



UnB

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA – FCE/ UNB
CURSO DE FARMÁCIA

NATHÁLIA LORENA FREIRE DE SOUZA ALVES

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS DO KEFIR
DE ÁGUA VERSUS *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas aeruginosa***

BRASÍLIA, 2023

NATHÁLIA LORENA FREIRE DE SOUZA ALVES

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS DO KEFIR
DE ÁGUA VERSUS *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas aeruginosa***

Monografia de Conclusão de Curso
apresentado como requisito parcial para
obtenção do grau de Bacharel em
Farmácia, na Universidade de Brasília,
Faculdade de Ceilândia.

ORIENTADORA: Farmacêutica Especialista Carla Azevedo Bilac

COORIENTADORA: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi

BRASÍLIA, 2023

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Lorena Freire de Souza Alves, Nathalia
a Atividade antibacteriana dos microrganismos isolados do
kefir de água versus *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas*
aeruginosa / Nathalia Lorena Freire de Souza Alves;
orientador Carla Azevdo Bilac; co-orientador Daniela
Castilho Orsi. -- Brasília, 2023.
43 p.

Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade de
Brasília, 2023.

1. kefir. 2. antagonismo microbiano. 3. antibiose. 4. probióticos. 5. bebida fermentada. I. Azevdo Bilac, Carla, orient. II. Castilho Orsi, Daniela, co-orient. III. Titulo.

NATHÁLIA LORENA FREIRE DE SOUZA ALVES

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS DO KEFIR
DE ÁGUA VERSUS *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas aeruginosa***

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Farmacêutica Especialista Carla Azevedo Bilac
(FCE/ Universidade De Brasília)

Coorientadora: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi
(FCE/ Universidade De Brasília)

Orientadora: Farmacêutica Mestre Letícia Fernandes Silva Rodrigues
(FCE/ Universidade De Brasília)

Orientador: Prof. Mestre Daniel Oliveira Freire
(FCE/ Universidade De Brasília)

BRASÍLIA, 2023

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar a vida e ser a minha fonte de força, inspiração e sabedoria durante toda a realização deste trabalho. Por ser o meu porto seguro em cada etapa da vida. Sua graça e misericórdia foram fundamentais durante a minha jornada acadêmica.

Aos meus pais, Maria Ivanilde e Wilmar Alves que me ensinaram a importância do conhecimento e do esforço e me apoiaram em todas as escolhas que fiz durante a minha trajetória acadêmica. Seu exemplo de vida é minha inspiração e motivação para buscar sempre a excelência.

Aos meus irmãos, Daniel, Pedro e Marcos que me apoiaram e incentivaram a completar este trabalho e por todo o cuidado e preocupação. Também foram uma inspiração para percorrer essa caminhada em busca do melhor.

Ao meu namorado, Cristiano Ribeiro que me acompanhou em todas as fases deste trabalho. Sua paciência, compreensão e carinho foram fundamentais para que eu pudesse manter o equilíbrio emocional e concluir este trabalho.

Aos meus amigos, que proporcionaram momentos de alegria, conforto e torceram pela concretização deste trabalho. Agradeço por acreditar na minha capacidade e determinação em alcançar os meus objetivos.

A minha orientadora e coorientadora, Carla Bilac e Daniela Orsi que promoveram a oportunidade de grande aprendizado durante a elaboração deste trabalho. Em especial, a Carla por ser compreensiva, paciente, solícita e compartilhar as suas experiências comigo. Ambas são um exemplo de profissionais que desejo me tornar um dia.

À Universidade de Brasília, que me proporcionou as ferramentas necessárias para o desenvolvimento deste trabalho. Seu corpo docente e equipe administrativa foram essenciais para minha formação acadêmica e profissional.

Aos meus colegas de turma, que me ajudaram, ensinaram e incentivaram em todos esses anos de graduação. Obrigada por cada aprendizado e por compartilhar momentos de dor e alegria.

“Porque nele foram criadas todas as coisas que há nos céus e na terra, visíveis e invisíveis, sejam tronos, sejam dominações, sejam principados, sejam potestades. Tudo foi criado por ele e para ele”

(Colossenses 1:16)

RESUMO

O kefir de água é uma bebida efervescente e refrescante, resultante do processo de fermentação de grãos de kefir e xarope de sacarose. Os grãos abrigam uma cultura simbótica rica em bactérias lácticas, bactérias acéticas e leveduras. Devido a essa variedade microbiana, o kefir é amplamente reconhecido por suas propriedades nutricionais, funcionais e probióticas. O objetivo deste trabalho foi investigar a capacidade dos microrganismos isolados do kefir de água em inibir o crescimento das bactérias patogênicas *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Para a produção da bebida, grãos de kefir foram adicionados em solução de água acrescida de xarope de açúcar mascavo à 5°Brix e a fermentação ocorreu por 24 h. Após o processo de fermentação, os microrganismos foram isolados do kefir de água em meios de cultivo específicos. Do total de 86 microrganismos isolados do kefir de água, 44 isolados (51,2%) apresentaram halos de inibição contra *L. monocytogenes* e 48 isolados (55,8%) contra *P. aeruginosa*. Dos 24 microrganismos isolados do meio de cultivo ágar Hestrin-Schamm, 17 isolados (17/24, 70,83%) apresentaram halos de inibição contra *P. aeruginosa* (16,59 a 24,89 mm) e contra *L. monocytogenes* (7,47 a 21,46 mm). Dos 25 microrganismos isolados do ágar Yeast Malt, 17 isolados (17/25, 68,00%) apresentaram halos de inibição contra *P. aeruginosa* (12,9 a 26,4 mm) e contra *L. monocytogenes* (11,5 a 22,7 mm). Assim, no presente estudo, um número significativo de isolados do kefir de água apresentou atividade antimicrobiana sobre as bactérias patogênicas testadas, revelando um potencial efeito antimicrobiano dos microrganismos presentes no kefir de água. Em estudos futuros será testado a resistência dos microrganismos isolados do kefir de água contra ácidos, enzimas e bile, a fim de confirmar as suas propriedades probióticas. Esses dados podem enriquecer pesquisas futuras e fornecer evidências científicas acerca das propriedades probióticas do kefir de água.

Palavras-chave: kefir, antagonismo microbiano, antibiose, interferência bacteriana, bebida fermentada, probióticos.

ABSTRACT

Water kefir is an effervescent and refreshing drink, resulting from the fermentation process of kefir grains and sucrose syrup. The grains harbor a symbiotic culture rich in lactic acid bacteria, acetic bacteria, and yeast. Due to this microbial variety, kefir is widely recognized for its nutritional, functional and probiotic properties. The objective of this work was to investigate the ability of microorganisms isolated from water kefir to inhibit the growth of the pathogenic bacteria *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. To produce the drink, kefir grains were added to a water solution plus brown sugar syrup at 5°Brix and fermentation took place for 24 h. After the fermentation process, microorganisms were isolated from water kefir in specific culture media. Of the 24 microorganisms isolated from the Hestrin-Schamm agar culture medium, 17 isolates (17/24, 70.83%) showed inhibition halos against *P. aeruginosa* (16.59 to 24.89 mm) and against *L. monocytogenes* (7.47 to 21.46 mm). Of the 25 microorganisms isolated from Yeast Malt agar, 17 isolates (17/25, 68.00%) showed inhibition halos against *P. aeruginosa* (12.9 to 26.4 mm) and against *L. monocytogenes* (11.5 to 22.7 mm). Thus, in the present study, a significant number of water kefir isolates showed antimicrobial activity against the pathogenic bacteria tested, revealing a potential antimicrobial effect of the microorganisms present in water kefir. In future studies, the resistance of microorganisms isolated from water kefir against acids, enzymes and bile will be tested to confirm their probiotic properties. This data can enrich future research and provide scientific evidence about the probiotic properties of water kefir.

Keywords: kefir, microbial antagonism, antibiosis, bacterial interference fermented drink, probiotics.

LISTAS DE QUADROS

Quadro 1 – Microrganismos do kefir de água..... 19

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 - Kefir de água.....	25
Figura 2 - Atividade antagonista do isolado Y66 contra <i>Listeria monocytogenes</i>	27
Figura 3 - Atividade antagonista do isolado Y66 contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Apresentação dos microrganismos isolados do kefir de água em diferentes meios de cultura.....	28
Gráfico 2 - Análise comparativa da atividade inibitória dos isolados de kefir de água em diferentes meios de cultura sobre a <i>Listeria monocytogenes</i>	31
Gráfico 3 - Análise comparativa da atividade inibitória dos isolados de kefir de água em diferentes meios de cultura sobre a <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	32
Gráfico 4 - Análise comparativa da atividade inibitória dos isolados de kefir de água em diferentes meios de cultura sobre a <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 - Avaliação da capacidade antagonista dos microrganismos isolados do kefir de água contra <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30
Tabela 2 - Análise da atividade antagonista dos microrganismos isolados do kefir em diferentes meios de cultura contra <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	34

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	PROBIÓTICOS	14
2.2	KEFIR DE ÁGUA.....	15
2.3	COMPOSTOS ORGÂNICOS PRESENTES NO KEFIR DE ÁGUA	16
2.4	MICRORGANISMOS DO KEFIR DE ÁGUA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	18
2.5	RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA E A BUSCA POR ALTERNATIVAS	21
3	OBJETIVOS.....	23
3.1	OBJETIVO GERAL	23
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
4	JUSTIFICATIVA.....	24
5	MATERIAIS E MÉTODOS	25
5.1	OBTENÇÃO DOS GRÃOS DE KEFIR E DA BEBIDA FERMENTADA	25
5.2	ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS PRESENTES NO KEFIR DE ÁGUA	25
5.3	ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS DAS AMOSTRAS DE KEFIR (TESTE DE ANTAGONISMO <i>in vitro</i>)	26
5.3.1.	PREPARAÇÃO DAS BACTÉRIAS PATOGÊNICAS.....	26
5.3.2.	ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	26
5.4.	ESTATÍSTICA	27
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
6.1.	AVALIAÇÃO DO ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS PRESENTES NO KEFIR DE ÁGUA.....	28
6.2.	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS DO KEFIR DE ÁGUA.....	29
7.	CONCLUSÃO	36
	REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

O interesse de indivíduos por hábitos que visam promover o cuidado com a saúde e a qualidade de vida tem crescido ao longo dos anos. Um desses hábitos saudáveis é o consumo de bebidas fermentadas com propriedades probióticas. Os probióticos são microrganismos vivos capazes de equilibrar a saúde da microbiota e promover benefícios à saúde dos usuários (Anvisa, 2018). Além disso, os probióticos reduzem a colonização de bactérias patogênicas na microbiota através da competição e ativam o sistema imunológico e fortalecem as defesas do organismo (Ansari *et al.*, 2021).

