilizada para a promoção de crescimento, controle biológico, indução de tolerância a estresses em plantas e biorremediação (SINGH *et al.*, 2011). *Pseudomonas* são descritas no Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, como bacilos retos ou ligeiramente curvos não esporulantes, aeróbias, móveis por meio de um ou mais flagelos polares e Gram-negativas. São generalistas, ou seja, usam um conjunto de fontes de carbono com eficiência similar e são encontradas em diferentes habitats. De acordo com McArthur (2006) estirpes de *P. putida* utilizam 77 compostos de diferentes fontes de carbono o que deve estar associado à presença em diversos ambientes. Algumas espécies do grupo fluorescente são descritas como promotoras do crescimento vegetal (DIAS, 2011).

Isolados caracterizados como *Burkholderia* e *Stenotrophomonas* spp. foram recuperados a partir do cultivo no meio DYGS (figura 8). Ambos os gêneros foram

inicialmente enquadrados como *Pseudomonas* até que na década de 1960 os estudos de Stanier e colaboradores dividiram as centenas de espécies do gênero em grupos e subgrupos de acordo com o perfil nutricional (STANIER et al., 1966).

As *Burkholderias* são generalistas, Gram-negativas apresentam metabolismo fermentativo anaeróbico, fixam nitrogênio atmosférico e utilizam o manitol. Membros da família Burkholderiaceae podem utilizar nitrato em anaerobiose. Produzem pigmentos fenazínicos solúveis em água, sideróforos dos tipos hidroxamatos e catecolatos, tais como, ornibactinas, pioquelim e cepabactina (PALLERONI, 2005). Semelhantes às *Pseudomonas* utilizam uma variedade ampla de fontes de carbono o que tem sido atribuído à ampla distribuição observada para o gênero. Nas amostras do presente estudo, isolados caracterizados como *Burkholderia* foram comuns aos três dias de incubação no kefir com 5% de açúcar ou após o primeiro dia de incubação no kefir a 20% de açúcar (figura 8).

Ao contrário das *Burkholderias* e *Pseudomonas*, espécies do gênero *Stenotrophomonas* família Xanthomonadaceae não são tão versáteis nutricionalmente, mas possuem capacidade para degradar hidrocarbonetos, herbicidas, tolueno, xilenos e querosene. São aeróbias estritas, produzem pigmentos amarelos solúveis em água e formam colônias com baixa fluorescência. Apesar de ter sido recuperada de duas amostras com um dia após o início da incubação e duas com três dias de incubação, em termos quantitativos, os isolados representativos do gênero só tiveram alguma expressão nas amostras de kefir com 5% de açúcar após o primeiro dia de cultivo (figura 8).

No meio DYGS foi obtido um isolado (n.21) que apresentou 100% de similaridade com *Methylobacterium radiora* que foi anteriormente classificado como *Pseudomonas radiora*. *Methylobacterium* spp. pertencem ao grupo das alfa-proteobactérias, ordem Rhizobiales, família Methylobacteriaceae. São Gram negativas e utilizam metano de forma facultativa. Formam colônias pequenas de 1 a 3 mm, rosa pálida, estritamente aeróbias, quimiorganotróficas e metilotróficas. Green & Bousfield (1983) propuseram uma emenda no gênero que ainda é válida, recharacterizando-as. Podem ser isolados do solo, nódulos, grãos de arroz, ambientes hospitalares, sedimentos de lagos e superfície de folhas (GREEN & BOUSFIELD; 1983). No presente estudo elas aparecem com alguma prevalência nas amostras de kefir com 5 e 20% de açúcar após três e um dia de incubação, respectivamente.

E por fim, o último gênero bacteriano isolado a partir do meio DYGS, *Mucilaginitacter* só teve mais evidência nas amostras coletadas após três dias de incubação de kefir a 5%. O gênero pertence ao filo *Bacteroidetes* da família Sphingobacteriaceae que agrupa bactérias Gram-Negativas estritamente aeróbias ou anaeróbias facultativas. São amplamente distribuídas, isoladas do solo, da água e especialmente eficientes em degradar vários biopolímeros com ênfase para polissacarídeos tais como “gellan gum”, laminarina, pectina, pullulan, amido, xilano além de produzem ácido a partir da frutose e galactose (Pankratov et al. 2007). Pankratov (2007) propôs o gênero para alocar duas estirpes anteriormente descritas como *Pedobacter* sp. que produziam grandes quantidades de exopolissacarídeos e foram isoladas de turfeiras ácidas de sphagnum em áreas pantanosas. Uma das estirpes descritas por Pankratov(2007) também era rosa e translúcida, tal qual o isolado 24 reportado no presente estudo.

Enquanto no meio MRS a maior parte dos isolados identificados pertenciam a um dos sete gêneros bacterianos descritos acima, no meio DYGS, os isolados bacterianos após o primeiro dia de incubação variaram de 30 a 50% do total de isolados decrescendo

substancialmente ao longo do período de incubação. Ao final desse período, eles representavam um total de cerca de 4% apenas.

Além das bactérias, foram recuperados no meio DYGS isolados caracterizados como pertencentes ao gênero *Microbacterium* do filo *Actinobacteria*, família *Microbacteriaceae* (figura 8 e 9). Esses isolados foram bastante comuns nas preparações de kefir independente da concentração de açúcar aumentando o percentual gradativamente ao longo do período chegando ao final com cerca de 75% dos isolados. Essa é a primeira vez que esse gênero é relatado para o kefir. *Actinobacteria* inclui aproximadamente 39 famílias e 130 gêneros, grande parte com crescimento micelial (VENTURA et al., 2007). São bactérias gram positivas que não esporulam e têm natureza termofílica capazes de resistir à pasteurização, suportando altas temperaturas. O filo *Actinobacteria* compreende espécies com atividade patogênica aos seres humanos e animais (*Corynebacterium* spp., *Mycobacterium* spp., *Nocardia* spp., e *Propionibacterium* spp. e *Tropheryma* spp., habitantes do solo (*Streptomyces* spp.), comensais em plantas (*Leifsonia* spp.), fixadores de nitrogênio atmosférico (*Frankia*) e habitantes do trato intestinal de mamíferos (*Bifidobacterium* spp.).

No presente estudo, três isolados mostraram 99% de similaridade com a espécie *Microbacterium dextranolyticum* que anteriormente era classificada como *Flavobacterium* sp., até que em 1993, Yokota propôs a reclassificação das estirpes tipo IF0 14592T e IF0 15204T (a dextran-cx-1,2-debranchin en- isolate) obtidas de corn “steep liquor” que têm capacidade de quebrar a dextrana. A espécie *M. dextranolyticum* compreende bactérias aeróbicas, que apresentam colônias de 2 a 4 mm de diâmetro, são circulares, tem bordas inteiras e são pouco convexas. Produzem pigmento amarelo. Os isolados caracterizados como *Microbacterium* encontrados nesse estudo (6, 23 e 27) mostraram características morfológicas similares às das estirpes reclassificadas por Yokota (1995) e sua presença possivelmente se deve à capacidade de utilizar dextrana para obter carbono e energia.

Dentro desse gênero, as espécies *M. lacticum* e *M. flavum* são muito próximas filogenéticas ao gênero *Lactobacillus*. Nashif & Nelson (1952) mostraram que essas espécies eram capazes de produzir ácidos no leite. Estudos realizados nas últimas décadas têm enfatizado cada vez mais a importância da microbiota presente no trato intestinal no processo digestivo de seres humanos e animais onde atuam em sinergismo (MIGUEL, 2010). Por exemplo, um dos principais grupos desses microrganismos é o dos *Lactobacillus* que enriquecem a capacidade metabólica devido à presença de genes para o metabolismo de lactose que não estão presentes no arcabouço genético dos seres humanos. *Lactobacillus* atuam fermentando polissacarídeos mais simples enquanto as bifidobactérias, actinobactérias, mostram capacidade de metabolizar compostos complexos (VENTURA et al., 2007). No kefir de água esses organismos podem utilizar como substrato para o processo fermentativo a dextrana que forma os grãos. Bifidobactérias formam simbioses com seres humanos e são também consideradas probióticas porque fermentam grande variedade de oligossacarídeos que não são digeridos pelo hospedeiro (VENTURA et al. 2007), e por essa razão o seu consumo tem sido estimulado.

