

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO**

**PROPRIEDADES PROBIÓTICAS DE BACTÉRIAS DO ÁCIDO
LÁCTICO ISOLADAS DE LEITE HUMANO**

NAYARA ALVES REIS

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

JULHO - 2015

PROPRIEDADES PROBIÓTICAS DE BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁCTICO ISOLADAS DE LEITE HUMANO

NAYARA ALVES REIS

Bióloga

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2013

Dissertação submetida ao colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Orientadora: Dr^a Norma Suely Evangelista-Barreto

Co-orientadora: Dr^a Margarete Alice Fontes Saraiva

CRUZ DAS ALMAS-BA

JULHO – 2015

FICHA CATALOGRÁFICA

R375 Reis, Nayara Alves.

Propriedades probióticas de bactérias do ácido láctico isoladas de leite humano. / Nayara Alves Reis . – Cruz das Almas, BA, 2015.
80 f. il.; 30 cm.

Orientador: Dr^a. Norma Suely Evangelista-Barreto.
Co-orientadora: Dr^a. Margarete Alice Fontes Saraiva.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola)- Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2015.

1. Bactéria láctica. 2. Leite humano. 3. Probiótico. I. Barreto, Norma Suely Evangelista. II. Saraiva, Margarete Alice Fontes. III. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia III. Título.

CDD: 579.3 (21.ed.)

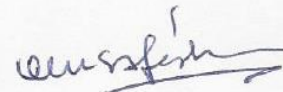
Ficha catalográfica elaborada por Lucidalva R. G. Pinheiro- Bibliotecária CRB51161 – Embrapa Mandioca e Fruticultura

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO**

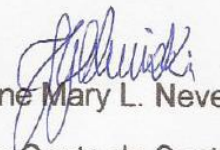
**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
NAYARA ALVES REIS**



Prof^ª. Dr^ª. Norma Suely Evangelista-Barreto
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
(Orientador)



Prof^ª. Dr^ª Elisa Teshima
Universidade Estadual de Feira de Santana



Prof^ª. Dr^ª Jane Mary L. Neves Gelinski
Universidade do Oeste de Santa Catarina

"Dissertação homologada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola em _____ conferindo o grau de Mestre em
Microbiologia Agrícola em _____."

“Deus acima de todas as coisas”

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me concedido as ferramentas necessárias para traçar esse caminho me dando forças nos momentos mais difíceis e acalentado meu coração nos momentos de saudades da família.

Aos meus pais, amores de minha vida, pelo amor incondicional e pela minha formação como ser humano digno e honesto.

As minhas queridas irmãs e irmão pelo carinho e apoio eternos.

Ao meu noivo, pela paciência, atenção e principalmente pelo amor.

A minha sogrinha (*in memoriam*) pelo seu carinho e atenção.

Ao Hospital Clériston Andrade, especialmente a Maricélia Vandalva e Suelly Pinto (fundadora e coordenadora do Banco de Leite Humano do Hospital) pela disponibilidade e simpatia.

Ao Conselho de Ética da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia por aprovar e com isso permitir o desenvolvimento da pesquisa.

As colegas de laboratório, em especial a Elaine, Brenda e Zayda pela ajuda nos momentos de sufoco!

A minha orientadora, Professora Norma, pelos ensinamentos fundamentais para a minha formação durante toda minha vida acadêmica (graduação e mestrado) e por ter me permitido escolher esta pesquisa mesmo sendo fora da sua linha de trabalho. Pró, obrigada pela confiança!

A co-orientadora Magah, não tenho palavras para agradecer, com você eu aprendi a amar os probióticos!!

A Dr^a. Elizabeth admiro muito sua inteligência, paciência em ensinar e sua disposição em ir para a bancada “colocar a mão na massa” comigo. O que seria de minha molecular sem você!!!

À banca examinadora, pela disponibilidade, sugestões e críticas.

A todos que de alguma forma contribuíram para essa pesquisa acontecer!
Obrigada meu Deus pelas pessoas maravilhosas que colocaste em minha vida!