O kefir de leite é uma bebida láctea fermentada que contém ácido láctico e lactobacilos vivos. Atualmente o kefir de leite tem sido amplamente estudado para obter evidências científicas que possam respaldar seu uso na indústria alimentícia como alimento probiótico (Lourenço, 2021). Como outra alternativa sem o uso do leite, temos o kefir de água que também apresenta atividade probiótica, e um sabor ligeiramente ácido e efervescente. Geralmente, essa bebida é produzida pela fermentação de uma solução de sacarose (podendo-se adicionar frutos secos ou frescos) pelos microrganismos contidos nos grãos de kefir (Pendón *et al.*, 2021).

Marques *et al.* (2020) investigaram a atividade antimicrobiana do kefir, demonstrando sua ação sobre a *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA). Esses efeitos antimicrobianos foram especialmente atribuídos aos compostos presentes no kefir como ácidos orgânicos e acetaldeído. Segundo Al-Mohammadi *et al.* (2021) os metabólitos como bacteriocinas, ácidos orgânicos e diacetil são responsáveis pelos efeitos antimicrobianos do kefir, exercendo uma ampla ação contra diversas espécies de bactérias patogênicas.

De acordo com Lynch *et al.* (2021), a produção do kefir de água tem sido predominantemente realizada de forma caseira, e até o momento do estudo não havia sido estabelecido um processo em nível industrial e nem o desenvolvimento de culturas iniciadoras. O consumo de kefir de água é mais habitual na América do Sul, Europa Oriental e Rússia. Com a crescente demanda dos consumidores por diversidade em produtos probióticos, o kefir de água em relação ao kefir de leite, tem potencial de expandir seu uso para um público mais amplo, incluindo os

veganos. Diante disso, o kefir de água é uma excelente opção de bebida probiótica sem ingredientes de origem animal (Açık *et al.*, 2020).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PROBIÓTICOS

Os alimentos, além de serem essenciais a nutrição humana, muitas vezes contém nutrientes que potencializam a saúde e o bem-estar humano (Banwo *et al.*, 2021). Dentre esses alimentos benéficos a saúde, destacam-se os alimentos enriquecidos com probióticos, capazes de melhorar a resposta imune através da elevação dos níveis de anticorpos e competir com bactérias patogênicas pela colonização do Trato Gastrointestinal (TGI). Isso promove a proliferação de bactérias benéficas no TGI que auxiliam na digestão e na funcionalidade intestinal (Reque; Brandelli, 2021).

O termo "probiótico" foi descrito pela primeira vez pelo russo Eli Metchnikoff, ganhador do Prêmio Nobel, que trabalhou no Instituto Pasteur no início do século passado. Ele relatou a interdependência entre a dieta e a microbiota intestinal e como os alimentos modificam a composição da microbiota em nossos corpos, substituindo microrganismos prejudiciais por aqueles que trazem benefícios (Metchnikoff, 1907).

O conceito de probióticos tem sido progressivamente aprimorado ao longo do tempo. De acordo com Fuller (1992), "probióticos são suplementos alimentares microbianos vivos que afetam benéficamente o animal hospedeiro, melhorando o equilíbrio microbiano". Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO, sigla do inglês Food and Agriculture Organization) os probióticos ao serem administrados trazem benefícios a saúde, impactando diretamente no equilíbrio microbiota intestinal (comunidade de microrganismos presente no TGI), além disso, a administração dos probióticos precisa ser em quantidade correta, para assegurar a eficácia e segurança do indivíduo (FAO/WHO, 2006).

Os principais microrganismos considerados probióticos são do gênero *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* e algumas espécies do gênero *Bacillus*, além das leveduras do gênero *Saccharomyces* (Satokari, 2019). Esses microrganismos, ao serem ingeridos, estabelecem uma interação positiva com a microbiota intestinal. É importante destacar que os microrganismos intestinais desempenham um papel extremamente importante na saúde do indivíduo

e qualquer desequilíbrio na proporção de bactérias e leveduras, pode resultar em distúrbios funcionais, conhecido como disbiose (Koh *et al.*, 2019).

Os probióticos têm demonstrado eficácia no tratamento de doenças gastrointestinais, especialmente nas diarreias. Além disso, há evidências de estimulação do sistema imunológico, redução nos níveis de colesterol e um potencial efeito anticancerígeno. Portanto, os probióticos apresentam um grande potencial como alternativas terapêuticas para promover a saúde intestinal e melhorar o bem-estar geral do indivíduo (Kechagia *et al.*, 2013).

Os alimentos probióticos são conhecidos como alimentos fermentados, uma vez que, os carboidratos presentes são fermentados pelos microrganismos presentes. Dentre os alimentos fermentados, existem uma variedade de alimentos considerados probióticos ou enriquecidos com probióticos como: iogurte, queijo, kombucha, kefir de leite e kefir de água (Cufaoglu; Erdinc, 2023).

2.2 KEFIR DE ÁGUA

O kefir de água é uma bebida refrescante e carbonada, produzida pelo processo de fermentação por bactérias e leveduras presentes nos grãos de kefir que são adicionados em uma solução adocicada. Geralmente, utiliza-se água com açúcar mascavo, preferencialmente orgânico, mas pode ser utilizado outros tipos de açúcares (cristal, demerara, coco). Por ser uma bebida muito versátil, os grãos de kefir fermentam diferentes substratos, e além da sacarose pode ser adicionado mel, melado, sucos, frutas secas ou frescas. Dessa forma, a adição de diferentes substratos, além de diversificar os sabores e aromas do kefir, pode aumentar a oferta de nutrientes e agradar os consumidores mais exigentes (Fiorda *et al.*, 2017; Lynch *et al.*, 2021; Péndon *et al.*, 2021).

A cultura inicial do kefir é conhecida como grãos de kefir, que são pequenas estruturas gelatinosas e translúcidas, que apresentam variações de cor (do amarelo-claro ao marrom), relacionadas ao substrato utilizado. A origem do kefir de água não é totalmente esclarecida, porém Ward (1892) associou os grãos de kefir de água com plantas de gengibre, que foram trazidas para a Europa Central após o fim da Guerra da Crimeia (1885). Posteriormente, eles foram definidos como "grãos de kefir açucarados" e "Tibi", para distingui-los dos grãos de kefir de leite (Moretti *et al.*, 2022).

O kefir de água apresenta variações no seu modo de preparo, o que concede características únicas a bebida. As proporções de grãos utilizados para a fermentação variam de 5 a 10% (p/v). Essa mudança influencia tanto as características organoléticas, quanto os compostos orgânicos produzidos pelos microrganismos durante a fermentação. O processo fermentação do kefir de água ocorre em temperaturas entre 20 e 37°C e o tempo pode variar de 24 a 96 horas (Calatayud *et al.*, 2021; Koh *et al.*, 2019; Maldonado *et al.*, 2020).

Os grãos de kefir de água desempenham uma importante função "inoculante" no processo de fermentação da bebida probiótica. A microbiota presente nos grãos de kefir possui uma atividade metabólica intensa, de tal forma que, quanto maior a quantidade de grãos, mais acelerado será o processo de fermentação do kefir de água (Laureys *et al.* 2021). O processo de fermentação do kefir de água é iniciado com hidrolise da sacarose, liberando glicose e frutose, sendo a glicose o substrato fundamental para a síntese dos metabólitos que conferem as características intrínsecas da bebida fermentada (Cufaoglu; Erdinc, 2023).

Os grãos do kefir de água são formados por uma matriz de exopolissacarídeos (EPS) de dextrano e levana, que são polímeros de carboidratos de alto peso molecular, insolúveis e conferem aos grãos uma forma irregular e variações estruturais. Esses polímeros de carboidratos são sintetizados pelos microrganismos presentes nos grãos durante a fermentação (Verce; Vuyst; Weckx, 2019). Dessa forma, a síntese de novos grãos atribui ao kefir de água uma característica peculiar, uma vez que esse processo permite o armazenamento dos grãos para sucessivas fermentações e a possibilidade de doação para consumidores que desejam cultivá-los em casa (Fiorda *et al.* 2017; Verce; Vuyst; Weckx).

