

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS PROBIÓTICOS DO KEFIR
ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF KEFIR PROBIOTICS**Ana Clara Chinchio Nascimento 1****Gabriella Sampaio Bigoni 1****Priscila Reina Siliano 2****Marcia Zorello Laporta 2****RESUMO**

O kefir é uma bebida que pode ser fermentada a partir do leite (kefir de leite), ou de uma solução de água e açúcar (kefir de água). Estes são descritos como uma associação simbiótica de leveduras, bactérias ácido-láticas e bactérias ácido-acéticas. O objetivo do estudo foi determinar sua ação microbiológica sobre as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. A partir do levantamento de literatura específica, foram descritas as microbiotas associadas aos dois tipos de kefir, sendo identificadas várias espécies de bactérias do gênero *Lactobacillus* e leveduras do gênero *Saccharomyces*. Os resultados obtidos nos testes de inibição demonstraram que o kefir de leite e de água possuem ação inibitória de 100% no crescimento bacteriano de *Escherichia coli*, o kefir de leite possui uma ação de inibição de 99,6% e o kefir de água uma inibição de 99,1% no crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*, o kefir de leite (98,15%) se mostrou mais eficiente na inibição do crescimento bacteriano de *Staphylococcus aureus* do que o kefir de água (51,8 %). Pode-se considerar que o kefir de água e de leite apresentaram grande potencial de inibição sobre as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

1

DESCRITORES: Kefir. Probiótico. Inibição. *Pseudomonas aeruginosa*. *Escherichia coli*. *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

Kefir is a drink that can be fermented from milk (milk kefir), or from a solution of water and sugar (water kefir). These are described as a symbiotic association of yeasts, acid-lactic bacteria and acid-acetic bacteria. The aim of the study was to describe the microbiota found in the two types of kefir and to determine their microbiological action on the bacteria *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. From the survey of specific literature, the microbiotes associated with the two types of kefir were described, with the identification of several species of bacteria of the genus *Lactobacillus* and yeasts of the genus *Saccharomyces*. The results obtained in the inhibition tests demonstrated that the milk and water kefir have a 100% inhibitory action on the bacterial growth of *Escherichia coli*, the milk kefir has a 99.6% inhibitory action and the water kefir an inhibition of 99.1% in the growth of *Pseudomonas aeruginosa*, the milk kefir proved to be more efficient in inhibiting the bacterial growth of *Staphylococcus aureus* than the water kefir. It can be considered that the water and milk kefir showed great potential for inhibition on the bacteria *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*.

¹ Graduação, Ciências Biológicas, Centro Universitário Fundação Santo André

ana.nascimento@biologia.fsa.br; gabriella.bigoni@biologia.fsa.br

² Professor Doutor, Centro Universitário Fundação Santo André
marcia.laporta@fsa.br; priscila.siliano@fsa.br

DESCRIPTORS: Kefir. Probiotic. Inhibition. *Pseudomonas aeruginosa*. *Escherichia coli*. *Staphylococcus aureus*.

INTRODUÇÃO

A ingestão de alimentos probióticos, ou seja, aqueles que contêm microrganismos benéficos, vem sendo recomendada cada vez mais, dado o número crescente de evidências científicas a respeito do importante papel que a microbiota de um organismo desempenha em muitas de suas funções (FERRAZ et al, 2009).

Um dos alimentos probióticos mais antigos é o kefir, uma bebida fermentada a partir do leite – kefir de leite, ou de uma solução de água e açúcar – kefir de água. Estes são descritos como uma associação simbiótica de leveduras, bactérias ácido-láticas e bactérias ácido-acéticas (PINTADO et al., 1996; HERTZLER et al., 2003). Um dos benefícios atribuído ao kefir é a sua atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. (GARROTE et al., 2000). Segundo Dias, Silva e Timm (2018), *Lactobacillus* isolados de grãos de kefir apresentam atividade antimicrobiana contra cepas bacterianas, como *E. coli* O157:H7 e *S. aureus*. Essas bactérias podem acarretar inúmeros problemas de saúde. *Pseudomonas aeruginosa* são bactérias que emergiram como um patógeno importante nas últimas duas décadas. Causa entre 10% e 20% das infecções na maiorias dos hospitais. (BODEY et al., 1983). Fijan, 2016, demonstrou que a microbiota do kefir é capaz de reduzir a concentração de *Pseudomonas aeruginosa* embora não seja capaz de inibir totalmente essa bactéria. (FIJAN, 2016). O objetivo do presente estudo foi verificar a ação do kefir de água e de leite sobre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*

MATERIAL E MÉTODOS

Para a descrição da microbiota associada aos dois tipos de kefir foi utilizado o levantamento da literatura pertinente. O quadro 1 discrimina a microbiota do kefir de água e o quadro 2 a microbiota do kefir de leite.