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Sobrevivência das bactérias láctica isoladas de leite humano a baixos valores de pH e a diferentes concentrações de sais biliares.75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise bioquímica das bactérias lácticas isoladas de leite humano.	72
Tabela 2 – Inibição das bactérias lácticas isoladas de leite humano sobre micro-organismos indicadores.	73
Tabela 3 - Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos pelas bactérias lácticas isoladas de leite humano.	74
Tabela 4 - Identificação por 16S rRNA dos isolados de bactérias lácticas de leite humano.....	76

LISTA DE SIGLAS

BAL – Bactérias Ácido-Lácticas

BHL – Banco de Leite Humano

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

CTCAF – Comissão de Assessoramento Técnico-Científico em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos

EMP Via Embdem-Meyhoif Parnas

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations

GRAS – Generally Recognized As Safe

HCl – Ácido Clorídrico

LH- leite humano

MRS – De Man Rogosa e Sharpe

NaCl – Ácido Clorídrico

NCBI – National Center for Biotechnology Information

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCR – Reação em cadeia da Polimerase

TGI – Trato gastrointestinal

UFC – Unidade Formadora de Colônias

WHO – World Health Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo Geral	13
2.2 Objetivos Específicos	13
CAPÍTULO 1	14
Leite humano como uma fonte de bactérias lácticas	14
RESUMO	15
ABSTRACT.....	16
1. Leite humano e microbiota intestinal	17
2. Bactérias do ácido láctico (BAL)	20
2.1. Bactérias do ácido láctico na indústria de alimentos.....	21
2.2. O gênero <i>Enterococcus</i>	22
2.3. O gênero <i>Weissella</i>	25
3. Probióticos.....	26
3.1. Probióticos e o benefício a saúde.....	31
REFERÊNCIAS	33
CAPÍTULO 2	48
RESUMO	49
ABSTRACT.....	50
INTRODUÇÃO	51
MATERIAL e MÉTODOS	52
Micro-organismos e condições de crescimento	53
Identificação preliminar das bactérias lácticas.....	53
Extração de DNA e PCR	53
Identificação molecular das bactérias lácticas	54
Atividade antagônica das bactérias lácticas	54
Suscetibilidade antimicrobiana	54
Sobrevivência das bactérias lácticas expostas as condições de acidez e diferentes concentrações de sais biliares.....	55
RESULTADOS	55
DISCUSSÃO	57
REFERÊNCIAS	63
ANEXOS	77

RESUMO

REIS, N. A. Propriedades probióticas de bactérias do ácido láctico isoladas de leite humano.

Este estudo foi desenvolvido com o objetivo de obter bactérias lácticas com potencial probiótico a partir de leite humano. Treze amostras de leite humano foram coletadas no Banco de Leite Humano do Hospital Geral Clériston Andrade na cidade de Feira de Santana, Bahia. Os isolados foram selecionados quanto à coloração de Gram das células e atividade de catalase. Os gêneros dos isolados foram identificados por método bioquímico e molecular. Os isolados determinados como bactérias lácticas foram caracterizados quanto algumas propriedades probióticas como, capacidade de inibição de micro-organismos indicadores, resistência a antibióticos e tolerância a acidez e a sais biliares. Foram selecionados 33 isolados cocos Gram-positivos e catalase negativa. Os resultados da identificação bioquímica mostraram que 78,8% (26/33) dos isolados pertencem ao gênero *Enterococcus* e 21,2% (07/33) foram classificados em um dos gêneros, *Vagococcus*, *Aerococcus*, *Helcococcus* ou *Alloiococcus*. Todos os isolados apresentaram atividade inibitória contra *Enterococcus faecalis* e *Salmonella* Enteritidis, 97% contra *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* e 78,8% contra *Escherichia coli*. Resistência antimicrobiana foi observada para a gentamicina (50%), vancomicina (47%), ampicilina (28,1%), clindamicina e tetraciclina (12,5%), eritromicina e amoxicilina+ácido clavulânico (9,3%), cloranfenicol e imipinem (3,1%). Dezesete isolados foram selecionados por apresentar sensibilidade a vancomicina. Doze isolados apresentaram tolerância a pH 3,0 e à presença de 0,05% e 0,1% de sais biliares. Esses isolados tiveram sua identificação confirmada em nível de espécie, com uma predominância de *Enterococcus thailandicus*, seguido de *Enterococcus faecalis*, *Weisella confusa* e *Enterococcus durans*. As amostras de leite humano do Hospital Clériston Andrade são uma fonte de bactérias lácticas que apresentam características fisiológicas que as tornam atrativas para serem utilizadas como probiótico.