2.3 COMPOSTOS ORGÂNICOS PRESENTES NO KEFIR DE ÁGUA

Os microrganismos presentes nos grãos de kefir além de serem responsáveis pela síntese dos grãos, produzem diversos metabólitos durante a fermentação. Os grãos do kefir de água são compostos por uma comunidade complexa simbótica, formada por Bactérias do Ácido Láctico (BAL), Bactérias do Ácido Acético (BAA) e leveduras. A microbiota do kefir utiliza os substratos disponíveis e sintetiza metabólitos como: ácidos orgânicos, ácido acético, ácido láctico, etanol e dióxido de carbono, que

representam os principais compostos identificados no kefir de água. Outros compostos como frutose, glicerol, manitol e compostos de aroma volátil também podem ser encontrados na bebida (Laureys; De Vuyst, 2014; Laureys; De Vuyst, 2016; Laureys *et al.*, 2018).

Segundo Prado *et al.* (2015), a origem do kefir determina a composição microbiana, assim como o substrato utilizado no processo de fermentação e os métodos de manutenção da cultura. Por exemplo, o kefir tibetano, usado na China, é composto por *Lactobacillus*, *Lactococcus* e leveduras, incluindo bactérias do ácido acético, dependendo da região da China. A diversidade microbiana está relacionada às características físico-químicas e atividades biológicas de cada tipo de kefir de água.

O ácido láctico, gerado pelas BAL, presente na microbiota do kefir de água, exerce várias funções, incluindo contribuição com o aroma, a hidrólise de proteínas, a produção de EPS e a inibição de bactérias patogênicas, conforme relatado por Wang *et al.* (2021). O manitol, um subproduto do metabolismo da frutose por bactérias lácticas, apresenta propriedades antioxidantes e um paladar ligeiramente adocicado (Laureys; De Vuyst, 2014; Laureys; De Vuyst, 2016; Laureys *et al.*, 2018).

O kefiran é um heteropolissacarídeo formado por glicose e galactose, produzido pela BAL *Lactobacillus kefiranofaciens*, que além de conferir viscosidade, proporciona elasticidade aos grãos de kefir de água. A produção e atividade dos EPS gerados variam de acordo com as condições e o processo de fermentação, tornando-os úteis para a indústria alimentícia como espessantes, estabilizantes, emulsificantes, substitutos de gordura e agentes gelificantes (Prado *et al.*, 2015). Além disso, as BAL, que incluem gêneros como *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc*, possuem a capacidade de sintetizar bacteriocinas, o que confere ao kefir de água uma atividade antimicrobiana eficaz (Wang *et al.*, 2021).

As leveduras são fungos unicelulares, e o principal gênero é a *Saccharomyces*, que exibem notável resiliência diante de condições adversas, como baixo pH e a presença de sais biliares. A extensa variedade de aplicações desses microrganismos decorre, principalmente, da sua capacidade fermentativa e do seu potencial probiótico. No kefir, a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, encontra-se em maior abundância nos grãos e desempenha um papel essencial no processo fermentativo (Lima *et al.*, 2017; Žymanczyk-Duda *et al.*, 2017).

As leveduras são capazes de sintetizar compostos que atuam como precursores dos aromas e sabores durante a fermentação. Adicionalmente, esses microrganismos metabolizam carboidratos, especialmente a glicose, que é convertida em álcool através do processo de fermentação alcoólica. Esse processo culmina na liberação de dióxido de carbono, conferindo à bebida uma agradável efervescência (Albergaria; Arneborg, 2016; Menezes *et al.*, 2020)

As bactérias acéticas presentes no kefir de água, são predominantemente dos gêneros *Acetobacter* spp. e *Gluconobacter* spp., e atribuem ao kefir de água um teor acético e características sensoriais peculiares. Estes microrganismos utilizam o álcool produzido pelas leveduras, convertendo-o em ácido acético. Embora este composto confira um aroma não agradável ao paladar, é importante notar, que o ácido acético possui forte atividade inibitória contra bactérias patogênicas (Egea *et al.*, 2020; Gomes; Duarte; Schwan, 2018; Moretti *et al.*, 2022).

É notável que o kefir de água se destaca como uma abundante fonte de probióticos que podem desempenhar um papel chave na regulação da saúde intestinal. A presença de microrganismos vivos nessa bebida pode proporcionar uma variedade de benefícios à saúde, entre eles, as ações anti-inflamatórias, protetoras gástricas, anti-hiperglicêmicas e anti-hiperlipidêmicas. Tais benefícios são provenientes, não somente da composição microbiana inerente do kefir, mas também das substâncias bioativas presentes na bebida, como o kefiran (Calatayud *et al.*, 2021; Egea *et al.*, 2020). Adicionalmente, as leveduras que compõem o kefir de água exercem um papel relevante na prevenção de desordens intestinais, reforçando ainda mais seu potencial benéfico à saúde (Cai *et al.*, 2020).

2.4 MICRORGANISMOS DO KEFIR DE ÁGUA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O kefir de água é uma ótima opção probiótica devido à sua microbiota diversificada, composta por BAL, BAA e leveduras (Quadro 1). As bactérias predominantes do ácido láctico são *Lactobacillus* spp., as bactérias predominantes do ácido acético são *Acetobacter* e *Oenococcus*, enquanto as principais leveduras são *Saccharomyces* e *Dekkera*. O sequenciamento metagenômico "Shotgun" tem sido amplamente utilizado para investigar a composição microbiana do kefir de água (Cai;

Zhang; Chen *et al.*, 2020; Laureys; De Vuyst, 2014; Laureys; De Vuyst, 2016; Lauryes *et al.*, 2018; Verce; Vuyst; Weckx, 2019).

Quadro 1 – Microrganismos do kefir de água

BAL	BAA	Leveduras
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Acetobacter fabarum</i>	<i>Candida boidinii</i>
<i>Lactobacillus harbinensis</i>	<i>Acetobacter indonesiensis</i>	<i>Candida smithsonii</i>
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	<i>Acetobacter lovaniensis</i>	<i>Dekkera anômala</i>
<i>Lactobacillus hordeie</i>	<i>Acetobacter okinawensis</i>	<i>Dekkera bruxellensis</i>
<i>Lactobacillus mali</i>	<i>Acetobacter orientalis</i>	<i>Pichia membranifaciens</i>
<i>Lactobacillus nagelii</i>	<i>Acetobacter tropicalis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Gluconobacter cerinus</i>	<i>Wickerhamomyces anomalous</i>
<i>Lactococcus garvieae</i>	<i>Gluconobacter hansenii</i>	<i>Zygorularaspora florentina</i>
<i>Lactobacillus satsumensis</i>	<i>Gluconobacter exseass</i>	
<i>Lactobacillus zeae</i>		
<i>Lactobacillus zeae</i>		
<i>Bifidobacterium aquikefiri</i>		
<i>Bifidobacterium crudilactis</i>		
<i>Bifidobacterium pyschroaerophilum</i>		
<i>Candidatus Oenococcus aquikefiri</i>		
<i>Oenococcus kitaharae</i>		
<i>Oenococcus oeni</i>		

Fontes: (Kmar *et al.*, 2021; Laureys; De Vuyst, 2016; Laureys *et al.*, 2018; Laureys *et al.*, 2021 Tan *et al.*, 2022; Verce; De Vuyst; Weckx, 2019; Verce; De Vuyst; Weckx, 2020; Zanirati *et al.*, 2015).

Entre os metabólitos produzidos durante o processo de fermentação pelo kefir, os ácidos orgânicos se destacam por sua capacidade de inibir o crescimento de uma ampla gama de microrganismos, incluindo bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, leveduras e fungos. Esses ácidos causam danos diretos à membrana celular desses microrganismos (González-Orozco *et al.*, 2023; Serventi *et al.*, 2020).

Um dos efeitos marcantes dos ácidos orgânicos é a redução do pH da bebida, que se torna um fator limitante para o crescimento de cepas patogênicas. Além dos ácidos orgânicos, outros compostos gerados durante a fermentação do kefir, como o peróxido de hidrogênio e as bacteriocinas, também contribuem para suas propriedades antimicrobianas. O peróxido de hidrogênio, por exemplo, possui propriedades bactericidas, enquanto o diacetil exibe ação eficaz contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Ibrahim; Sugimoto; Sakamoto *et al.*, 2021).

As bacteriocinas são peptídeos sintetizados e secretados pelas BAL durante a fermentação. Esses peptídeos apresentam atividade antimicrobiana, pois conseguem inibir o crescimento de bactérias patogênicas. Dessa forma é possível regular a população de bactérias no meio, evitando que algumas bactérias com potencial patogênico crie uma superpopulação. A capacidade das bacteriocinas de controlar os

biofilmes produzidos por bactérias patogênicas é um fator promissor da atividade antibacteriana do kefir de água (Darbandi *et al.*, 2022; Kranjec *et al.*, 2020; Mgomi *et al.*, 2023; Thi *et al.*, 2020).

As BAL, particularmente os *Lactococcus* presentes no kefir, produzem bacteriocinas, como a lactocicina. Essas bacteriocinas são conhecidas por inibir a síntese de peptideoglicanos, componentes essenciais da parede celular bacteriana. Outra bacteriocina notável produzida é a nisina, que atua formando poros na membrana plasmática das bactérias (Ghapanvari *et al.*, 2022; Ibrahim *et al.*, 2021; Petrova *et al.*, 2021).

Por meio dos mecanismos de ação dessas moléculas, o kefir de água demonstra efeitos inibitórios no crescimento de patógenos que afetam a mucosa intestinal, como *Salmonella typhimurium*, *E. coli* e *Staphylococcus aureus*, bem como fungos, incluindo *Aspergillus flavus* e *Rhizopus spp*. A bebida também se mostrou eficaz contra outros microrganismos, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Candida albicans* e *Shigella sonnei* (Kim *et al.*, 2016; Pendón *et al.*, 2021).