E finalmente, foram obtidos isolados de leveduras caracterizados como *Saccharomyces cerevisiae*. A presença dessa espécie no kefir é responsável pelo cheiro típico de fermento e contribui para melhorar a qualidade sensorial da bebida, tornando-a mais refrescante e ligeiramente alcoólica (BARNETT et al; 2000 , MAGALHÃES et al; 2010). Esses fungos reduzem a concentração de ácido láctico e estimulam as bactérias que produzem o kefiran, um exopolissacarídeo do tipo dextrana no kefir de leite.

Em ambos os meios de cultura utilizados, a presença das leveduras foi mais evidente no kefir com concentrações mais altas de açúcar não se distinguindo em termos de concentração diferenças relacionadas ao tempo de incubação. Apesar das concentrações observadas, em torno de 10 a 20% serem inferiores as encontradas para o gênero *Microbacterium*, há que se considerar que o volume das leveduras é cerca de dez vezes maior do que o das bactérias. É possível que as leveduras predominem nos grãos do kefir de água utilizados nesse estudo tal qual foi observado por Magalhães et al. (2010)

Em geral, bactérias ácido-láticas (BAL) são mais numerosas (10^8 - 10^9 UFC/g) que leveduras (10^5 - 10^6 UFC/g) e bactérias ácido-acéticas (BAA) (10^5 - 10^6 UFC/g) nos grãos de kefir. Entretanto, as condições de fermentação podem afetar este padrão (KOROLEVA, 1991; GARROTE *et al.*, 2001; FARNWORTH, 2005).

Entender o papel dos diversos microrganismos encontrados nesse estudo na manutenção das características do kefir de água deverá ser assunto de estudos futuros. Já a diversidade pode estar relacionada à sua procedência e condições de cultivo. Bergamann (2010) relata que a variedade de microrganismos encontrada no kefir poderia ser atribuída a diferentes origens, entre outros fatores como a geográfica, o modo de preparo e o substrato utilizado para a proliferação do kefir. Por outro lado Wszolek et al (2001) discordam e afirmam que apenas o substrato é capaz de diferenciar a composição do kefir depois de analisar diferentes bebidas lácteas provenientes da Polônia e Escócia.

Como o kefir é um produto feito em casa, multiplicado em várias regiões do Brasil e do mundo com diferenças na forma de manejo no substrato e nas concentrações de açúcar, adição de frutas secas, limão, estas diferenças podem se relacionar aos microrganismos presentes que são “selecionados” pela forma de preparo e qualidade do substrato utilizado para a fermentação, dentre eles a qualidade do açúcar utilizado. No estudo conduzido por Generoso *et al.* (2009) foram avaliadas 31 marcas de açúcar mascavo comercializadas nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Trinta por cento das amostras apresentaram valores acima do limite microbiológico exigido. Jesus (2010) avaliou a qualidade microbiológica de 10 marcas de açúcar mascavo comercializadas no interior de São Paulo e observou que apenas quatro atenderam aos parâmetros da *National Food Canners and Processors*. Nenhuma delas obteve resultado satisfatório em relação à qualidade microbiológica, sendo que a quantidade de bactérias mesófilas estava acima da permitida devido à falta de controle de qualidade. A qualidade microbiológica do açúcar depende de controle de umidade (mantendo atividade de água dentro do padrão estabelecido), às condições de higiene durante o preparo e armazenamento. A cana de açúcar também deve ser limpa, não pode ser queimada e/ou doente, pois as impurezas acompanham o açúcar. Os padrões internacionais estabelecem um limite de 50 UFC.g⁻¹ para bolores e leveduras, 50 UFC g⁻¹ para bactérias mesófilas totais e até 50 esporos de termófilas em 10 g de produto.

Assim é importante mencionar que a qualidade microbiológica do açúcar utilizado como substrato para a fermentação também pode influenciar e alterar a comunidade microbiana do kefir.

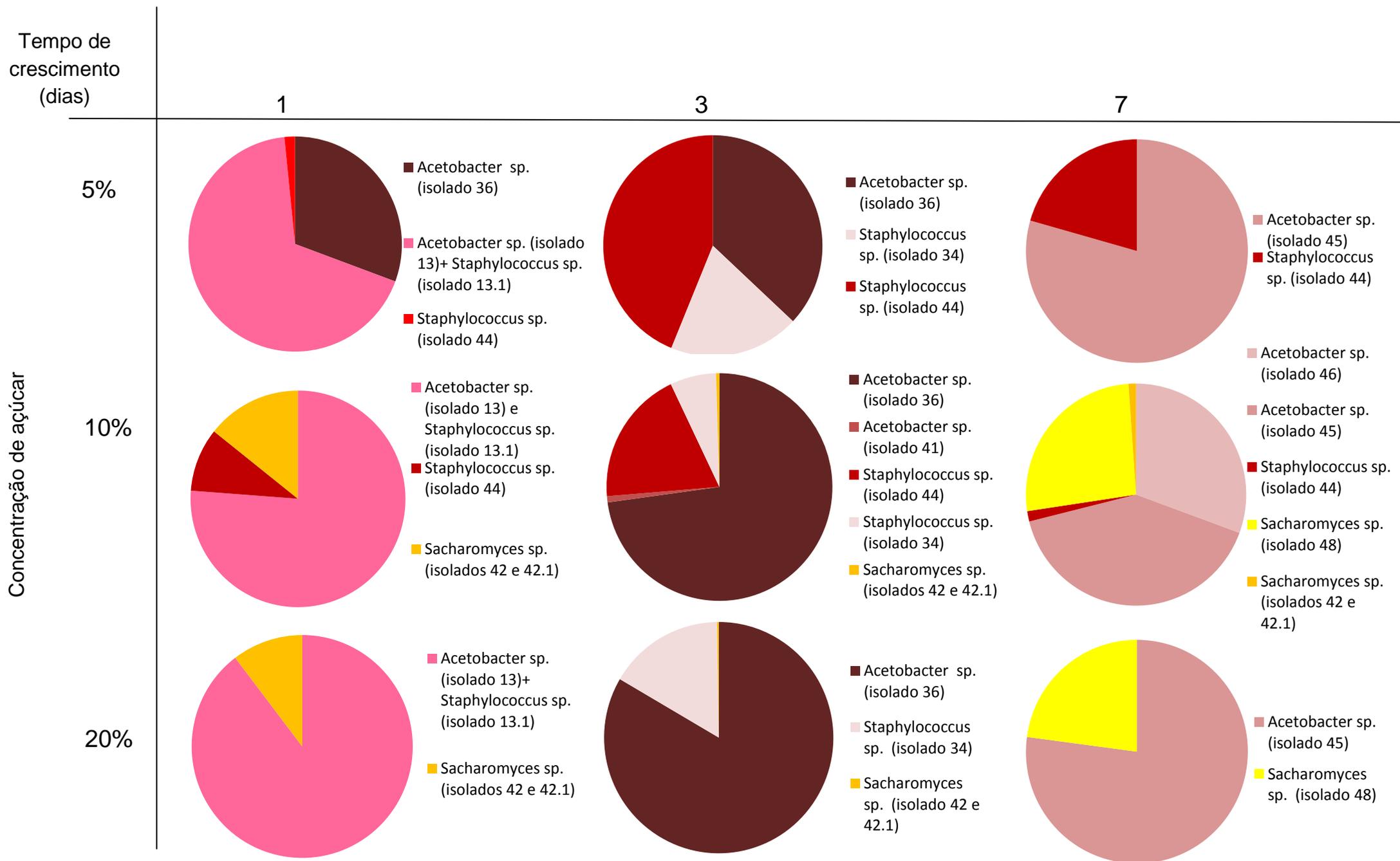


Figura 6 . Freqüência de isolados obtidos a partir do sobrenadante do kefir de água em meio MRS (De Man, Rogosa and Sharpe Agar) que é reconhecido como um meio para obtenção de bactérias ácido lácticas com um, três e sete dias de crescimento e três concentrações de açúcar.