Palavras-chaves: antagonismo, bactérias lácticas, leite humano, probiótico, saúde.

ABSTRACT

REIS, N. A. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from human milk.

This study was developed in order to obtain lactic acid bacteria with probiotic potential from human milk. Thirteen samples of human milk were collected at the Human Milk Bank at Geral Clériston Andrade Hospital in Feira de Santana city, Bahia. The isolates were selected by Gram staining of cells and catalase activity. The isolates genus was identified by biochemical and molecular methods. The isolates determined as lactic acid bacteria were characterized by their probiotic properties as ability to inhibit indicators micro-organisms, antibiotic resistance, and tolerance to acid and bile salts. Thirty-three isolates Gram-positive cocci and negative catalase were selected. The results of the biochemical identification showed that 78.8% (26/33) of the isolates belong to *Enterococcus* genus and 21.1% (07/33) were classified as *Vagococcus*, *Aerococcus*, *Helcococcus* or *Alloiococcus*. All isolates showed inhibitory activity against *Enterococcus faecalis* and *Salmonella* Enteritidis, 97% against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* and 78.8% against *Escherichia coli*. Antimicrobial resistance was observed for gentamicin (to 50%), vancomycin (47%), ampicillin (28.1%), clindamycin and tetracycline (12.5%), erythromycin and amoxicillin + clavulanic acid (9.3%), chloramphenicol and imipenem (3.1%). Seventeen isolates were selected because they have sensitivity to vancomycin. Twelve isolates showed tolerance to pH 3.0 and the presence of 0.05% and 0.1% bile salts. These isolates had their identification confirmed at the species level, with a predominance of *Enterococcus thailandicus*, followed by *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus durans* and *Weisella confusa*. The samples of human milk of Clériston Andrade Hospital are a source of lactic acid bacteria that exhibit physiological properties that make them attractive for use as a probiotic.

Key-words: antagonism, lactic acid bacteria, human milk, probiotic, health.

1. INTRODUÇÃO

O leite humano (LH) é um alimento de extrema importância na dieta dos recém-nascidos, em virtude da sua contribuição para o desenvolvimento da microbiota natural que coloniza e desempenha funções essenciais no trato gastrointestinal. Além disso, o leite fornece uma combinação única de proteínas, carboidratos, lipídios, minerais, imunoglobulinas e vitaminas que garantem o crescimento e o desenvolvimento da criança (MARTÍN et al., 2007; FÉRNANDEZ et al., 2013).

Acredita-se que o LH seja uma importante fonte de bactérias lácticas (BAL) potencialmente probióticas e a sua colonização e predominância no intestino dos recém-nascidos é favorecida devido a suas características fisiológicas e a presença de promotores de crescimento, como oligossacarídeos, no LH (MARTÍN et al., 2007; ARBOLEYA et al., 2012). As bactérias comumente isoladas a partir desse fluido biológico pertencem aos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Enterococcus*, *Propionibacterium*, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, as quais são consideradas como componentes da microbiota natural ou endógena do LH (MARTÍN et al., 2012; JEURINK et al., 2013). O gênero *Lactobacillus* tem sido o micro-organismo mais empregado como probiótico na indústria de alimentos (WGO, 2008).