Atualmente, estão em andamento estudos sobre a produção industrial de bacteriocinas. O objetivo é reduzir os conservantes sintéticos por conservantes naturais, uma alternativa considerada mais segura tanto para os seres humanos quanto para o meio ambiente (Bdssolo *et al.*, 2022; González-Orozco *et al.*, 2023).

É fundamental destacar que a diversidade microbiológica do kefir de água contribui de maneira significativa para a capacidade do produto fermentado de proporcionar benefícios à saúde. Assim, a introdução do kefir de água na indústria alimentícia surge como uma alternativa potencial na redução de conservantes artificiais (Egea *et al.*, 2021; Ibrahim *et al.*, 2021). Apesar disso, ainda são necessários estudos *in vitro* e *in vivo* para confirmar os benefícios proporcionados por esta bebida. Além disso, é importante aprimorar o processo de fabricação do kefir de água e aumentar o controle de qualidade do produto fermentado (Cufaoglu; Erdinc 2023; Moretti *et al.*, 2022).

2.5 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA E A BUSCA POR ALTERNATIVAS

A resistência antimicrobiana (RAM), de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), refere-se à incapacidade de os antibióticos tratar efetivamente infecções causadas por microrganismos que anteriormente eram suscetíveis, devido a mudanças naturais que os tornaram resistentes ao tratamento (WHO, 2019). O uso excessivo de antibióticos é o principal fator que contribui para a disseminação da RAM, pois amplifica os processos naturais de resistência, seja através da ativação de genes ou mutações no DNA durante a replicação, ou por transferência de DNA (Ben *et al.*, 2018; Mancuso *et al.*, 2021).

Listeria monocytogenes é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia facultativa e causadora de infecções gastrointestinais. É responsável pela listeriose infecciosa com altas taxas de mortalidade. Os principais meios de transmissão são o leite e seus derivados. É um patógeno de caráter oportunista e as populações mais suscetíveis às infecções são os indivíduos imunocomprometidos, idosos, recém-nascidos e mulheres grávidas, frequentemente, pode causar meningite. Dentre os principais fatores de virulência estão a capacidade de sintetizar biofilmes, a mobilidade intracelular via polimerização de actina e a capacidade de replicação em temperaturas de geladeira (Quereda *et al.*, 2021; Rogalla *et al.*, 2023).

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria Gram-negativa e um dos agentes causadores de infecções nosocomiais. Em ambientes hospitalares, apresenta alta mortalidade em pacientes imunocomprometidos, como pacientes com câncer, pós-operatório, queimaduras graves, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), fibrose cística (FC) ou infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). Sendo um patógeno oportunista flexível, possui fatores de virulência e determinantes da resistência aos antibióticos presentes em seus genes, com destaque para a capacidade de formar biofilme, o que mostra a sua adaptação a diversas condições externas e potencializa a sua resistência aos antibióticos (Chegini *et al.*, 2020; Pang *et al.*, 2019; Thi *et al.*, 2020; Wilson, Pandey, 2023).

Os probióticos têm ganhado popularidade nos últimos anos devido às suas atividades antagonistas e à síntese de moléculas antimicrobianas, como ácidos orgânicos, bacteriocinas e aminas (Gamba *et al.*, 2019; Helmy *et al.*, 2023; Marques *et al.*, 2020; Prado *et al.*, 2015). Al-Mohammadi *et al.* (2021) observaram que cepas

extraídas do kefir de água inibiram o crescimento de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium*, bem como algumas cepas fúngicas, como *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger*. Assim, o uso do kefir de água como agente antimicrobiano natural é uma alternativa interessante e viável para abordar a questão da RAM.

Portanto, é crucial explorar e desenvolver alternativas aos antibióticos, o kefir de água pode ser utilizado como um alimento paliativo. No entanto, os desafios envolvem fatores como obter um espectro de ação específico, evitar efeitos adversos significativos, determinar o método de desenvolvimento com base em eficácia, relação custo-efetividade, segurança para a saúde humana e flexibilidade de tratamento (Lojewska; Sakowicz, 2021).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi investigar a capacidade dos microrganismos isolados do kefir de água em inibir o crescimento das bactérias patogênicas *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas aeruginosa*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar os microrganismos presentes na bebida e nos grãos do kefir de água;
- Avaliar o efeito inibitório dos microrganismos purificados a partir do kefir frente as bactérias *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas aeruginosa*.

4 JUSTIFICATIVA

Atualmente há uma crescente preocupação com a resistência bacteriana e fúngica aos medicamentos convencionais utilizados no combate das infecções. A busca por novos tratamentos tem se tornado um problema complexo e com implicações significativas na saúde pública. Nesse contexto, explorar a capacidade inibitória dos microrganismos do kefir de água frente a bactérias como *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas aeruginosa* é especialmente relevante diante do desafio global representado pela resistência aos antimicrobianos.

Identificar os isolados que apresentam atividade antagonista pode contribuir com pesquisas futuras, além de fornecer evidências científicas sobre as propriedades probióticas do kefir. Além de, permitir que novos compostos antimicrobianos ou novas estratégias terapêuticas sejam desenvolvidas contra microrganismos patogênicos resistentes. Essa abordagem tem o potencial de contribuir significativamente com o desenvolvimento de novas opções de tratamento mais sustentáveis e promissoras no combate às infecções.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 OBTENÇÃO DOS GRÃOS DE KEFIR E DA BEBIDA FERMENTADA

Os grãos de kefir foram doados por pessoas que mantêm culturas artesanais em casa. Para a produção do kefir de água, os grãos na proporção de 10% (p/v) foram inoculados em água potável acrescida de açúcar mascavo até a leitura de 5ºBrix, e a fermentação ocorreu por 24 h, em temperatura ambiente (Figura 1). Após a fermentação, a bebida e os grãos foram analisados quanto a composição microbiológica.

Figura 1 - Kefir de água.



Fonte: elaboração própria (2023).

5.2 ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS PRESENTES NO KEFIR DE ÁGUA

Foram utilizados meios de cultura específicos para o isolamento dos microrganismos presentes no kefir de água. Para bactérias lácticas foram utilizados o meio ágar All Purpose Tween (APT), ágar Man, Rogosa and Sharpe (MRS) e ágar M17. Quanto ao isolamento de bactérias acéticas o meio utilizado foi o ágar Hestrin-Schamm (HS) e para as leveduras o meio foi o ágar Yeast Malt (YM).

O isolamento dos microrganismos foi obtido através de diluições seriadas ($10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}$). Para a diluição de 10^{-1} , 10 g de grãos de kefir foram transferidos para um recipiente estéril, adicionando a bebida fermentada até alcançar 25 mL. A

amostra foi então diluída em 225 mL de água destilada com peptona a 0,1% (p/v) estéril, e partindo dessa primeira diluição obteve-se as demais diluições seriadas. Alíquotas de 100 µL das diluições foram pipetadas em placas de Petri contendo os meios de cultivo (APT, MRS, M17, HS e YM), e com o auxílio de alças de Drigalski estéreis, as alíquotas foram espalhadas sobre a superfície do ágar. As placas foram incubadas em condições de aerobiose e anaerobiose em estufa a 32°C por 24 a 48 horas (APT, MRS e M17) e por 72 horas (HS e YM).

Após incubação, o isolamento dos microrganismos foi realizado com o auxílio do estereoscópio Leica modelo M-125C, que facilita a observação das estruturas das colônias e permite distinguir diferenças morfológicas. Após a purificação, os microrganismos foram novamente semeados, em tubo inclinados previamente preparados contendo os mesmos meios de cultura de origem. Os microrganismos isolados foram utilizados para os testes de antagonismo.

5.3 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS DAS AMOSTRAS DE KEFIR (TESTE DE ANTAGONISMO IN VITRO)

5.3.1. PREPARAÇÃO DAS BACTÉRIAS PATOGÊNICAS

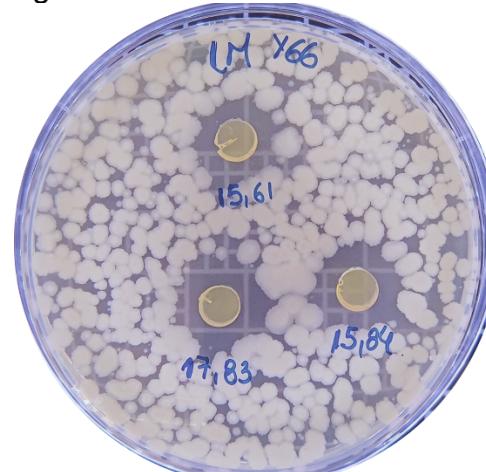
Foram utilizadas as cepas de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 semeadas em ágar Mueller-Hinton. Os inóculos foram preparados por meio de suspensão direta do crescimento microbiano em caldo Luria Bertani com turvação equivalente a 0,5 da escala de Mc Farland ($1,0 \times 10^8$ UFC/mL).

5.3.2. ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A semeadura das bactérias patogênicas foi realizada no meio ágar YM, utilizando um swab estéril. Em seguida, discos de ágar de 5 mm contendo as bactérias isoladas do kefir de água foram colocadas sobre as placas de ágar YM previamente semeadas com *L. monocytogenes* ou *P. aeruginosa*. Após 24 horas de incubação a 37°C, os halos de inibição do crescimento de *L. monocytogenes* e *P. aeruginosa* foram

registrados. Os ensaios foram executados em triplicata e os resultados expressos como média em milímetros de diâmetro (Figuras 2 e 3).

Figura 2 - Atividade antagonista do isolado Y66 sobre a *Listeria monocytogenes*.



Fonte: elaboração própria (2023).

Figura 3 – Atividade antagonista do isolado Y66 sobre a *Pseudomonas aeruginosa*.