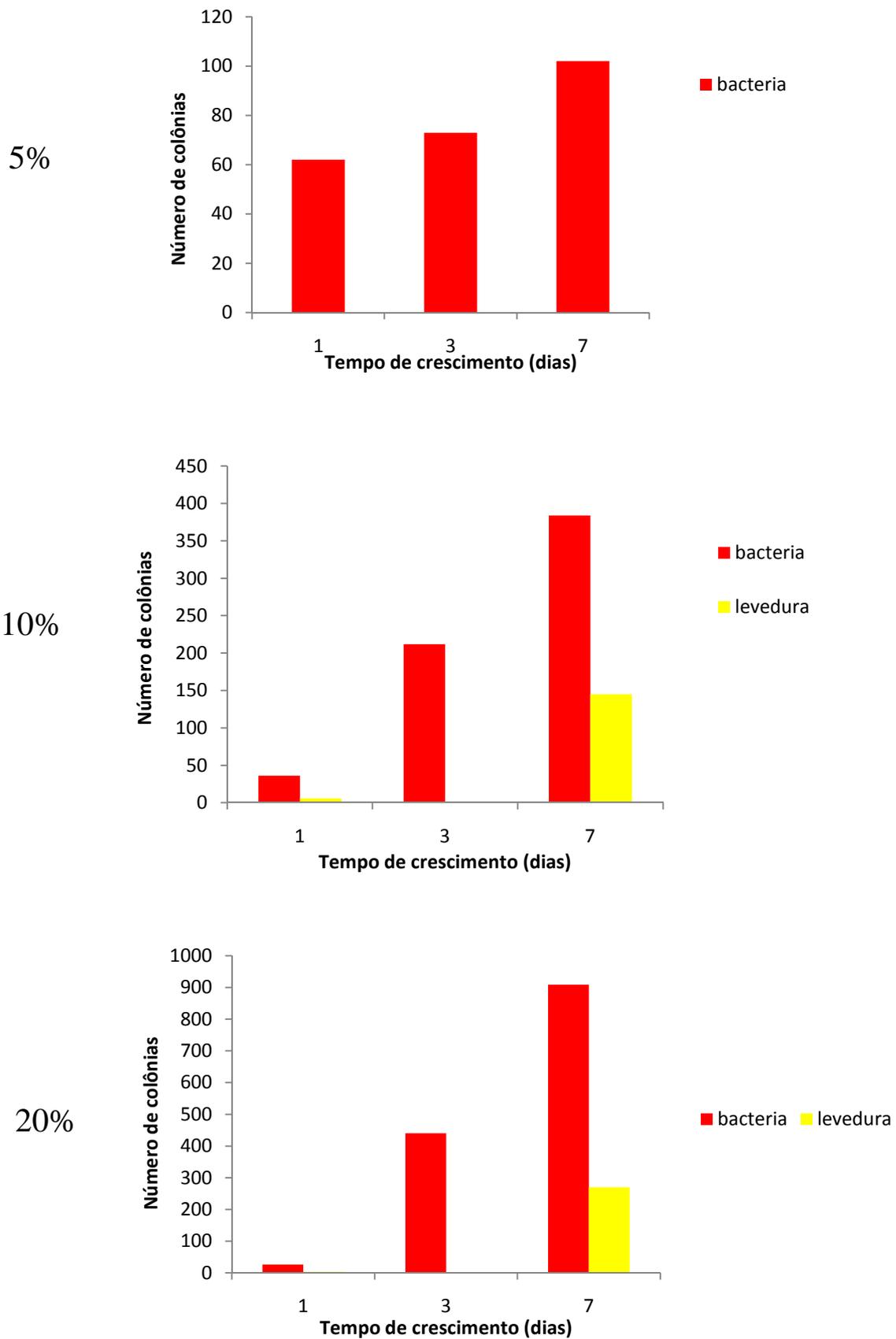


Figura 7. Número de unidades formadoras de colônias dos microrganismos obtidos em meio MRS a partir do sobrenadante do kefir de água com três concentrações de açúcar.

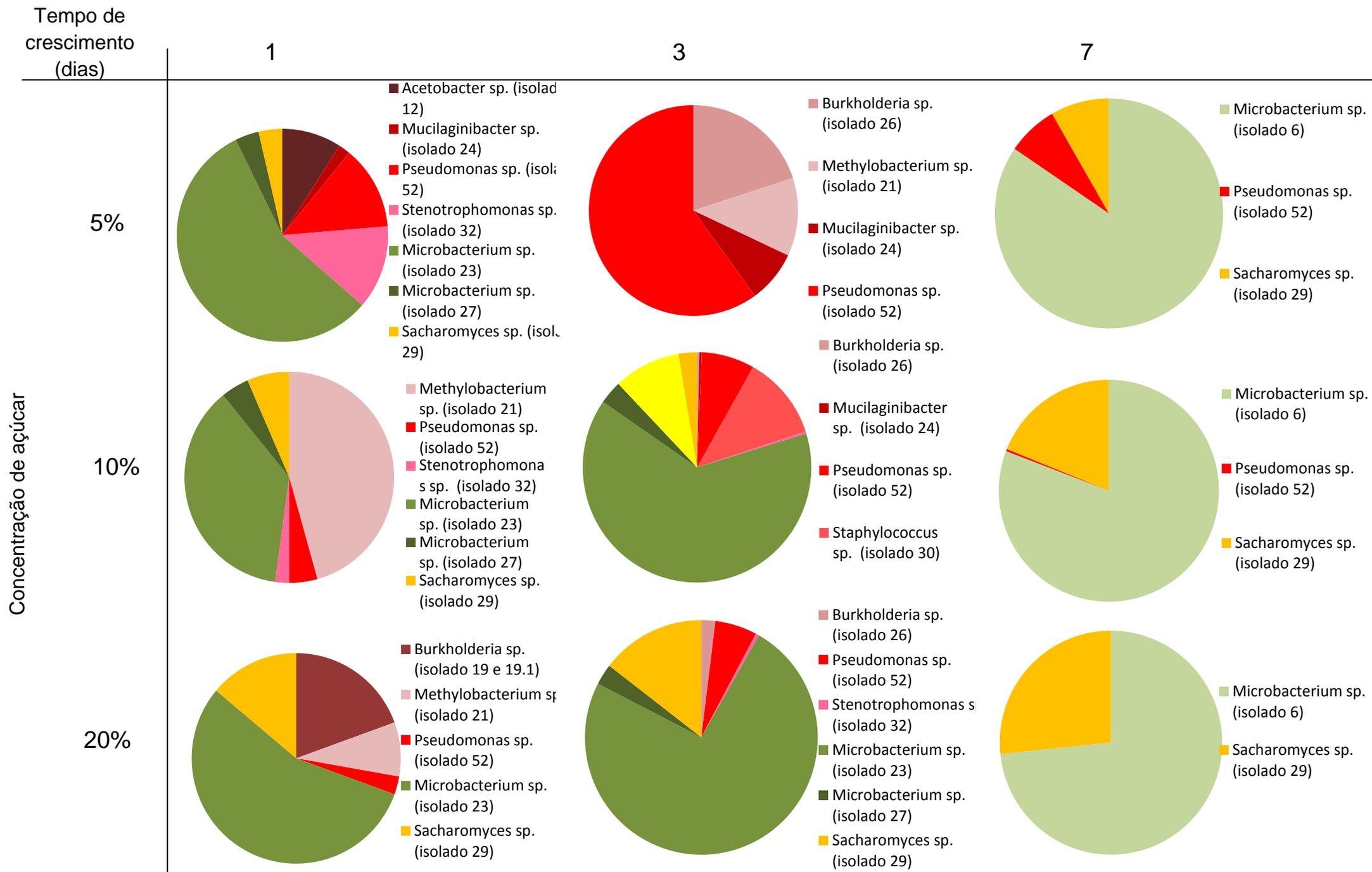


Figura 8. Frequência de isolados obtidos a partir do sobrenadante do kefir de água em meio DYGS (dextrose yeast glucose sucrose) com um, três e sete dias de crescimento e três concentrações de açúcar.