Os probióticos são micro-organismos capazes de conferir benefícios a saúde do hospedeiro quando administrados em quantidades adequadas (FAO/WHO, 2001). Entretanto, os critérios para seleção de um micro-organismo com potencial para uso probiótico inclui uma série de características como, a tolerância as condições adversas do trato gastrointestinal (TGI), principalmente a acidez do estômago e a presença de sais biliares no intestino, capacidade de adesão à mucosa intestinal e à exclusão competitiva de micro-organismos patogênicos. Além disso, o micro-organismo deve ser reconhecido como seguro (GRAS) para consumo (FONTANA et al., 2013).

Diversos benefícios à saúde são atribuídos às BAL probióticas do leite humano que colonizam o TGI. Além de promover a manutenção da resistência

da mucosa intestinal a doenças infecciosas, produzir metabólitos com ação antimicrobiana e estimular o sistema imunológico, esses micro-organismos são capazes de hidrolisar os componentes não digeríveis, reduzir à intolerância a lactose e os níveis de colesterol (KOROPATKIN; CAMERON; MARTENS, 2012; FONTANA et al., 2013).

Por esse motivo as bactérias lácticas probióticas, têm sido amplamente estudadas visando a sua utilização na formulação de alimentos que auxiliem na terapia e na manutenção da microbiota intestinal.

Baseado nisso, o presente estudo foi desenvolvido visando obter bactérias lácticas de leite humano que apresentem propriedades probióticas para que sejam futuramente empregadas no desenvolvimento de novos alimentos funcionais, a fim de exercerem efeitos benéficos no hospedeiro.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Isolar bactérias do ácido láctico de leite humano e avaliar suas propriedades probióticas.

2.2 Objetivos Específicos

- Isolar bactérias lácticas a partir de amostras de leite humano obtidas em banco de leite em hospital;
- Identificar bioquímica e molecularmente as bactérias lácticas isoladas;
- Verificar a capacidade antagonista das bactérias lácticas isoladas entre si e sobre micro-organismos indicadores;
- Avaliar a suscetibilidade dos isolados a antimicrobianos de uso clínico;
- Determinar a capacidade de sobrevivência das bactérias lácticas isoladas a condições de acidez e a distintas concentrações de sais biliares.

CAPÍTULO 1

Leite humano como uma fonte de bactérias lácticas

RESUMO

REIS, N. A. Leite humano como uma fonte de bactérias lácticas.

O leite humano além de ser um alimento importante para o desenvolvimento e composição da microbiota intestinal neonatal é uma fonte potencial de bactérias do ácido láctico (BAL) com propriedades probióticas, tornando-se um meio para o isolamento desses micro-organismos. O isolamento de BAL probióticas tem impulsionado a pesquisa e o desenvolvimento na área de alimentos funcionais, principalmente devido ao interesse por uma alimentação saudável e a busca por melhoria na qualidade de vida. Comercialmente, as BAL são mais comumente utilizadas como probióticos em alimentos para o consumo humano, devido ao efeito fisiológico benéfico associado com a ingestão desses micro-organismos. Alimentos probióticos têm sido utilizados principalmente para restaurar o equilíbrio da microbiota, diminuindo inflamações intestinais. No entanto, o uso destes alimentos também tem sido relatado para a prevenção de outras doenças, como a redução dos níveis de colesterol e a incidência de câncer no cólon. Para serem utilizadas comercialmente, as BAL devem apresentar, além das propriedades fisiológicas e tecnológicas, a capacidade de serem incorporadas em produtos alimentícios sem perderem a sua viabilidade de forma que possam exercer efeitos benéficos a saúde humana.

Palavras-chaves: alimentos funcionais, bactéria ácido-láctica, leite humano, probióticos.

ABSTRACT

REIS, N. A. Human milk as a source of lactic acid bacteria.