Fonte: elaboração própria (2023).

5.4. ESTATÍSTICA

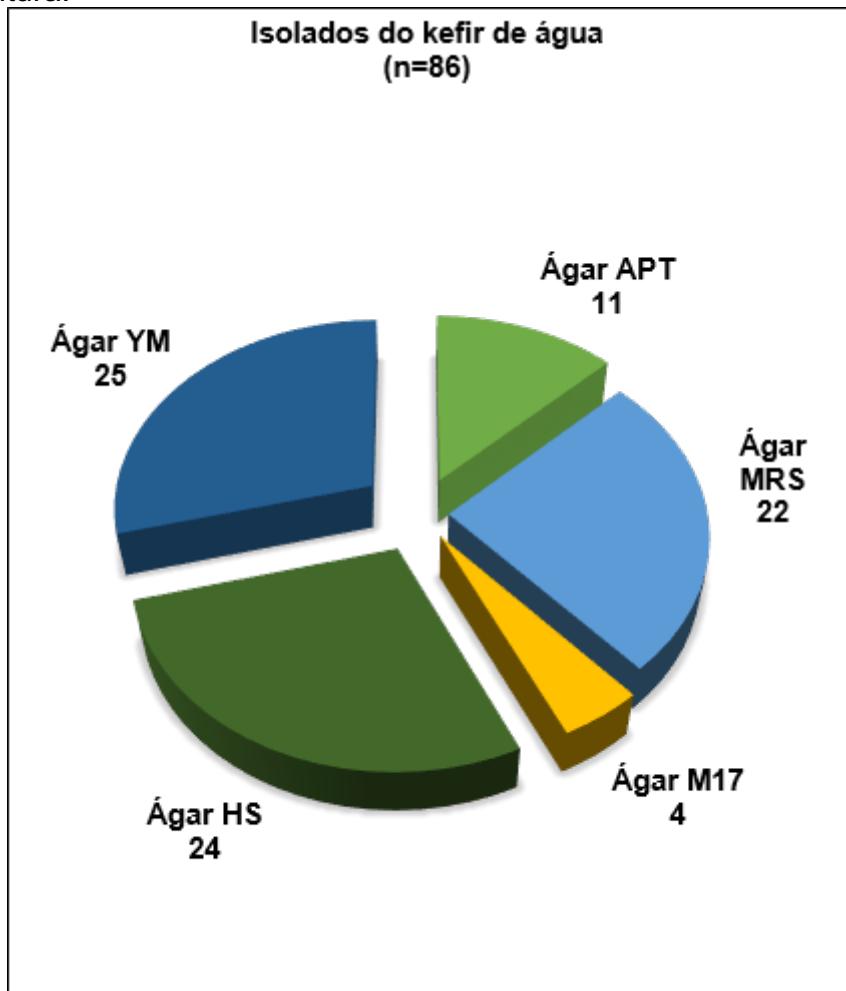
As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos através dos valores da média e desvio padrão.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. AVALIAÇÃO DO ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS PRESENTES NO KEFIR DE ÁGUA

Foram isolados 86 microrganismos do kefir de água (Gráfico 1). O meio ágar YM apresentou 25 isolados (29,06%), seguido pelo ágar HS com 24 isolados (26,96%) e pelo ágar MRS com 22 isolados (24,72%).

Gráfico 1 - Apresentação dos microrganismos isolados do kefir de água em diferentes meios de cultura.



Fonte: elaboração própria. Ágar All Purpose Tween (APT). MRS, Ágar Man, Rogoso and Sharpe. HS, Ágar Hestrin-Schamma. YM, Ágar Yeast Malt.

A variedade dos meios de cultura utilizados permitiu que o isolamento do kefir de água resultasse em uma diversidade de microrganismos, tais como BAL, BAA e leveduras. Os meios APT e MRS, geralmente, são utilizados para o isolamento de

BAL. Porém, os meios de cultivos utilizados não são totalmente seletivos para microrganismos específicos, possibilitando o crescimento de diversos microrganismos, como as leveduras, BAL, BAA e até mesmo bactérias patogênicas.

No estudo de Verce *et al.* (2019), o sequenciamento metagenômico do kefir de água revelou que os principais gêneros de BAL presentes foram *Lactobacillus*, *Oenococcus* e *Bifidobacterium* e os principais gêneros de leveduras foram *Saccharomyces* e *Dekkera*.

Serventi *et al* (2020) afirmaram que as BAL foram os principais isolados do kefir água e pertenciam principalmente ao gênero *Lactobacillus* spp. Os lactobacilos podem ser usados como probióticos, pois têm a habilidade de modular o sistema imune e inibir o crescimento de agentes patogênicos. De acordo com Wang *et al.* (2021), as BAL possuem a capacidade de sintetizar bacteriocinas, o que garante ao kefir de água uma atividade antimicrobiana benéfica.

As leveduras, comumente, são isoladas através do ágar YM e são microrganismos fundamentais para o processo fermentativo, conferindo a efervescência característica do kefir de água (Lima *et al.*, 2017; Żymanczyk-Duda *et al.*, 2017). Laureys *et al.* (2021), através da microscopia eletrônica de varredura observaram que os grãos de kefir de água são cobertos por leveduras e BAL, e foram encontrados muitos consórcios mistos entre BAL e leveduras, e, identificaram em abundância as seguintes espécies de leveduras: *Saccharomyces cerevisiae* e *Dekkera bruxellensis*.

Para o isolamento de bactérias acéticas utilizou-se o ágar HS. As BAA são microrganismos menos prevalentes no processo de fermentação do kefir de água, além disso, espécies como *Acetobacter fabarum* são minoria na microbiota do kefir de água (Laureys *et al.*, 2021; Verce *et al.*, 2019).

O ágar M17, obteve o menor número de isolados, uma vez que é aplicado com a intenção de isolar bactérias do ácido lático, especificamente *Lactococcus lactis* (Taye *et al.*, 2021).

6.2. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS DO KEFIR DE ÁGUA

A capacidade antagonista dos microrganismos isolados do kefir de água está apresentada na Tabela 1. Durante o teste da atividade antimicrobiana, observou-se que dentre os 86 isolados do kefir de água, 49 isolados (57,0%) produziram resultados positivos, sendo que 48 isolados (55,8%) apresentaram halos de inibição contra *P. aeruginosa* (11,34-26,87 mm) e 44 isolados (51,2%) apresentaram halos de inibição contra *L. monocytogenes* (7,47-22,74 mm).

Tabela 1 - Avaliação da capacidade antagonista dos microrganismos isolados do kefir de água sobre a *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas aeruginosa*

Isolado (N=49)	Meio	Halos de inibição (mm)		Isolado (N=49)	Meio	Halos de inibição (mm)	
		<i>P. aeruginosa</i> (n=48)	<i>L.monocytogenes</i> (n=44)			<i>P. aeruginosa</i> (n=48)	<i>L.monocytogenes</i> (n=44)
1	H	26,87 (3,07)	16,07 (1,01)	25	A	19,65 (2,05)	17,84 (0,11)
2	Y	26,39 (1,86)	15,58 (1,25)	26	H	19,63 (0,40)	12,84 (1,25)
3	Y	25,20 (2,72)	15,55 (1,28)	27	H	19,39 (2,97)	15,48 (3,01)
4	H	24,89 (0,41)	20,57 (1,17)	28	Y	19,36 (1,60)	12,47 (2,24)
5	Y	24,02 (5,24)	14,19 (1,36)	29	Y	18,47 (1,25)	16,43 (1,22)
6	H	23,94 (0,78)	21,46 (2,98)	30	A	18,43 (0,63)	10,93 (0,92)
7	H	23,01 (1,55)	17,70 (0,62)	31	H	18,37 (0,23)	15,50 (0,87)
8	H	22,87 (1,42)	15,72 (0,19)	32	Y	18,27 (0,75)	14,33 (0,75)
9	Y	22,80 (0,79)	22,74 (1,93)	33	Y	18,12 (1,04)	20,78 (0,85)
10	A	22,57 (1,70)	10,75 (0,76)	34	Y	17,95 (1,95)	16,03 (0,45)
11	H	21,68 (0,42)	19,70 (2,03)	35	Y	17,86 (0,57)	21,03 (0,68)
12	R	21,23 (0,17)	17,51 (0,39)	36	Y	17,72 (1,62)	21,30 (1,40)
13	A	21,16 (1,91)	17,01 (5,76)	37	Y	17,54 (0,47)	20,42 (1,68)
14	H	21,12 (0,22)	15,91 (0,73)	38	H	16,59 (0,48)	12,31 (0,25)
15	H	21,07 (1,00)	15,93 (0,58)	39	R	15,50 (0,75)	N/A
16	R	21,04 (1,75)	17,66 (1,56)	40	R	14,50 (4,56)	N/A
17	H	21,04 (1,41)	12,00 (0,61)	41	Y	14,40 (2,16)	11,45 (1,26)
18	Y	21,02 (0,31)	14,18 (4,46)	42	Y	14,36 (0,88)	13,91 (0,17)
19	H	20,84 (0,30)	18,44 (0,20)	43	M	14,28 (0,26)	N/A
20	H	20,72 (2,34)	7,47 (6,47)	44	M	13,61 (0,79)	N/A
21	H	20,53 (0,67)	16,68 (0,31)	45	Y	12,90 (0,63)	15,19 (0,41)
22	H	20,28 (0,68)	16,60 (3,23)	46	A	11,97 (0,74)	11,93 (1,28)
23	A	20,27 (1,56)	16,52 (0,78)	47	R	11,34 (0,37)	N/A
24	Y	19,97 (0,19)	21,58 (1,42)	48	H	N/A	16,51 (0,86)
25	A	19,80 (1,03)	16,97 (1,55)				

Fonte: Elaboração própria. (N) total de microrganismos isolados. (n) total de microrganismos com atividade inibitória. N/A = não houve halo de inibição. Análise realizada em triplicata e valores expressos em Média (Desvio Padrão) dos halos de inibição medidos em milímetro (mm).