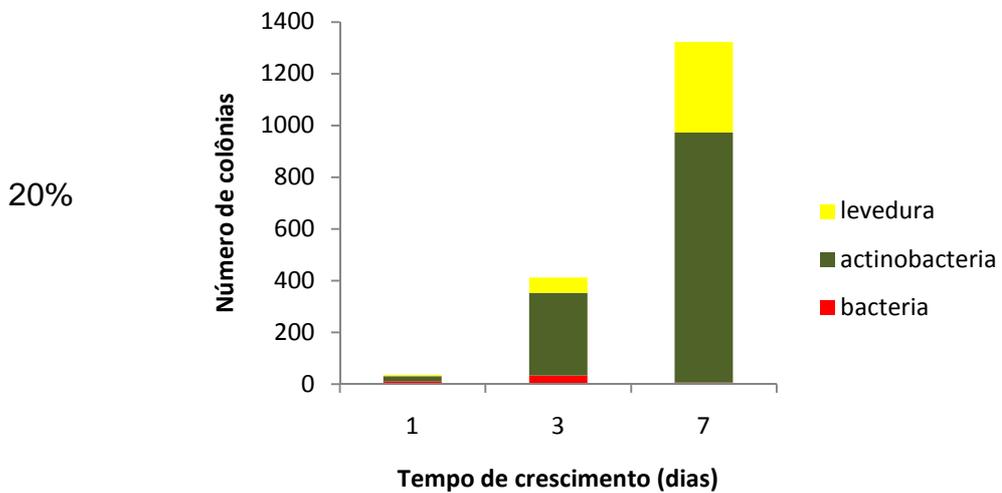
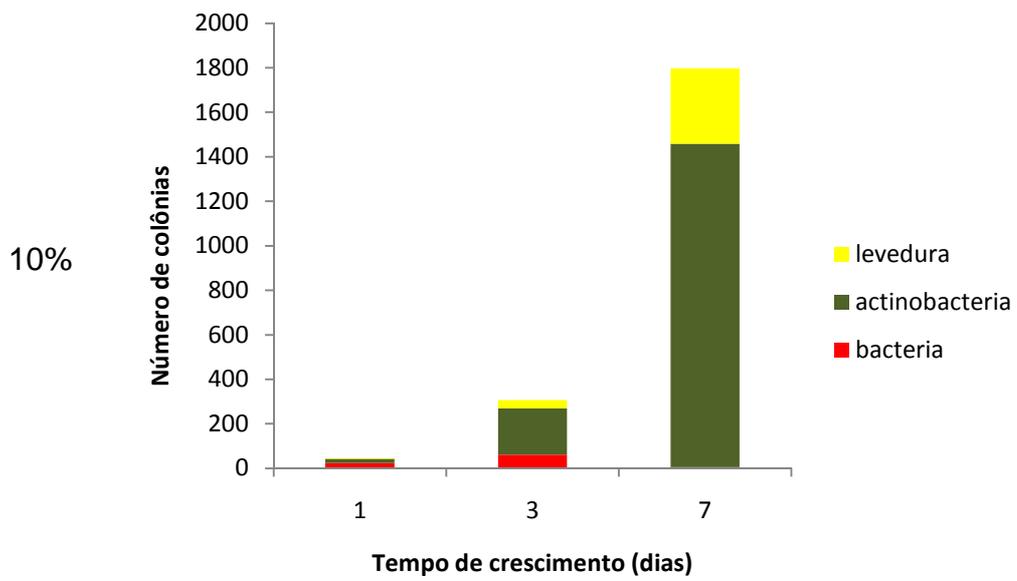
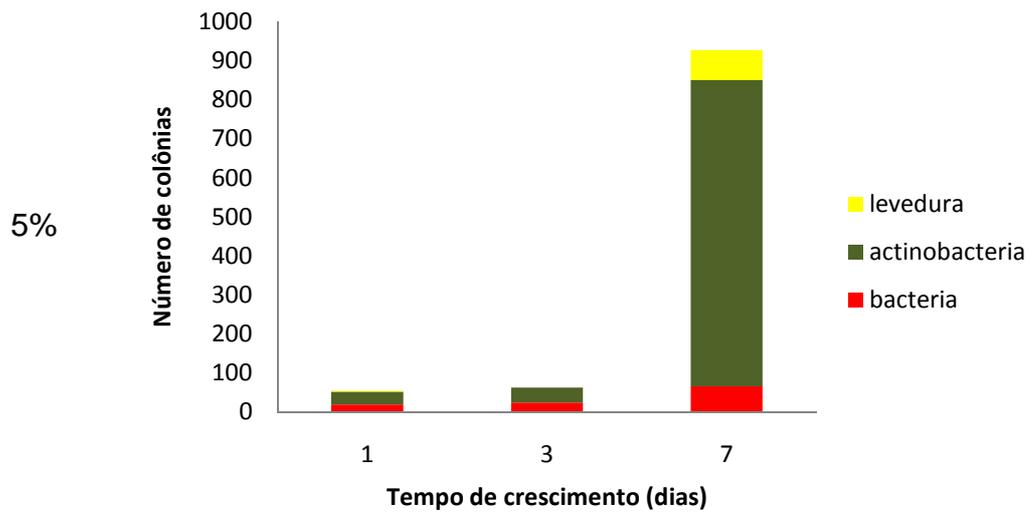


Figura 9. Número de unidades formadoras de colônias dos microrganismos obtidos em meio DYS a partir do sobrenadante do kefir de água com três concentrações de açúcar.

6.5 Produção do bokashi

Passado os 40 dias de armazenamento, os bokashi foram abertos e analisados pelos alunos do Programa de Pós graduação em Agricultura Orgânica, observando-se as propriedades sensoriais do produto.

Todos os bokashi apresentaram características típicas, indicando que o processo de fermentação foi efetuado de forma adequada. A amostra que não recebeu microrganismos apresentou odor ligeiramente diferente das demais. O bokashi produzido a partir de 250 ml de kefir apresentou um odor mais satisfatório, segundo os avaliadores experientes presentes.

Além do tempo insuficiente para realizar o estudo, talvez não fosse possível mostrar o efeito do kefir na produção do bokashi devido às flutuações de condições ambientais e falta de conhecimento científico na manipulação e aplicação do produto, como relatado no estudo de Kato (1992) e Noparatraporn (1996) que não conseguiram mostrar o efeito do EM na produção bokashi devido a esses fatos.

Os resultados obtidos sugerem que o kefir de água pode substituir os inoculantes comerciais, auxiliando no processo fermentativo na preparação do bokashi.

7 CONCLUSÕES

- 1- A água com açúcar mascavo mostrou ser um bom meio para o preparo do kefir observando-se crescimento da massa de grãos e acidificação do produto.
- 2- A maior a concentração de açúcar disponível (20%) foi responsável pela maior produção de grãos.
- 3- Os maiores valores de proteína da fase líquida aparecem no início do período de incubação, enquanto a proteína dos grãos aumenta gradativamente ao longo do período atingindo um máximo aos 3 ou 7 dias dependendo da concentração de açúcar disponível.
- 4- O cultivo da fase líquida do kefir nos meios MRS e DYGS seguido do seqüenciamento da região do 16S rDNA mostrou a presença de sete gêneros bacterianos (*Acetobacter*, *Burkholderia*, *Methylobacterium*, *Mucilaginibacter*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* e *Stenotrophomonas*, um de actinobactéria (*Microbacterium*) e um de levedura (*Saccharomyces*).
- 5- A recuperação dos isolados a partir das preparações de kefir com 5% de açúcar mascavo apresentou principalmente gêneros bacterianos, incluindo-se as actinobactérias, que foram comuns a todas as preparações de kefir independente da concentração de açúcar disponível. Leveduras só apareceram nas concentrações de 10 e 20% de açúcar.
- 6- Em termos de sucessão microbiana, os gêneros bacterianos foram mais comuns no início do período de incubação, enquanto as concentrações de actinobactérias e leveduras aumentaram ao longo desse período.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho foi dado destaque para o estudo da fase líquida do kefir de água, sendo esta pouco estudada anteriormente por outros autores. O kefir de água possui várias aplicações na agricultura. Ele é utilizado como inóculo para produção de substrato, como por exemplo o bokashi, acelerador de compostagem, probiótico na produção animal e também na medicina humana. A fase líquida do kefir é de fácil manejo e armazenamento, podendo assim ser utilizada por pequenos agricultores.

De acordo com os resultados sugere-se a utilização da fase líquida incubada por 3 dias com 10% de açúcar, por sua maior diversidade microbiana e estabilidade da proteína.