Human milk besides being an important food composition for neonatal gut microflora development is a potential source of lactic acid bacteria (LAB) with probiotic properties, making it a medium for these micro-organisms isolation. The probiotic LAB isolation has promoted research and development in functional foods area , mainly due to interest in healthy nutrition and the search for better quality of life. Commercially, the LABs are most commonly used as probiotics in food for human consumption due to the beneficial physiological effect associated with ingestion of these micro-organisms. Probiotic foods have been mainly used to restore the balance of microflora, reducing intestinal inflammation. However, the use of these foods has also been reported for the prevention of other diseases, such as lowering cholesterol levels and colon cancer incidence. To be commercially used, LABs must submit, in addition to physiological and technological properties, the ability to be incorporated into food products without losing their viability so that they can exert beneficial effects on human health.

Key-Works: functional foods, lactic acid bacteria, human milk, probiotics.

1. Leite humano e microbiota intestinal

O leite humano (LH) é considerado de vital importância para o desenvolvimento dos bebês, uma vez que contém ingredientes essenciais como imunoglobulinas, citocinas, células do sistema imunológico, lisozima e lactoferrina que fortalecem a imunidade conferindo proteção contra infecções e doenças alérgicas (JEURINK et al., 2013). É um alimento altamente nutritivo e energético, fonte de lipídeos, ácidos graxos essenciais e vitaminas lipossolúveis (SILVA et al., 2007).

Os constituintes do LH estão diretamente relacionados com a predominância de bactérias específicas no leite (MCGUIRE; MCGUIRE, 2015). O colostro é segregado nos primeiros dias após o parto, contém uma concentração mais elevada de proteínas, sais minerais, oligossacarídeos e vitaminas solúveis (A, E e K) e uma menor concentração de gordura e lactose em relação ao leite maduro. O leite materno só é considerado maduro duas semanas após o parto (GONZÁLEZ et al., 2013).

A comunidade microbiana presente no LH é caracterizada por sua alta densidade populacional e ampla variedade sendo normalmente influenciada pela microbiota intestinal da mãe (FERNÁNDEZ et al., 2013). O leite humano é considerado uma das principais fontes de bactérias para o intestino do recém-nascido, o consumo de 800 mL/dia de leite está relacionado com uma ingestão entre 10^5 a 10^7 bactérias diária (FERNÁNDEZ et al., 2013). Uma hipótese atualmente aceita sobre a origem das bactérias presentes no LH é explicada pela função desempenhada pelas células dendríticas ou macrófagos que atuam como transportadores de micro-organismos a partir do intestino materno para as glândulas mamárias, por meio da circulação no sistema linfático associado à mucosa intestinal (JEURINK et al., 2013).

As diferenças observadas no padrão microbiológico do leite materno também estão associadas às características socio-econômicas, diferenças nos hábitos nutricionais, estado de saúde das lactantes, peso materno, tipo de parto, período de lactação, idade gestacional, uso de antibióticos e às

características genéticas das lactantes (GONZÁLEZ et al., 2013; MCGUIRE; MCGUIRE, 2015).

As espécies bacterianas frequentemente encontradas associadas ao LH são dos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Enterococcus*, *Propionibacterium*, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (MARTÍN et al., 2012). Cabrera-Rubio et al. (2012) relataram que os gêneros *Weissella*, *Leuconostoc*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* foram predominantes no colostro de mulheres finlandesas em relação ao leite maduro. Collado et al. (2012) encontraram maior quantidade de *Staphylococcus* e menores quantidades de *Bifidobacterium* em mães com excesso de peso comparado com lactantes com peso normal. Em estudo realizado por Soto et al. (2014) o leite de mulheres lactantes que receberam antibióticos durante a gravidez ou lactação apresentaram uma menor ocorrência de lactobacilos e bifidobactérias.

Já foi demonstrado que o LH é o melhor alimento infantil, pois protege o bebê contra diarreia, infecções respiratórias, asma e alergias em virtude de suas características nutricionais, microbiológica e imunológica (MEHANNA et al., 2013). A amamentação também tem sido relacionada com uma menor incidência de otite média aguda, infecção do trato urinário e meningite (LARA-VILLOSLADA et al., 2007; NEAMTU et al., 2014).