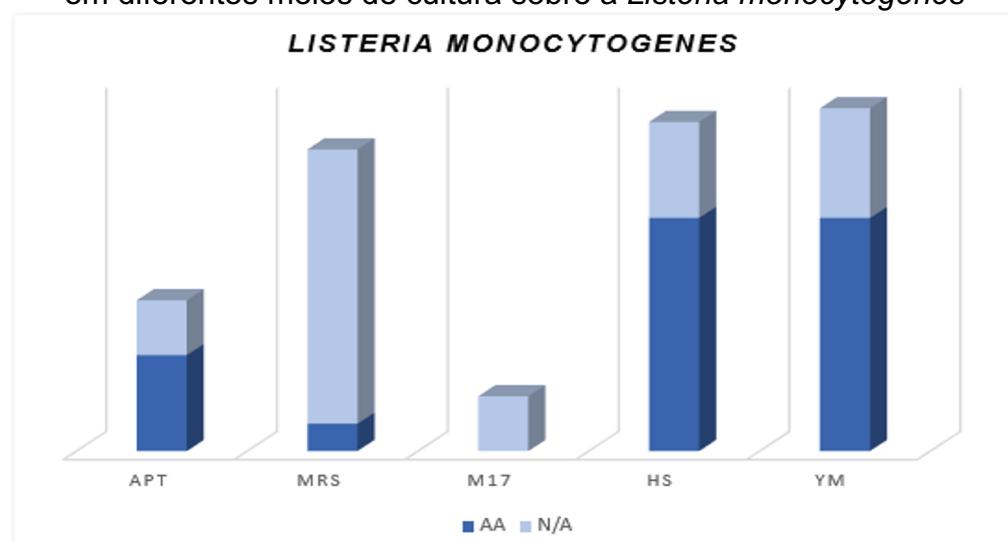
A bactéria *L. monocytogenes* apresentou menores halos de inibição que *P. aeruginosa*, embora tenha apresentado alguns halos significativos (igual ou superior a 20 mm). Outro ponto de relevância é que a maioria dos isolados do kefir de água foram positivos tanto para *P. aeruginosa* quanto para *L. monocytogenes*.

Thi *et al.* (2020) ressaltam que a formação do biofilme é um importante fator de virulência das bactérias patogênicas, e, apresentaram estratégias terapêuticas que visam atingir o biofilme. Dentre as estratégias, estão os produtos naturais e o kefir de água está entre as bebidas naturais e probióticas com capacidade antimicrobiana. Os microrganismos presentes no kefir de água como as BAL produzem bacteriocinas, as quais podem ser usadas como agentes antibiofilme.

As bacteriocinas controlam a formação dos biofilmes das bactérias patogênicas e agem diretamente na membrana plasmática bacteriana, afetando a superfície da célula e produzindo poros, levando a morte celular (Darbandi *et al.*, 2022; Ghapanvari *et al.*, 2022; Kranjec *et al.*, 2020; Mgomi *et al.*, 2023).

A análise comparativa entre a capacidade inibitória dos microrganismos isolados do kefir de água e os meios utilizados para o isolamento pode ser visualizada nos gráficos a seguir. Os meios de cultivo HS e YM exibiram os maiores números de isolados do kefir de água que obtiveram atividade antagonista sobre a *Listeria monocytogenes* (Gráfico 2).

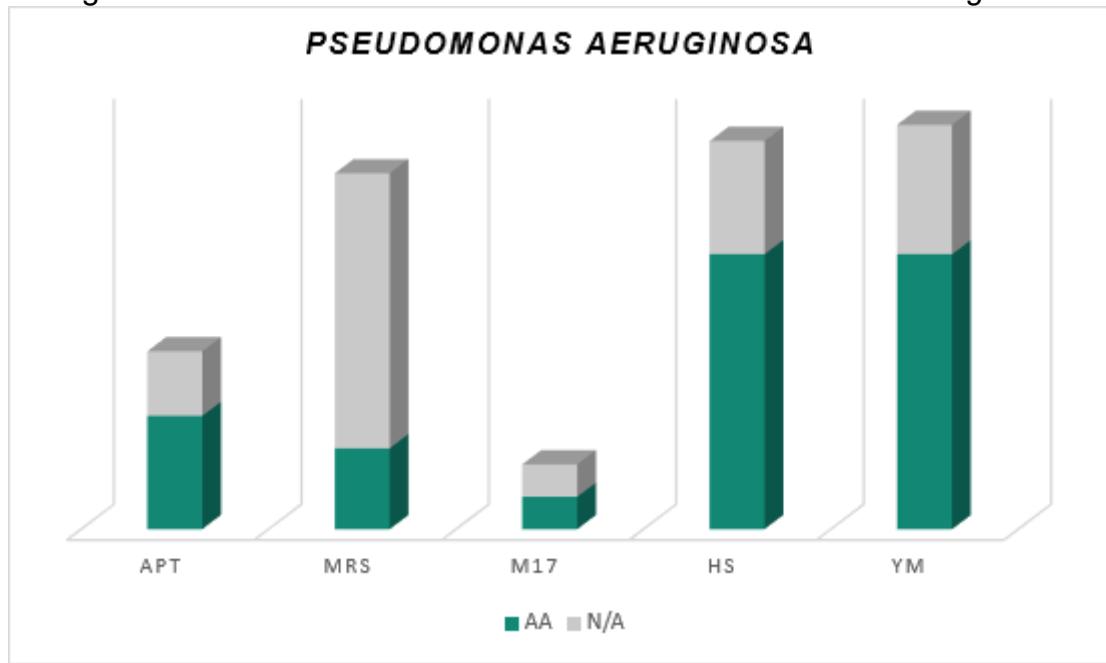
Gráfico 2 - Análise comparativa da atividade inibitória dos isolados de kefir de água em diferentes meios de cultura sobre a *Listeria monocytogenes*



Fonte: elaboração própria. Ágar All Purpose Tween (APT). MRS, Ágar Man, Rogoso and Sharpe. HS, Ágar Hestrin-Schamma. YM, Ágar Yeast Malt. AA, Atividade Antagonista. N/A, Não houve atividade antagonista.

O Gráfico 3, apresenta resultados semelhantes para a *Pseudomonas aeruginosa*, sendo os meios de cultivo HS e YM com maior atividade antagonista.

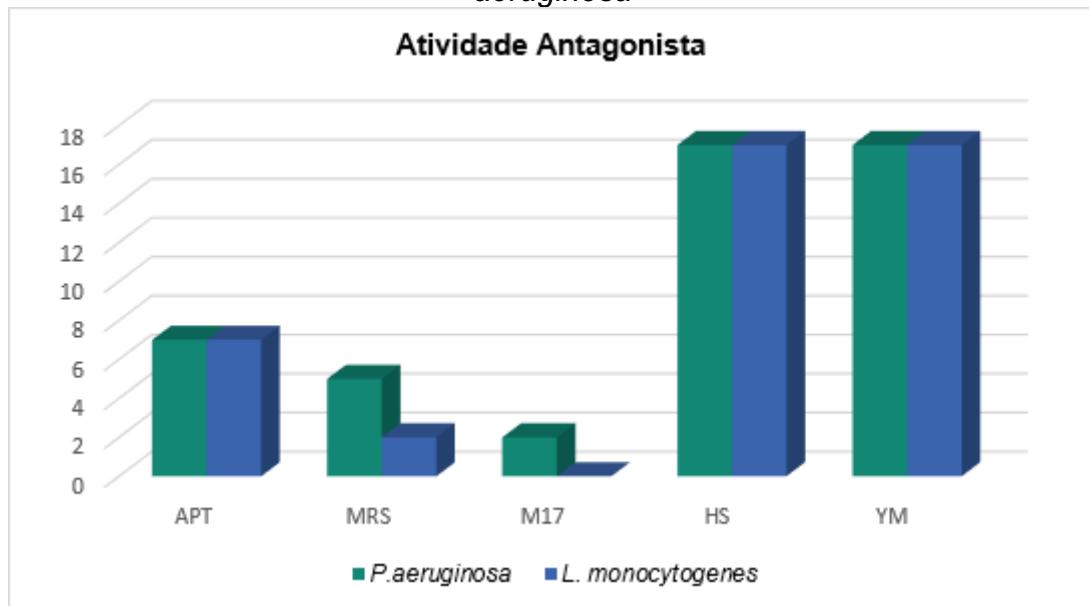
Gráfico 3 - Análise comparativa da atividade inibitória dos isolados de kefir de água em diferentes meios de cultura sobre a *Pseudomonas aeruginosa*



Fonte: elaboração própria. Ágar All Purpose Tween (APT). MRS, Ágar Man, Rogoso and Sharpe. HS, Ágar Hestrin-Schamma. YM, Ágar Yeast Malt. AA, Atividade Antagonista. N/A, Não houve atividade antagonista.

Com base na verificação do Gráfico 4, o número de isolados do kefir de água nos meios YM (17/25, 68,00%) e HS (17/24, 70,83%) que tiveram atividade antagonista foram semelhantes, sendo 17 isolados com atividade antagonista sobre *L. monocytogenes* e sobre *P. aeruginosa*. No meio APT foram 7 isolados (7/11, 63,63%) que apresentaram atividade antagonista sobre a *L. monocytogenes* e sobre *P. aeruginosa*.