Nas primeiras 24 horas provavelmente ocorreu a presença somente de bactérias que, no princípio, oxidaram a sacarose a piruvato formando ácido láctico e acético, acarretando a queda de pH e aumento do teor de proteína, sugere-se que pode estar associado à maior quantidade de substrato para o metabolismo dos microrganismos. Já no terceiro dia, simultaneamente com a queda do substrato, ocorre a estabilização da proteína e produção de dextranas pelas bactérias. No terceiro dia também ocorre aparecimento de leveduras que por sua vez irão produzir etanol a partir da sacarose, precipitando a dextrana, ocasionando o aumento da massa dos grãos, porém menor diversidade microbiana. (anexo)

É importante destacar que o presente estudo não é conclusivo em relação a composição microbiana e a presença ou ausência de alguns microrganismos pode estar relacionadas à seletividade do meio.

A tentativa de elaboração do bokashi, e a composição microbiana relacionada no presente estudo sugere que o kefir de água pode substituir com eficácia os inoculantes comerciais, auxiliando no processo fermentativo na preparação do bokashi.

Os dados encontrados podem ser considerados como uma ferramenta para melhor explorar as propriedades dos grãos de kefir, não só na indústria de alimentos, mas também na agricultura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSADI, M.M; POURAHMAD, R.; MOAZAMI, R. Use of isolated kefir starter cultures in kefir production. *World Journal of microbiology & Biotechnology*, v.16, n.6, p.541-543, 2000.
- AUSUBEL F M; BRENT R; KINGSTON. R E; MOORE. D D; SEIDMAN, J G; SMITH. JA, STRUHL. K. **Current protocols in molecular biology**. Wiley-Interscience, New York (1992).
- AYMERICH, T.; MARTIN. B; GARRIGA.M; HUGAS, M - Microbial Quality and Direct PCR Identification of Lactic Acid Bacteria and Nonpathogenic Staphylococci from Artisanal Low-Acid Sausages. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 4583–4594 Vol. 69, No. 8 -Aug. 2003.
- BATAGLIA, O.C.; ABREU, C.A. *Análise química de substratos para crescimento de plantas: um novo desafio para cientistas de solo*. Viçosa: SBCS. v. 26, p. 8-9 (**Boletim informativo**), 2001.
- BERGAMANN, R.S.O; PEREIRA, M.A; VEIGA, S.M.O.M; SCHNEEDORF, J.M; OLIVEIRA, N.M.S; FIORINI, J.E. Microbial profile of a kefir sample preparations-grains in natura and lyophilized and fermented suspension. *Ciência e Tecnologia de alimentos*, Campinas- 2010.
- BEZERRA, A.B., BOARI, C.D., OLIVEIRA, M.N., ZANCANARO, JR.O. Kefir X iogurte: uma comparação sensorial. Indústria de laticínios, São Paulo, 1999.
- BOTTAZZI, V; BIANCHI, F. A note on scanning electron microscopy of micro organisms associated with the kefir granule. *Journal of applied Bacteriology*, v.48, p. 265-268, 1980.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **RESOLUÇÃO Nº 5, DE 13 DE NOVEMBRO DE 2000**. Dispõe sobre a inspeção de alimentos de origem animal. Disponível em <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>. Acesso em: 21/03/2012
- CARNEIRO, R.P; Desenvolvimento de uma cultura iniciadora para produção de kefir. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 143p. (**Dissertação, Mestrado em Ciências de Alimentos**),. 2010.
- CHABOUSSOU, F. Les Plantes Malades des Pesticides. Paris: Editions Debarb, p. 265-1985.
- CHAGAS, P.R.R.; TOKESHI H.; M.C. ALVES. **Effect of calcium on yield of papaya in conventional and organic systems** (In Press) .Sixth International Conference on Kyusei Nature Farming. Pretori. South Africa October 28-31. **Proceedings on Kyusei Nature Farming and Effective Microorganisms for agricultural and Environmental Sustainability**, Thailand, 1999.

CHEIRSILP, Benjamas; SHIMIZU, Hiroshi; SHIOYA, Suteaki Enhanced kefir production by mixed culture of *Lactobacillus kefirano faciens* and *Saccharomyces cerevisiae* - **Journal of Biotechnology** -2003 .

CHEN, T.-H.; WANG, S.-Y.; CHEN, K.-N.; LIU, J.-R.; CHEN, M.-J. Microbiological and chemical properties of kefir manufactured by entrapped microorganisms isolated from kefir grains. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 3002-3013, 2009.

COLWELL, R. R. 1970a. Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio*: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species. *J Bacteriol* 104:410-433.

COLWELL, R.R. 1970b. Polyphasic taxonomy of bacteria. *In Culture Collections of Microorganisms*, pp. 421-436. H. Iizuka & T. Hasegawa. (eds.) Tokyo, Uni

CRISPIM, S. M. Bactérias do ácido láctico recuperadas de “massa de puba”: quantificação, isolamento, identificação molecular e pesquisa de substâncias antagonistas. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. 64 p. **(Dissertação, Mestrado em Microbiologia)**- 2008.

DALIÉ, D.K.D., DESCHAMPS, A.M.,FORGET, F. R. Lactic acid bacteria – Potential for control of mould growth and mycotoxins:**A review** *Food Control*, 21, 370-380-2010.

DELLAGLIO, F.; FELIS, G.E. Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. *Current Issue in Intestinal Microbiology*, v. 8, p. 44-61, 2007.

deMan J. et al Rogosa M.AndSharpeM.,1960) Disponível em :
https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/Content/hugo/LactobacilliMRSAgar.html.
Acesso em fev/2011

DIAS, Anelise. Caracterização e Seleção de Bactérias Fluorescentes Promotoras do Crescimento de Couve. 2011. 151 p. **Tese (Doutorado em Ciências). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.**

DOBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília Embrapa-SPI: Itaguaí, RJ: Embrapa-CNPAB, 1995.

DUITSCHAEVER, C.L; KEMP,N.; EMMOS,D. Pure culture formulation and procedure for the production of kefir. *Milchwissenschaft*, v. 42, p. 80-82, 1987.

FARNWORTH, E.R. kefir – a complex probiotic.**Food Sci. Technol. Bull.**, v.2, n.1, 2005.

FERREIRA, C.L.F. Prebióticos e Probióticos atualização e prospecção.. 206 p, Viçosa,-2003.

FRANCO, B.D.G.M; LANDGRAF, M. Microbiologia dos alimentos. São Paulo: Atheneu, 182p-1996.

GARROTE G., ABRAHAM A., DE ANTONI G.L 2001 Chemical and microbiological characterisation of kefir grains.**Journal of Dairy Research**, 6: 639–652, 2001.

GILLIS, M.; VANDAMME, P.V.; SWINGS, J.; KERSTERS, K. Polyphasic taxonomy. **Bergey's manual of systematic bacteriology**, 2005.

GORSKI, D. kefir, 21st century yogurt? *Dairy Foods*, v. 95, p. 49, 1994.

GREEN (P.N.) and BOUSFIELD (I.J.): Emendation of *Methylobacterium* Patt, Cole, and Hanson 1976; *Methylobacterium rhodinum* (Heumann 1962) comb. nov. corrig.; *Methylobacterium radiotolerans* (Ito and Iizuka 1971) comb. nov., corrig.; and *Methylobacterium mesophilicum* (Austin and Goodfellow 1979) comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1983, **33**, 875-877.

GREGÓRIO, Marcelo Zaia; CHAGAS, Paulo Roberto Ribeiro; OTA, Hiroshi; KINJO, Sakae.: Eficiência do EM e do Bokashi no controle da temperatura em processo de biotransformação de resíduos orgânicos e restos de poda de vegetais urbanos – **Congresso Brasileiro de ciência e tecnologia em resíduo e desenvolvimento sustentável**. Florianópolis – Santa Catarina (2004).

GULITZ, A; STADIE, J; et al, The microbial diversity of water kefir. **International Journal of Food Microbiology**, 2011.

GUPTA, R.S. & E. Griffiths. 2002. Critical issues in bacterial phylogeny. *Theor. Popul. Biol.* 61:423-434.

HIGA, T.; WIDIDANA, G.N. Changes in the soil microflora induced by effective microorganism. In: **INTERNATIONAL CONFERENCE ON KYUSEI NATURE**, 1991.