O LH também influencia no mecanismo de defesa do organismo contra doenças infecciosas por meio do desenvolvimento da microbiota intestinal do recém-nascido (GONZÁLEZ et al., 2013). O aleitamento materno contribui na formação da microbiota intestinal, visto que é uma fonte contínua de bactérias para o intestino (FERNÁNDEZ et al., 2013). Crianças alimentadas com fórmulas comerciais tendem a ter mais alergias e infecções gastrointestinais do que aquelas que são alimentadas com leite materno (SOLIS et al., 2010).

A importância do leite humano na colonização do intestino de recém-nascidos por bactérias lácticas probióticas tem sido relatada (XAFRANSKI, 2010). A ingestão de leite humano contendo *Lactobacillus acidophilus* reduziu a ocorrência e a intensidade de enterocolite necrosante em bebês com peso abaixo do indicado (LIN et al., 2005). A ação antibacteriana de lactobacilos

isolados de leite humano contra bactérias patogênicas foi observada em um estudo realizado por Olivares et al. (2006a). O consumo de leite desnatado contendo *Lactobacillus fermentum* CECT5716 isolado de leite humano apresentou efeito anti-inflamatório no intestino de ratos com colite induzida (PERAN et al., 2007).

A administração de lactobacilos em bebês durante seis meses levou a redução nas taxas de incidência de infecções gastrointestinais e infecções do trato respiratório superior (MALDONADO et al., 2012). Os isolados de leite humano, *L. fermentum* CECT 5716 e *L. salivarius* CECT 5713, demonstraram estimular a resposta imunológica pela ativação de células NK, células T e citocinas (PÉREZ-CANO; DONG; YAQOUB, 2010).

O trato gastrointestinal (TGI) é colonizado após o nascimento e contém transitoriamente uma coleção de micro-organismos dinâmica e diversa em termos taxonômicos. A microbiota intestinal tem grande importância devido às inúmeras funções que realizam, atuando desde a proteção do epitélio do intestino impedindo a adesão de patógenos, na maturação do sistema imunológico e na degradação de componentes não digeríveis da dieta (FLINT et al., 2008; KOROPATKIN; CAMERON; MARTENS, 2012).

Fatores como a idade, alimentação, uso de antibióticos, estresse, consumo de álcool, uso de laxantes em excesso e anti-inflamatórios podem provocar um desequilíbrio na microbiota intestinal (KOOP-HOOLIHAM, 2001; PINTO et al., 2006), permitindo que micro-organismos patogênicos causem infecções (NETO, 2006).

A alteração na microbiota intestinal tem implicado em várias doenças, incluindo a doença inflamatória do intestino, câncer no cólon, colite associada a antibióticos e obesidade (KOROPATKIN; CAMERON; MARTENS, 2012). A estabilidade da microbiota intestinal é essencial, pois conserva e promove o bem estar e ausência de doenças, principalmente do trato intestinal. Dessa forma a suplementação da dieta com probióticos se faz necessária uma vez que permite a recuperação e o equilíbrio da microbiota intestinal (SANTOS, 2010).

2. Bactérias do ácido láctico (BAL)

As bactérias ácido-lácticas (BAL) são Gram-positivas, não esporuladas, catalase negativa, ácido-tolerantes, desprovida de citocromos, aeróbias, microaerófilas ou anaeróbios facultativas (MOGENSEN et al., 2003; AXELSSON, 2004).

Apresentam metabolismo estritamente fermentativo, convertendo açúcar principalmente em ácido láctico (GIRAFFA; CHANISHVILLI; WIDYASTUTI, 2010). A acidificação do meio e os processos enzimáticos que normalmente acompanham o crescimento dessas bactérias contribuem para as características de aroma, textura e preservação da qualidade microbiológica dos alimentos fermentados, como os produtos lácteos (KLAENHAMMER et al., 2005).