Quadro 1- Microbiota associada ao kefir da água

Bactérias	Leveduras
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Kloeckera apiculata</i>
<i>Lactobacillus alactosus</i>	<i>Pichia membranifaciens</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	<i>Saccharomyces boullardii</i>
<i>Lactobacillus casei subsp.</i>	<i>Saccharomyces bayanus</i>
<i>L. coryneformis subsp. torquens</i>	<i>Saccharomyces florentinus</i>
<i>Lactobacillus fructosus</i>	<i>Saccharomyces pretoriensis</i>
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	<i>Saccharomyces uvarum</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Hansenula yalbensis</i>
<i>Lactobacillus pseudoplantarum</i>	<i>Candida gueretana</i>
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Candida lambica</i>
<i>Streptococcus cremoris</i>	<i>Candida valida</i>
<i>Pediococcus damnosus</i>	<i>Torulopsis inconspicua</i>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	
<i>Bacillus subtilis</i>	
<i>Bacillus graveolus</i>	

Quadro 2 - Microbiota associada ao kefir de leite.

Bactérias	Leveduras

<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Candida krusei</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Candida lambica</i>
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp.	<i>Candida maris</i>
<i>Lactobacillus parakefiri</i>	<i>Candida inconspicua</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Candida tenuis</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp.	<i>Candida kefyr</i>
<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	<i>Saccharomyces unisporus</i>
<i>Lactobacillus kefiri</i>	<i>Saccharomyces humaticus</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Saccharomyces exiguus</i>
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Klyveromyces lactis</i>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Torulaspota delbrueckii</i>
<i>Leuc. Mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>Pichia fermentans</i>
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>
<i>Lact. Lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>Brettanomyces anomalus</i>
<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Issatchenkia orientalis</i>
<i>Acetobacter aceti</i>	<i>Zygosaccharimycetes sp.</i>
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	
<i>Enterococcus durans</i>	

O primeiro procedimento a ser feito foi o teste de viabilidade. As bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* foram obtidas da bacterioteca do Centro Universitário Fundação Santo André, no laboratório de biologia/microbiologia, foram cultivadas separadamente, em 2mL de Caldo Nutriente e incubados a 37°C por 24 horas. As culturas bacterianas foram semeadas em uma placa de Petri contendo Ágar Nutriente (Merck, Alemanha), com auxílio de uma alça de inoculação e esta placa incubada a 37°C por 24 horas para verificação da viabilidade das bactérias.

Em seguida foi realizado o teste de inibição bacteriana pelo soro de kefir de leite e pelo soro de kefir de água. Para isso, alíquotas de 2 mL de soro de kefir de leite foram pipetadas em três tubos de ensaio contendo 2 mL de Caldo Nutriente (Merck, Alemanha) com *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. O mesmo procedimento foi realizado com o soro de kefir de água. Os controles positivos foram preparados da seguinte maneira: três tubos de salina estéril foram semeados com 10 uL de cultura em Caldo de *E. coli*, *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, uma bactéria em cada tubo. Os controles negativos foram preparados da seguinte maneira: um tubo com 2 mL de Caldo Nutriente estéril acrescido de 2 mL de soro de kefir de leite; um tubo com 2 mL de Caldo Nutriente estéril acrescido de 2 mL de soro de kefir de água. A filtração foi feita primeiramente em filtro de nylon, em seguida com o papel filtro qualitativo 12,5 cm, millipore, utilizando no processo a bomba de vácuo. Os tubos foram incubados a 37°C, por 24h e após esse período, foi verificada a presença de turvação (evidenciando o crescimento bacteriano).