HOMMA, S. Kenji, **Nutri Bokashi em respeito a natureza**, São Paulo, 2003.

<http://pt.wikipedia.org/wiki/Kefir> acessado em agosto de 2011.

http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/143.pdf) acesso em jun/2012

<http://www.sbgq.org.br/ranteriores/23/resumos/0176-2/index.html>) acesso em junho de 2012.

https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/Content/hugo/LactobacilliMRSAgar.html.

HUSEINI, H.F; RAHIMZADEH,G; FAZELI,M.R.F; MEHRAZMA,M; SALEHI,M.Evaluation of wound healing activities of kefir products - **journal homepage:www.elsevier.com/locate/burns**. JBUR-3656; No. of Pages 5, 2011.

ISOBE, K.; KOIDE, Y.; YOKOBE, Y.M.; WAKAO, N. Crystallization and some properties of d-lactate dehydrogenase from *Staphylococcus* sp. LDH-1. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.94, p. 330-335, 2002.

IWAHORI, H.; T. NAKAGAWARA. 1996. Studies on EM application in nature farming. V.Applying methods of EM bokashi in vegetable cultures.**Annual Meeting of Japanese Society of Soil Science and Plant Nutrition**,, Tokyo-1996.

IWAISHI, S. Effects of EM bokashi on various paddy-rice varieties.**Annual Meeting of Asia-Pacific Nature Agriculture Network**. October , 1994.

JAY, J. M. Fermentação e produtos lácteos fermentados. In: JAY, J. M. (6.ed) **Microbiologia de Alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2005. p.131-147.

KÄMPF, A.N. Análise física de substratos para plantas. **Viçosa**: SBCS. 2001. v. 26, p. 5-7 (**Boletim Informativo**).

KEMP, N. kefir, the champagne of cultured dairy products. **Cultured Dairy Products Journal**, v. 19, p. 29-30, 1984.

KIEHL, E.J. **Manual de compostagem**: maturação e qualidade do composto. **Piracicaba**, edição do autor. 171p, 1998.

KOROLEVA, N. S. Products prepared with lactic acid bacteria and yeasts. In: Robinson, R.K (Ed) *Therapeutic properties of fermented milks*. London, UK: **Elsevier Applied Sciences Publishers**, p.159-179, 1991.

KOROLEVA, N.S. **Technology of kefir and kumys**. IDF Bull. V.227, p.96-100. 1988.

LEISNER, J.J.; VANCANNEYT, M.; GORIS, J.; CHRISTENSEN, H.; RUSUL, G. Description of *Paralactobacillus selangorensis* gen. nov., sp. nov., a new lactic acid bacterium isolated from chili bo, a Malaysian food ingredient. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.50, p. 19-24,-2000.

LIBUDZISZ, Z.; PIATKIEWICZ, A. kefir production in Poland. **Dairy Industries International**, v. 55, p. 31-33, 1990.

LOPITZ-OTSOA, Fernando, REMENTERIA, Aitor, ELGUEZABAL, Natalia and GARAIZAR, Javier: Kefir: A symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities CIC bioGUNE, Parque Tecnológico de Bizkaia, Spain--**Rev Iberoam Micol**; 67-74pg-2006

LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin-phenol-reagent, **J. Biotechnol.**, v. 193, p.265-275, 1959.

LUDWIG, W. & H. Klenk. 2001. Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for procaryotic systematics, pp. 49-65. In *Bergey's Manual of Systematics Bacteriology*. Second Edition. Springer-Verlag. Berlin.

MACHADO, A.L.P; MARDEN, A.P; VIERIRA, L.F; SILVIA, M.C; LEANDRO, W.M; Produção de mudas de cedro (*Cedrela fissilis Vell*) em cultivo orgânico utilizando Kefir como biofertilizante. **Cadernos de Agroecologia – ISSN 2236-7934 – Vol 6, No. 2, Dez 2011**.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. *Brock Biology of Microorganisms*. 8^o ed. **Prentice Hall International**, 986 p-1997.

MAGALHÃE, K. T., Pereira, G.V. de M., Dias, D. R., & Schwan, R. F. Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** p.1241–1250 ,(2010).

MANUS, L. J. Liquid cultured dairy products. **Cultured Dairy Products Journal**, v. 14, p. 9-14, 1979.

- MCARTHUR, J.V. Microbial ecology: an evolutionary approach. **Academic Press**. 2006. 415p. Academic Press San Diego
- MESQUIARI, M. Desenvolvimento tecnológico de um sucedâneo de quefir - Iofir®. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da **UFMG**.. 142 p. (**Dissertação, Mestrado em Ciências de Alimentos**)- 1999.
- MESQUINI, R.M.;SCHWAN, R.F;VIEIRA, R.A;NASCIMENTO, J.F. Controle e progresso temporal da ferrugem asiática da soja sob controle alternativo em campo.**Summa Phytopathol.**,Botucatu, v. 37, n. 1, p. 24-29, 2011.
- MESQUINI,R.M; SCHWANESTRADA,K.R.F; NASCIMENTO, J.F.BALBI-PENA, M.I. BONALDO, S.M. Efeito de produtos naturais na indução de fitoalexinas em cotilédones de soja e na germinação de uredinósporos de *Phakopsora pachyrhizi*.**Rev. Bras. de Agroecologia**. Vol.2 No.2/out. 2007.
- MIGUEL, M.G.C.P.; Identificação de microrganismos isolados de grãos de kefir de leite e de água de diferentes localidades (**Dissertação de Mestrado**). **UFLA** Lavras, MG Brasil, 2009.
- MIGUEL, M.G.C.P; CARDOSO, P.G; LAGO, L.A; SCHWAN, R.F; Diversity of bacteria present in milk kefir grains using culture-dependent and culture independent methods. **International Journal of Food Microbiology**, 2010
- MOREIRA, F.S.M. & SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica dos solo**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2002. 626p.
- MOREIRA, M.E.C; FERRAZ, V; BARBOSA, L.C.A; SCHNEEDORF,J.M. Atividade Antiinflamatória de carboidrato produzido por fermentação aquosa de grãos de Quefir. **Quim.Nova**, v.31, 2008.
- NASHIF.S.A. AND NELSON S. F. E: **Some Studies on Microbacteria from Iowa Dairy Products*** - **Journals. ASM.org** Dairy Industry Section, Iowa Agricultural September ; 1952 .
- NAUMOVA. ES; IVANNIKOVA, YuV; GI, Naumov Genetic differentiation of the sherry yeasts *Saccharomyces cerevisiae*: **Biochem Microbiol** (2004).
- NOMURA, M.; KOBAYASHI, M.; NARITA, T.; KIMOTO-NIRA, H.; OKAMOTO, T. Phenotypic and molecular characterization of *Lactococcus lactis* from milk and plants. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, p. 396-405, 2006.
- NOPARATRARAPORN, N. Thailand collaborative research on evaluation of EM and EM products, their feasibility testing and effects of their uses on agriculture and environment. **Open Symposium: Present Situations and Prospects of Microorganisms as Agricultural Materials**, Tokyo- August ,1996.
- OLIVEIRA, R.B.S. Análise microbiológica do quefir em grãos, suspensão, liofilizado e adicionado à ração de coelhos(**dissertação de mestrado em ciência animal**) – **Unifenas – Alfenas/ MG** – 2005.