Gráfico 4 - Análise comparativa da atividade inibitória dos isolados de kefir de água em diferentes meios de cultura sobre a *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas aeruginosa*



Fonte: elaboração própria. Ágar All Purpose Tween (APT). MRS, Ágar Man, Rogoso and Sharpe. HS, Ágar Hestrin-Schamma. YM, Ágar Yeast Malt.

No meio MRS, 5 isolados (5/22, 22,72%) exibiram atividade antagonista contra *P. aeruginosa* e somente 2 isolados (2/22, 9,09%) contra *L. monocytogenes*. Assim, o meio de cultivo que obteve o maior número de isolados do kefir de água sem atividade antagonista foi o MRS. A *L. monocytogenes* não foi inibida ao entrar em contato com 20 isolados do meio MRS, da mesma forma que não ocorreu atividade antagonista de 17 isolados do meio MRS contra *P. aeruginosa*.

Por fim, o meio com menor número de isolados foi o M17, apresentando apenas 2 isolados (2/5, 40%) contra *P. aeruginosa* e não tendo atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes*. Outro ponto a ser destacado é que os meios de cultura não influenciaram na atividade antagonista realizada pelos microrganismos isolados do kefir de água.

A análise da atividade antagonista dos isolados do kefir de água de diferentes meios de cultura contra *P. aeruginosa* e *L. monocytogenes* estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2 - Análise da atividade antagonista dos microrganismos isolados do kefir em diferentes meios de cultura sobre a *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas aeruginosa*

Meios	Isolados (N=89)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Listeria monocytogenes</i>	
		atividade antagonista (n=48)	halos de inibição (mm)	atividade antagonista (n=44)	halos de inibição (mm)
Ágar APT	11 (12,8%)	7 (63,6%)	12±0,7 a 22,6±1,7	7 (63,6%)	10,8±0,8 a 17,8±0,1
Ágar MRS	22 (25,6%)	5 (22,7%)	11,3±0,4 a 21,2±0,2	2 (9,1%)	17,5±0,4 a 17,7±1,6
Ágar M17	4 (4,7%)	2 (50%)	13,6±0,8 a 14,3±0,3	0 (0%)	0±0 a 0±0
Ágar HS	24 (27,9%)	17 (70,8%)	16,6±0,5 a 26,9±3,1	17 (70,8%)	11,3±0,2 a 21,5±3
Ágar YM	25 (29,1%)	17 (68%)	12,9±0,6 a 26,4±1,9	17 (68%)	11,5±1,3 a 22,7±1,9

Fonte: elaboração própria. Ágar All Purpose Tween (APT). MRS, Ágar Man, Rogosa and Sharpe. HS, Ágar Hestrin-Schamm. YM, Ágar Yeast Malt. ATCC, American Type Culture Collection. (N) total de microrganismos isolados (n) quantidade de microrganismos isolados. (mm) = milímetro.

A atividade antagonista obteve melhor resultados nos microrganismos isolados do ágar HS contra *P. aeruginosa* (17/24, 70,8%) e teve o microrganismo que apresentou o maior halo de inibição de 26,9 mm. Em seguida, os microrganismos isolados do ágar YM tiveram uma atividade antagonista de 68% (17/25) contra *L. monocytogenes*, com um microrganismo exibindo um halo de inibição de 22,9 mm.

No meio de cultivo MRS, embora o número de isolados tenha sido elevado, 22 (25,6%), a atividade antagonista foi inferior, sendo 5 isolados (22,7%) contra *P. aeruginosa* e 2 isolados (9,1%) contra *L. monocytogenes*, porém apresentando halos de inibição consideráveis que variaram de 17,5 mm a 21,2 mm.

Okafor et al. (2023) fizeram o teste de susceptibilidade a antibióticos em 81 isolados da *P. aeruginosa*, retirados de amostra de efluentes hospitalares, utilizando a técnica de difusão de Kirby-Bauer. Os carbapenêmicos apresentaram alta resistência e são utilizados como última escolha para o tratamento da *P. aeruginosa*. Por outro lado, conforme Shatri et al., 2023, as polimixinas são a primeira escolha no tratamento de infecções sistêmicas causadas por cepas suscetíveis de bactérias multirresistentes, como a *P. aeruginosa*.

Matie et al. (2020) reportaram que *L. monocytogenes* têm mostrado resistência à gentamicina, ampicilina, ciprofloxacina, tetraciclina, sulfonamida, estreptomicina, eritromicina e rifampicina nos isolados clínicos em diversos países. Isso se deve ao

uso excessivo de antibióticos prescritos em ambientes hospitalares (Ben *et al.*, 2018; Mancuso *et al.*, 2021).

De acordo com Mancuso *et al.* (2021), a sigla “ESKAPE” (espécies *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter*), agrupa as principais espécies patogênicas resistentes a antibióticos e de difícil tratamento. A RAM dessas bactérias causa um número expressivo de mortes em todo o mundo, principalmente, em pacientes em hospitais e asilos, e, são uma ameaça à saúde pública uma vez que o impacto das mortes, o tempo de internação hospitalar e os custos de saúde podem atingir valores imensuráveis ao longo dos anos.

Angelescu *et al.* (2019), avaliaram as propriedades probióticas de lactobacilos de duas bebidas fermentadas, dentre elas o kefir de água, e, relataram que a maioria dos lactobacilos do kefir de água apresentaram atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas, como *L. monocytogenes* e *E. coli*, por exemplo. E ainda, realizaram a determinação *in vitro* da resistência dos lactobacilos contra ácidos, enzimas e bile, a fim de confirmar as propriedades probióticas, a qual deve sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal, isto é, com um pH baixo e a presença de certas enzimas e sais biliares, atingindo o local alvo em quantidade adequada para provocar o efeito antimicrobiano.

7. CONCLUSÃO

Do total de 86 microrganismos isolados do kefir de água, 44 isolados (51,2%) apresentaram halos de inibição contra *L. monocytogenes* e 48 isolados (55,8%) contra *P. aeruginosa*. Assim, no presente estudo, um número significativo de isolados do kefir de água apresentou atividade antimicrobiana contra as bactérias patogênicas testadas, revelando um potencial efeito antimicrobiano dos microrganismos presentes no kefir de água. Mais estudos são necessários para compreender os mecanismos de ação utilizados por cada microrganismo para inibir o crescimento das bactérias patogênicas.

As propriedades antimicrobianas dos microrganismos do kefir de água são uma alternativa para atenuar a problemática da resistência aos antimicrobianos. Além disso, o presente trabalho contribui para que o uso do kefir de água seja disseminado e incentivado aos consumidores, pois a microbiota do kefir de água é rica em microrganismos e ácidos orgânicos que trazem benefícios a saúde. Os dados desse trabalho podem enriquecer pesquisas futuras e fornecer evidências científicas acerca das propriedades probióticas do kefir de água.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AÇIK, M. *et al.* Alternative source of probiotics for lactose intolerance and vegan individuals: sugary kefir. **Food Science and Technology**, v. 40, n. 3, p. 523-531, 2020.
- ALBERGARIA, H.; ARNEBORG, N. Dominance of *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation processes: role of physiological fitness and microbial interactions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 5, p. 2035–2046, 2016.
- AL-MOHAMMADI, A.R. *et al.* Chemical constitution and antimicrobial activity of kefir fermented beverage. **Molecules**, 2021.
- ANGELESCU, I.R. *et al.* Identification and probiotic properties of lactobacilli isolated from two different fermented beverages. **Annals of Microbiology**, v. 69, p. 1557–1565, 2019.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 241, de 26 de julho de 2018. Dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2018.
- ANSARI, F. *et al.* Health promoting properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* as a probiotic; characteristics, isolation, and applications in dairy products, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 1-27, 2021.
- BANWO, K. *et al.* Functional importance of bioactive compounds of foods with potential health benefits: a review on recent trends. **Food Bioscience**, v. 43, p. 101320, 2021.
- BEN, A. S. *et al.* Antibiotic resistance and mechanisms implicated in clinical *Escherichia coli* isolates from different Tunisian hospitals. **Microbial Drug Resistance**, v.24, n. 5, p. 588-595, 2018.
- BDSSOLO, T. B. *et al.* Soybean flour as a substrate to obtain *Enterococcus durans* bacteriocins. **Food Science and Technology**, v. 46, p. 1-12, 2022.
- CAI, Y., ZHANG, J., CHEN, Z., *et al.* Characterization of the microbial diversity in Tibetan kefir grains from different microregions in Tibet, China. **Food Research International**, n. 137, p.109531, 2020.
- CALATAYUD, M., *et al.* Water kefir and derived pasteurized beverages modulate gut microbiota, intestinal permeability and cytokine production in vitro. **Nutrients**, 2021.

CHEGINI Z, *et al.* Bacteriophage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: a review. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobiology**, v. 19, n. 1, p. 452020.

CUFAOGLU, G.; ERDINC, A. N. An alternative source of probiotics: water kefir. **Food Frontiers**, 2023.

DARBANDI, A. *et al.* Bacteriocins: Properties and potential use as antimicrobials. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**. v. 36, n. 1, p. e240932021, 2021.

EGEA, M.B. *et al.* Kefir beverages as a potential source of health-promoting microorganisms: An approach based on traditional knowledge combined with culture-dependent and independent techniques. **Foods**, v. 9, n. 5, p. 595, 2021.

EGEA, M. B. *et al.* A review of nondairy kefir products: their characteristics and potential human health benefits. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2020.

FAO/WHO. Probiotics in food: Health and nutritional properties and guidelines for evaluation - FAO **Food and Nutrition Paper**, p. 1-85, 2006. Disponível em: <https://www.fao.org/3/a0512e/a0512e.pdf>.