Por último foi feita a diluição seriada e contagem das colônias, os seis tubos de teste e os três tubos controle positivos foram submetidos à diluição seriada. Alíquotas de 0,1 mL de cada cultura em Caldo desses nove tubos foram semeadas, de modo seriado, em 10 tubos estéreis, de forma a se obter diluições de 10^{-1} a 10^{-10} . A seguir, as diluições 10^{-6} a 10^{-10} de todas as culturas em Caldo foram semeadas por inundação em placas de Ágar Nutriente, com auxílio de uma alça de vidro (Drigalsky). As placas foram incubadas a 37°C, por 24h e após a incubação, as placas de Ágar Nutriente foram submetidas à contagem de colônias.

Para calcular a porcentagem de inibição do soro de kefir sobre as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, foram contadas as unidades formadoras de colônias (UFC) em cada uma das placas e foi realizado o cálculo: % Inibição = $100 - (\text{UFC crescidas no soro} + \text{Caldo Nutriente} / \text{número de colônias crescidas na salina} + \text{Caldo Nutriente}) \times 100$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tanto o kefir de água como o de leite apresentaram em sua maioria bactérias do gênero *Lactobacillus*, porém o kefir de leite apresentou uma maior diversidade de espécies. Sobre as leveduras, no kefir de água a maior parte das leveduras são do gênero *Saccharomyces*, enquanto a maior parte das leveduras encontradas no kefir de leite são do gênero *Candida*. No geral foram encontradas mais espécies de bactérias e leveduras no kefir de leite, do que no kefir de água.

Os resultados dos testes com a bactéria *E. coli* mostraram que um total de 296 UFC cresceram em meio Caldo Nutriente mas nenhuma UFC cresceu quando a bactéria foi semeada com soro do kefir de água ou leite, mostrando uma inibição de 100% no crescimento da *E.coli*.

Os resultados dos testes com a bactéria *Staphylococcus aureus* mostraram que um total de 54 UFC cresceram em meio Caldo Nutriente mas apenas 26 UFC cresceram quando a bactéria foi semeada com soro do kefir de água, ou seja, uma inibição de 51,8% no crescimento de *S. aureus*, e quando esta foi semeada com soro de leite do kefir apenas uma única UFC cresceu, mostrando uma inibição de 98,15%.

Os resultados dos testes com a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* mostraram que um total de 225 UFC cresceram em meio Caldo Nutriente mas 2 UFC cresceram quando a bactéria foi semeada com soro do kefir de água, ou seja, uma inibição de 99,1% no crescimento e quando esta foi semeada com soro de leite do kefir apenas uma única UFC cresceu, mostrando uma inibição de 99,6% no crescimento desta cepa de *P. aeruginosa*. A tabela 1 resume as porcentagens de inibição de cada soro de kefir sobre as bactérias testadas:

Tabela1: porcentagem de inibição do soro de kefir sobre as cepas bacterianas

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Pseudomonas</i>
Kefir de	100%	98,15%	99,6%
Kefir de	100%	51,8%	99,1%

O soro do kefir de leite se mostrou mais inibitório sobre as cepas testadas (principalmente sobre a *Staphylococcus*, se comparada com o a inibição do soro de kefir de água). Uma possibilidade é que na presença do leite a microbiota probiótica do kefir produza substâncias químicas com potencial bactericida, principalmente sobre Gram positivas. O soro de kefir de água também se mostrou efetivamente ativo contra as bactérias testadas.

As substâncias que inibem o crescimento das bactérias não foram isoladas no presente estudo, podendo ser este o alvo de estudos posteriores. Segundo Alves Dias et al. (2018) um dos motivos do kefir inibir essas bactérias potencialmente patogênicas seria que a fermentação do leite provocada pelos microrganismos presentes nos grãos do kefir gera um ambiente desfavorável a essas bactérias. Outro fator que pode ser determinante para a inibição das bactérias seria que a produção de ácidos orgânicos leva à diminuição do pH do meio também tornando um ambiente desfavorável para o crescimento microbiano.