- PALLERONI, N. J. Genus I. *Pseudomonas*. In: BRENNER, D.J.; KRIEG, N.R.; STALEY, J.T. (Ed), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Part B: The Proteobacteria. Springer, New York, pp. 323–379, 2005.
- PANKRATOV, Timofei A. ; Brian J. Tindall; LIESACK, Liesack; DEDYSH, Svetlana N.: *Mucilaginibacter paludis* gen. nov., sp. nov. and *Mucilaginibacter gracilis* sp. nov., pectin-, xylan and laminarin-degrading members of the family Sphingobacteriaceae from acidic Sphagnum peat bog. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** -2007.
- PENTEADO, Silvio Roberto. Adubação orgânica, Preparo de composto e Biofertilizantes. **Agrorgânica** 2ªEd- Fev/2006.
- QUEROL, Amparo; BELLOCH, Carmela; FERNANDEZ, Maria Teresa : **Molecular evolution in yeast of biotechnological interest** – 2003.
- RODRIGUES, Sueli - Estudo da síntese enzimática de dextrana na presença de maltose como aceptor l- Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química: Campinas, SP:, **Tese (doutorado)** - 2003.
- SCHNEEDORF, J.M; ANFITEATRO D.N. Quefir, um probiótico produzido por microrganismos encapsulado e inflamação. In: **Carvalho JCT (Ed.) Fitoterapicos Anti-inflamatórios**. São Paulo, Tecmedd, 2004: 443-462.
- SIMOVA, E.; BESHKOVA, D.; ANGELOV, A.; HRISTOZOVA, TS.; FRENGOVA, G.; SPASOV, Z. Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 1-6, 2002.
- SINGH, J.S.; PANDEY, V.C.; SINGH, D.P. Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.140, p.339–353, 2011.
- STAHNKE, L. H.: Aroma Components from Dried Sausages Fermented with *Staphylococcus xylosum* - **Meat Science** - Department of Biotechnology, 1994.
- STANIER, R., INGRAHAM, J., WHEELIS, M. Y PAINTER, P.. **Microbiología. Editorial Reverté. Barcelona**. 511 p- 1996
- SUZUKI Y. **Effects of effective microorganisms on yield and quality of ginseng herbs. Symposium of Applied Soil Microbiology**. November 22, Okinawa-1985.
- TAYLOR, J. P. et al. Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoil's using various techniques. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 34, n. 03, p. 387- 401, 2002.
- VENTURA, M.. CANCHAVA, C.; TAUCH, A.; CHANDRA, G.; FITZGERALD, G.F.; CHATER, K.F.; VAN SINDEREN, D. Genomics of Actinobacteria: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.71, p;495-548, 2007.

VINDEROLA, C.G; DUARTE, J.;THANGAVEL, D., PERDIGÓN, G; FARNWORTH, E., MATAR,C. Immunomodulating capacity of kefir. *J. Dairy Res.*, v. 72, 2005.

VITORA, S.S; LAUSADA ;ANSELMO, R.J;, L.I. Effect of kefir bactericide on Salmonella spp.*Informacion Tecnologica* v.12, n.5, p.91-95, 2001.

WANG, Xiaofen,HARUTA, Shin ,WANG, Pu Wang,ISHII, Masaharu ; IGARASHI,Yasuo ; CUI, Zongjun: **Diversity of a stable enrichment culturewhich is useful for silage inoculant and its succession inalfalfa silage** The University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan - 2005.

WESCHENFELDER,S; PEREIRA, G.M; CARVALHO, H.H.C; WIEST, J.M. Caracterização físico-química e sensorial de kefir tradicional e derivados. *Arq. Bras. Med Vet. Zootec*, v.63, n.2, p.473-480, 2011.

WITTHUHN, R.C.; SCHOEMAN, T.; CILLIERS, A. et al. Impact of preservation and different packaging conditions on the microbial community and activity of kefir grains.*Food Microbiol.*, v.22, p.337-344, 2004.

WSZOLEK,M. et al. Properties of kefir made in Scotland and Poland using bovine,caprine and ovine Milk different starter cultures. *Lebensmittel Wissenschaft and Technologie*, v. 34, n. 4, p.251-261, 2001.

www.ncbi.nih.gov/BLAST/ acessado em agosto 2012

www.vegetariano.org acessado em Nov de 2011

WYDER,M.T.; SPLLIRMANN,H; PUHAN,Z. Investigation of the yeast flora in dairy products: a case study of kefir. *Food Technology and Biotechnology*, v.35, n.4, p.299-304, 1997.

XAVIER, G.R.; SILVA, F.V.; ZILLI, J.E.; RUMJANEK, N.G. **Adaptação de método para extração de DNA de microrganismos associados a raízes de plantas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2004. 24p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 171).

YOKOTA, A., TAKEUCHI, M., and WEISS, N. "Proposal of two new species in the genus Microbacterium: Microbacterium dextranolyticum sp. nov. and Microbacterium aurum sp. nov." *Int. J. Syst. Bacteriol.* (1993) 43:549-554.

ANEXOS

Anexo A – Fotos de colônias cultivadas em meio Dygs

Anexo B – Fotos de colônias cultivadas em meio MRS

Anexo C – Protocolo e ingredientes utilizados na produção experimental do bokashi

Anexo D - Método de determinação da proteína (Método de LOWRY)

Anexo E – Protocolo : meio DYGS

Anexo F – Protocolo: meio MRS

Anexo G – Sites referentes ao kefir

Anexo H - Tabela do sequenciamento de BLAST

Anexo I – Esquema de alterações no kefir ocorridas no decorrer do tempo

Anexo A:

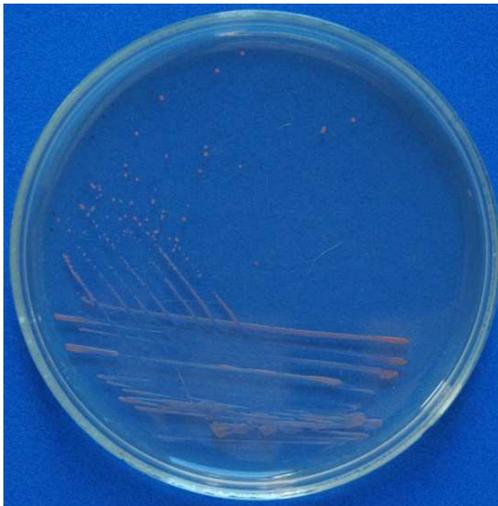
Meio DYGS



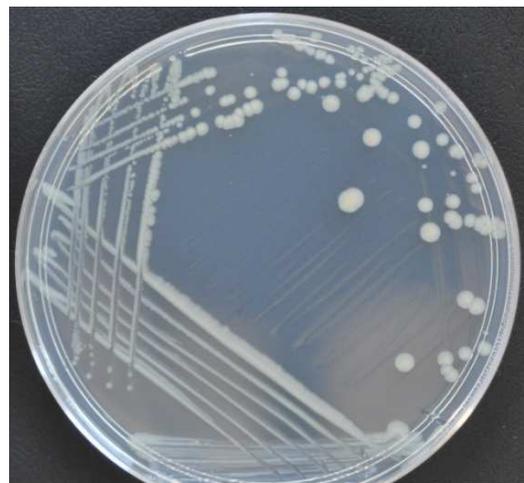
Microbacterium sp.



Acetobacter sp.



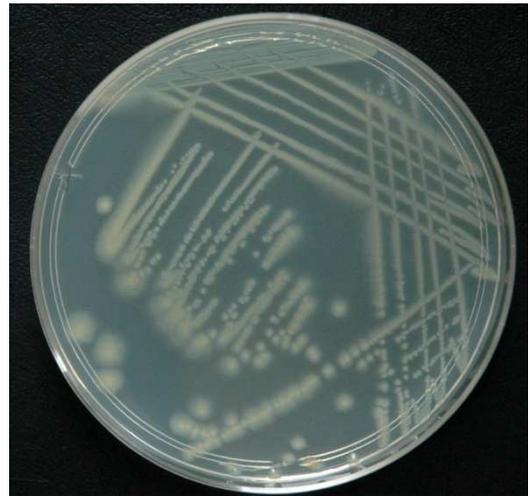
Methylobacterium sp.



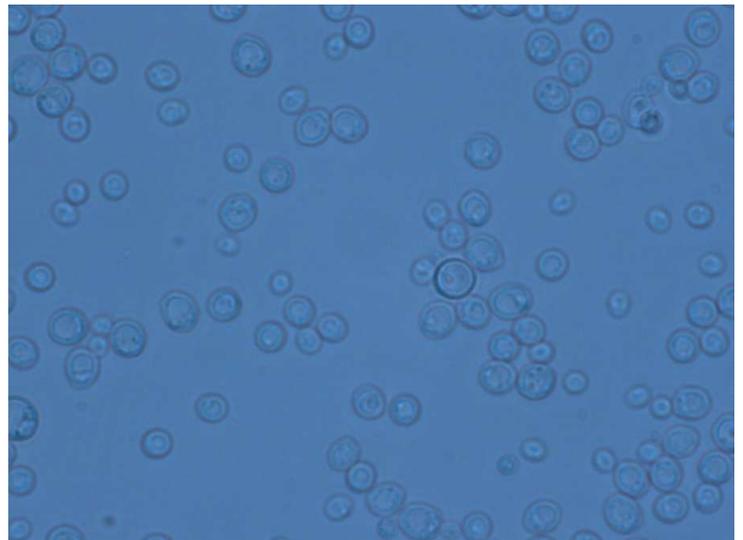
Burkholderia sp.