FIORDA, F. A. *et al.* Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation a review. **Food Microbiology**, v. 66, p. 86 95, 2017.

FULLER, R. History and development of probiotics. In **Probiotics – the Scientific Basis**, p. 1–8, 1992.

GAMBA, R., *et al.* Microbiological and functional characterization of kefir grown in different sugar solutions. **Food Science and Technology Research**, v. 25, n. 2, p. 303-312, 2019.

GHAPANVARI, P., *et al.* The effect of nisin on the biofilm production, antimicrobial susceptibility and biofilm formation of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. **European Journal of Medical Research**, v. 27, n. 173, 2022.

GOMES, F. S.; DUARTE, W. F.; SCHWAN, R. F. Biodiversity and characterization of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains from traditional Brazilian cachaça fermentations. **Journal of Applied Microbiology**, v. 124, n. 2, p. 427-439, 2018.

GONZÁLEZ-OROZCO, B. D. *et al.* Metagenomic analysis and antibacterial activity of kefir microorganisms. **Journal of Food Science**, v. 1, n. 1, p. 1-17, 2023.

HELMY, Y. A. *et al.* Probiotics: A promising approach for combating antibiotic resistance. **Antibiotics and Probiotics: Current Status and Future Prospects**, p. 241-264, 2023.

IBRAHIM, S.A. *et al.* Lactic acid bacteria as antimicrobial agents: food safety and microbial food spoilage prevention. **Foods**, 2021.

IBRAHIM, H. M.; SUGIMOTO, S.; SAKAMOTO, T. Antimicrobial activity and mechanism of bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from traditional fermented foods. **Food Control**, n. 128, p.108241, 2021.

KECHAGIA, M. *et al.* Health benefits of probiotics: a review. **ISRN Nutrition**, p. 481651, 2013.

KIM, D.H. *et al.* Antimicrobial activity of kefir against various food pathogens and spoilage bacteria. **Korean Journal of Food Science and Animal Resource**, v. 36, n. 6, p. 787-790, 2016.

KOH, W.Y. *et al.* Assessment of yeast, acetic and lactic acid bacteria isolated from water kefir grains and their application as starter culture in the production of fermented pumpkin-based water kefir beverages in improving gastrointestinal tract digestive tolerance and inhibition against α -glucosidase. **International Food Research Journal**, v. 26, n.2, p.429-439, 2019.

KRANJEC, C., *et al.* A bacteriocin-based antimicrobial formulation to effectively disrupt the cell viability of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) biofilms. **Biofilms Microbiomes**, v. 6, n. 58, 2020.

KUMAR, M. R. *et al.* Metagenomic and phytochemical analyses of kefir water and its subchronic toxicity study in BALB/c mice. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 21, n. 1, 2021.

LAUREYS, D.; De VUYST, L. Microbial species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of water kefir fermentation. **Applied Environmental Microbiology**, 2014.

LAUREYS, D.; DE VUYST, L. The water kefir grain inoculum determines the characteristics of the resulting water kefir fermentation process. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, p. 719–732, 2016.

LAUREYS, D. *et al.* Investigation of the instability and low water kefir grain growth during an industrial water kefir fermentation process. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 7, p. 2811–2819, 2017.

LAUREYS, D. *et al.* The Buffer Capacity and Calcium Concentration of Water Influence the Microbial Species Diversity, Grain Growth, and Metabolite Production During Water Kefir Fermentation. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019.

LAUREYS, D. *et al.* The type and concentration of inoculum and substrate as well as the presence of oxygen impact the water kefir fermentation process. **Frontiers in Microbiology**, 2021.

LIMA, M. S. F. *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* from Brazilian kefir-fermented milk: An in vitro evaluation of probiotic properties. **Microbial Pathogenesis**, v. 110, p. 670–677, 2017.

LOJEWSKA, M.; SAKOWICZ, T. Alternative therapies in bacterial infections—antimicrobial peptides, bacteriophages and probiotics - how far are we from clinical practice? **Molecules**, v. 26, n. 5, p. 1495, 2021.

LOURENÇO, M. Potencial probiótico de microrganismos isolados de grãos de kefir: uma análise *in vitro*. Dissertação (Mestrado) - **Universidade Federal do Ceará**, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2021.

LYNCH, K.M. *et al.* An update on water kefir: Microbiology, composition and production, **International Journal of Food Microbiology**, v. 345, 2021.

MALDONADO, R. R. *et al.* Kefir and kombucha beverages: new substrates and nutritional characteristics. **Fermented Food Products**, p. 295-312, 2020.

MANCUSO, M. *et al.* Bacteria resistant to antibiotics: A worldwide problem. **Pathogens**, v.10, n.1, p. 31, 2021.

MARQUES, V.; FRANZOLIN, M., SANABANI, S. A new class of antimicrobial molecules derived from kefir effective against *Pseudomonas aeruginosa* and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. **Science Report**, v. 10, n. 1, p. 17434, 2020.

MATIE, I. *et al.* A review of *Listeria monocytogenes* from meat and meat products: Epidemiology, virulence factors, antimicrobial resistance and diagnosis. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 87, n. 1, p. e1-e20. 2020.

MENEZES, A. G. T. *et al.* Probiotic potential, antioxidant activity, and phytase production of indigenous yeasts isolated from indigenous fermented foods. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 12, n. 1, p. 280–288, 2020.

METCHNIKOFF, E. The prolongation of life: optimistic studies. Heinemann, London, p. 1-374, 1907.

MGOMI FC, *et al.* Lactic acid bacteria biofilms and their antimicrobial potential against pathogenic microorganisms. **Biofilm**, v. 5, p. 100118, 2023.

MORETTI, A. F. *et al.* Water kefir, a fermented beverage containing probiotic microorganisms: From ancient and artisanal manufacture to industrialized and regulated commercialization. **Future Foods**. v. 5, 2022.

OKAFOR, J.U., NWODO, U.U. Antibiogram profile and detection of resistance genes in *Pseudomonas aeruginosa* recovered from hospital wastewater effluent. **Antibiotics**, v. 12, p. 1517, 2023.

PANG Z., *et al.* Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies, **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 1, p. 177-192, 2019.

PENDÓN, M. D. *et al.* Water kefir: Factors affecting grain growth and health-promoting properties of the fermented beverage. **Journal of Applied Microbiology**, 2021.

PETROVA, P. I. *et al.* Traditional Bulgarian dairy products: ethnic foods with health benefits. **Microorganisms**, v. 9, n. 3, p. 480, 2021.

PRADO, M. R. *et al.* Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products. **Frontiers In Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2015.

QUEREDA, J.J. *et al.* Pathogenicity and virulence of *Listeria monocytogenes*: A trip from environmental to medical microbiology. **Virulence**, v.12, n. 1, p. 2509-2545, 2021.

REQUE, P. M.; BRANDELLI, A. Encapsulation of probiotics and nutraceuticals: applications in functional food industry. **Trends In Food Science & Technology**, v. 114, p. 1-10, 2021.

ROGALLA D, BOMAR PA. *Listeria Monocytogenes*. [Updated 2023 Jul 4]. In: **StatPearls** [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534838/>.

SATOKARI, R. Modulation of gut microbiota for health by current and next-generation probiotics. **Nutrients** v. 11, n. 8: p.1921, 2019.

SERVENTI, L. *et al.* Water kefir: a review of its microbiological profile, antioxidant potential and sensory quality. **Acta Scientific Nutritional Health**, v. 4, 2020.

SHATRI G, Tadi P. Polimixina. [Atualizado em 2023 jul 4]. In: **StatPearls** [Internet]. Ilha do Tesouro (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557540/>

VERCE M, DE VUYST L, WECKX S. Shotgun Metagenomics of a water kefir fermentation ecosystem reveals a novel *Oenococcus* species. **Frontiers in Microbiology**, 2019.

VERCE, M.; DE VUYST, L.; WECKX, S. The metagenome-assembled genome of *Candidatus Oenococcus aquikefiri* from water kefir represents the species *Oenococcus sicerae*. **Food Microbiology**, v. 88, p. 103402, 2020

TAN, L. L. *et al.* Potential probiotic strains from milk and water kefir grains in Singapore - use for defense against enteric bacterial pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 2022.

TAYE, Y. *et al.* Isolation and identification of lactic acid bacteria from cow milk and milk products. **Scientific World Journal**, p. 4697445, 2021.

THI, M.T.T.; WIBOWO, D.; REHM, B.H.A. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. **International Journal of Molecular Science**, v. 21, n. 22, p. 8671, 2020.

WANG, Y. *et al.* Microbial diversity and aroma compound formation during water kefir fermentation. **Handbook of Food Chemistry**, p. 425-440, 2021.

WARD, H.M. V. The ginger-beer plant, and the organisms composing it: a contribution to the study of fermentation-yeasts and bacteria. **Philosophical Transactions of The Royal Society of London** (B.), v. 183, p. 125-197, 1892.

WILSON, M.G.; PANDEY, S. *Pseudomonas aeruginosa*. [Updated 2023 Aug 8]. In: **StatPearls** [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557831/>.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Ten Threats to Global Health in, 2019. Disponível em: <https://www.who.int/emergencies/ten-threats-to-global-health-in-2019>. Acesso: 14, mai., 2023.

ZANIRATI, D.F. *et al.* Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures. **Anaerobe**, v. 32, p. 70–76, 2015.

ŻYMAŃCZYK-DUDA, E. *et al.* Yeast as a Versatile Tool in Biotechnology. In: Yeast - Industrial Applications. London: **Intechopen**, 2017.