Outros autores obtiveram resultados semelhantes sobre a inibição de bactérias utilizando o kefir. Wheschenfelder, Wlest e Carvalho (2009) demonstraram que, tanto o kefir de leite como o soro de kefir, na concentração testada de 50%, apresentaram total inibição e inativação frente ao inóculo de *Escherichia coli* ATCC 11229 em concentrações $\leq 10^{-8}$ UFC/mL. Silva et al. (2009) também observaram a inibição de *Staphylococcus aureus* e *E. coli* pelo kefir de água. Rodrigues et al. (2005) constataram que o kefir demonstra atividade inibitória contra organismos testados como a *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e especialmente em *Streptococcus pyogenes*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As propriedades químicas de antibiose produzidas pela microbiota do probiótico kefir ainda devem ser melhor elucidadas, contudo pela revisão realizada e pelos resultados obtidos no presente estudo pode-se afirmar que estes probióticos possuem importantes propriedades antimicrobianas. O soro de kefir de água e de leite apresentaram grande potencial de inibição sobre as cepas de bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* que são potencialmente patogênicas. Os testes desenvolvidos foram *in vitro*, todavia *in vivo*, no intestino humano, outros estudos se fazem necessários para outras observações, todavia pode-se reafirmar a potencial diversidade de aplicações destes probióticos na saúde humana.

REFERÊNCIAS

ALVES DIAS, P.; TEIXEIRA SILVA, D.; DIAS TIMM, C. Atividade antimicrobiana de microrganismos isolados de grãos de Kefir. **Ciência Animal Brasileira**, v. 19, p. 1-8, 10 abr. 2018. Disponível em: <<https://www.revistas.ufg.br/vet/article/view/e-40548>>. Acesso em: 14 mai. 2020.

BODEY, Gerald P. *et al.* Infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa*. **Reviews of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 5, ed. 2, p. 279-313, 1 mar. 1983. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cid/article-abstract/5/2/279/347372>>. Acesso em: 29 set. 2020.

FERRAZ RR, MARQUES NC, FROEDER L, MENON VB, SILIANO PR, BAXMANN AC, HEILBERG IP Effects of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium breve* on urinary oxalate excretion in nephrolithiasis

patients. **Urol Res.** 2009 Apr;37(2):95-100.

FIJAN, Sabina. Influence of the growth of *Pseudomonas aeruginosa* in milk fermented by multispecies probiotics and kefir microbiota. **Probiotics & Health**, v.4, p. 1-6, 27 jan. 2016. Disponível em: < https://www.researchgate.net/publication/293042511_Influence_of_the_Growth_of_Pseudomonas_aeruginosa_in_Milk_Fermented_by_Multispecies_Probiotics_and_Kefir_Microbiota >. Acesso em: 20 nov. 2020.

GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; DE ANTONI, G. L. Inhibitory Power of kefir: the role of organic acids. **Journal of Food Protection**, v. 63. n. 3, 2000. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/12598453_Inhibitory_Power_of_Kefir_The_Role_of_Organic_Acids>. Acesso em: 11 mai. 2020.

HERTZLER, S. R., CLANCY, S. M. Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. **Journal of American Dietetic Association**, v. 153, n. 5, p. 582-587, 2003. Disponível em: < [https://jandonline.org/article/S0002-8223\(03\)00207-4/fulltext](https://jandonline.org/article/S0002-8223(03)00207-4/fulltext) >. Acesso em: 27 abr. 2020.

PINTADO, M. E.; SILVA, J. A. L.; FERNANDES, P. B.; MALCATA, F. X.; HOGG, T.A. Microbiological and rheological studies on Portuguese kefir grains. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 31, p. 15-26, 1996. Disponível em: < <https://ifst.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1365-2621.1996.16-316.x> >. Acesso em: 20 abr. 2020.

RODRIGUES, Kamila Leite et al. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 25, p.

404-408, 2005. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924857905000543>>. Acesso em: 16 nov. 2020.

SILVA KR, Rodrigues SA, Filho LX, Lima AS. Atividade antimicrobiana de caldos fermentados com grãos de kefir. **Appl Biochem Biotechnol** v. 152, p. 316-325, 2009. Acesso em: 13 nov. 2020.

WHESCHENFELDER, Simone; WLEST, José Maria; CARVALHO, Heloisa Helena Chaves. Atividade anti-*Escherichia coli* em kefir e soro de kefir tradicionais. **Rev. Ins. Lact. "Cândido Tostes**, n. 367/368, p. 48-55, mar/jun. 2009. Disponível em: <rilct.emnuvens.com.br/rilct/article/view/80/85>. Acesso em: 13 nov. 2020.