Microbacterium sp.



Stenotrophomonas sp.



Sacharomyces sp.

Anexo B:

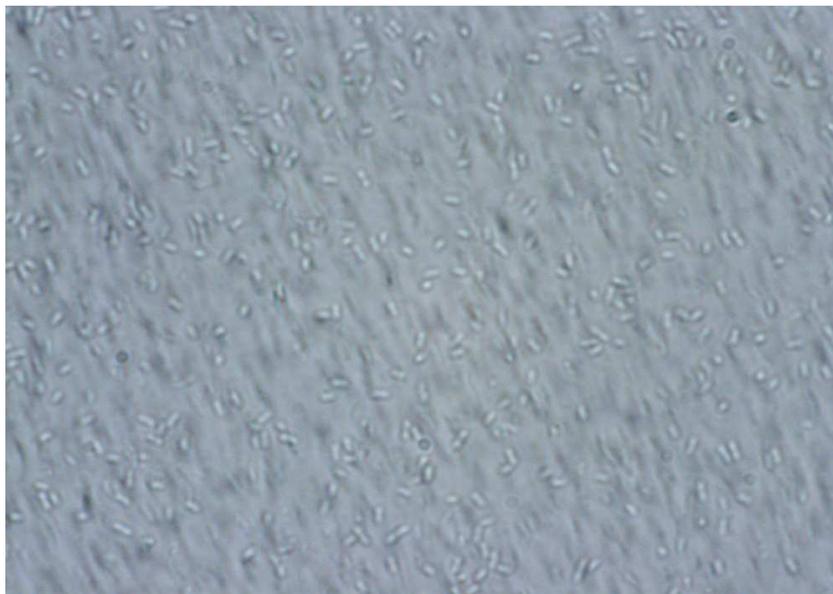
Meio MRS



Acetobacter sp.



Sacharomyces sp.



Acetobacter.sp

Anexo C:

Ingredientes	Controle (só água sem acrescentar microrganismo)	Controle (usando EM)	kefir de 7 dias			kefir de 24 horas		
			Semelhante ao EM	10 x o volume recomendado para o EM	10 % de grãos de kefir	Semelhante ao EM	10 x o volume recomendado para o EM	10 % de grãos de kefir
Farelo de Trigo	6 Kg	6 Kg	6 Kg	6 Kg	6 Kg	6 Kg	6 Kg	6 Kg
Torta de mamona	5 Kg	5 Kg	5Kg	5Kg	5Kg	5Kg	5Kg	5Kg
Açúcar mascavo	25 g	25 g	25g	25g	25g	25g	25g	25g
Água sem cloro	2 L	2L	2L	2L	2L	2L	2L	2L
Microrganismos	---	25 mL de Em ativado*	25 mL de kefir (água)	250 mL de kefir (água)	25 mL de uma suspensão de 10% de grãos na água do kefir**	25 mL de kefir (água)	250 mL de kefir (água)	25 mL de uma suspensão de 10% de grãos na água do kefir**

EM ativado* - 25 mL de EM comercial + 12,5g de açúcar mascavo + 200 mL (deixar 1 semana em garrafa fechada, retirando o gás todos os dias)

Suspensão de 10% de grãos na água do kefir)** - 2,5 g de grãos de kefir em 25 mL de água de kefir.

Anexo D:

Método de determinação da proteína (Método de LOWRY)

Retirar 1 ml do líquido da cultura, centrifugar dissolver (pellet) em **1 ml de ácido tricloroacético** (5%) no vortex e deixe pernoitar ou mais.

Determinação:

Centrifugue por 10 minutos, logo após remova o sobrenadante e seque qualquer sobra do material com a ponta de um lenço de papel, em seguida adicione 0,1 ml de NaOH (0,4 M), vortex, deixando pernoitar em temperatura ambiente.

Pegar qualquer 80ul do liquido da cultura com O.D.< 0.150 ou 40 ul do líquido da cultura com O.D.> 0.150 ; adicionar água destilada para completar 200 ul e 1 ml de solução ABC, Vortex e deixar em temperatura ambiente por 10 minutos, passado o tempo estabelecido, adicionar 100ul do Reagente Folin (Folin: dH₂O- 1:2) e deixar no escuro em temperatura ambiente. A leitura deve ser feita em 625nm.

Soluções:

A – NaOH 0.1 N ----- 2g

Na₂CO₃. H₂O 2% ----- 0.4g

Total do volume: ----- 100 ml dH₂O

B – Tartarato de sódio e potássio KNaC₄H₄O₆. 4H₂O ----- 2g

Total volume: ----- 100 ml dH₂O

C – CuSO₄ 1% ----- 1g

Total volume: ----- 100 ml dH₂O

Solução A, B e C deve ser mantido a 4°C

Solução ABC: 98% A + 1% B + 1% C

Solução padrão de albumina: 40 mg/100ml

A solução de albumina padrão deve ser mantido em alíquota de 1 ml a -20°C

Prepare uma curva de calibração para cada análise, use 50, 100 e 200 ul de solução padrão de albumina.

Anexo E:

MEIO DYGS

Glicose.....	2,0 g
Ácido Málico	2,0 g
Peptona bacteriológica1,5 g
Extrato de levedura.....	2,0 g
K ₂ HPO ₄	0,5g
MgSO ₄ 7H ₂ O.....	.0,5g
Ácido Glutâmico	1,5 g
Água destilada	1000ml
Agar.....	15g/litro

Anexo F:

MEIO MRS

MgSO ₄	0,1g
MnSO ₄	0,05g
Extrato de Carne	10g
Extrato de levedura5g
Dextrose	20g
Peptona	10g
Tween 80.....	1g
Uréia0,5g
Acetato de Sódio5g
pH: 6,5 +/- 0,2 a 25°C	

Anexo G:

SITES REFERENTES AO KEFIR

<http://amigosdokefir.blogspot.com.br/>

<http://www.kefir.xpg.com.br/index.htm>

<http://www.kefir.com.br/>

Anexo H:

BLAST

meio	Isolado	sequenciamento	% Identificação
dygs	12	<i>Acetobacter nitrogenifigens</i>	100
dygs	19	<i>Burkholderia anthina/ cenocepacia</i>	100
dygs	19,1	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	100
dygs	26	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	100
dygs	21	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>	100
dygs	27	<i>Microbacterium dextranolyticum</i>	100
dygs	6	<i>Microbacterium dextranolyticum</i>	100
dygs	23	<i>Microbacterium dextranolyticum</i>	100
dygs	24	<i>Mucilaginibacter rigui</i>	100
dygs	52	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	100
dygs	28	<i>Sacharomyces cerevisae</i>	100
dygs	29	<i>Sacharomyces cerevisae</i>	100
dygs	30	<i>Staphylococcus pasteuri</i>	100
dygs	32	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	100
mrs	13	<i>Acetobacter orientalis</i>	100
mrs	13,1	<i>Staphylococcus pasteuri</i>	100
mrs	34	<i>Staphylococcus pasteuri</i>	100
mrs	36	<i>Acetobacter papayae/ pasteurianus</i>	100
mrs	41	<i>Acetobacter okinawensis/ pasteurianus</i>	99
mrs	42	<i>Sacharomyces cerevisae</i>	100
mrs	42,1	<i>Sacharomyces cerevisae</i>	100
mrs	44	<i>Staphylococcus warneri/ Staphylococcus pasteuri</i>	100
mrs	45	<i>Acetobacter orientalis</i>	100
mrs	46	<i>Acetobacter orientalis</i>	100
mrs	48	<i>Sacharomyces cerevisae</i>	99

Anexo I

1° dia	3° dia	7° dia
Queda do pH	Estabilização da Proteína	Aumento da massa de grãos
Aumento do teor de proteína	Produção de Dextranas pelas bactérias	Ação proteolítica pelas leveduras
	Produção de etanol pelas leveduras	Precipitação da Dextrana