As BAL são mesófilas, porém possuem a capacidade de crescer em diferentes temperaturas entre 5°C a 45°C. Multiplicam-se em ambientes salinos, mas algumas espécies são inibidas em concentrações superiores a 6,5% de NaCl (FRANCIOSI et al., 2009; LIMA et al., 2009). Algumas linhagens apresentam capacidade de crescimento em pH 4,0 e 4,5 e outras em pH 3,8 e 9,8 (TRENTO, 2012).

A capacidade de adaptação das BAL às condições extremas, devido a altas concentrações de ácido láctico produzido, tem favorecido o seu desenvolvimento em diversos ambientes (OLIVEIRA; SILVA, 2011). No entanto, por serem fastidiosas, multiplicam-se principalmente, em ambientes ricos em fontes de carbono e de nitrogênio (SETTANNI; MOSCHETTI, 2010). As BAL podem ser encontradas, em plantas, alimentos fermentados, leite e mucosas intestinal, vaginal e do trato respiratório superior dos animais (INÊS et al., 2008; SETTANNI; MOSCHETTI, 2010).

A classificação das BAL em diferentes gêneros tem se baseado em características fenotípicas tradicionais, como a morfologia das colônias e células, características bioquímicas e fisiológicas (INÊS et al., 2008). A aplicação de técnicas moleculares na classificação e identificação das BAL permitiu substituir ou complementar as metodologias clássicas baseadas nas características fenotípicas (GONÇALVES, 2009).

As características morfológicas expressam a diversidade desse grupo de bactérias, uma vez que podem apresentar formas de bacilos (*Lactobacillus* e *Carnobacterium*), de cocos ou coco-bacilos (todos os outros gêneros), exceto o gênero *Weissella* que pode ter a forma de cocos ou bacilos (SETTANNI; MOSCHETTI, 2010).

De acordo com as características metabólicas, os gêneros podem ser divididos em homofermentativos obrigatórios, que são capazes de fermentar hexose pela via Embden-Meyhoif-Parnas (EMP) quase exclusivamente em ácido láctico; os heterofermentativos facultativos que degradam hexose a ácido láctico pela via EMP e são capazes de degradar pentoses, pois possuem aldolase e fosfoacetolase, e os heterofermentativos obrigatórios que degradam hexose pela via das pentoses fosfato produzindo lactato, etanol ou ácido acético e CO₂, além das pentoses que são fermentadas por essa via (FELIS; DELLAGIO, 2005).

As BAL pertencem ao filo *Firmicutes*, classe *Bacilli*, e ordem *Lactobacillales*. As diferentes famílias incluem *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* e *Streptococcaceae*. Dentre os principais gêneros do grupo das bactérias lácticas estão *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (AXELSSON, 2004; VOS et al., 2011).

O maior grupo de BAL pertence ao gênero *Lactobacillus* que compreende cerca de 145 espécies (PANESAR et al., 2007). Essas bactérias podem ser encontradas no TGI desde o nascimento do indivíduo (BERNARDEAU et al., 2008). *Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323, *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 e *Lactobacillus salivarius* UCC118 são alguns exemplos de BAL utilizadas como probióticos (GOH; KLAENHAMMER, 2009).

2.1. Bactérias do ácido láctico na indústria de alimentos

As BAL podem ser utilizadas na indústria de alimentos como cultura *starter*, promovendo transformações na matéria prima mediante processo

fermentativo, contribuindo de forma positiva para o aroma e sabor dos alimentos (ROSS; MORGAN; HILL 2002; COTTER; HILL; ROSS, 2005).

As BAL utilizadas como cultura *starter*, também podem ter características probióticas, ou seja, além de colaborar com o perfil sensorial do produto final podem contribuir na segurança microbiológica, aumentando o valor nutritivo por meio da síntese de vitaminas, aminoácidos essenciais e proteínas (GIRAFFA, 2004; LEROY; DE VUYST, 2004). Na indústria de alimentos, as BAL são aplicadas na produção de leites fermentados, iogurtes, queijo e também no processamento de carnes, bebidas alcoólicas e vegetais (BRUNO, 2011).

Os principais gêneros considerados seguros e utilizados na indústria de alimentos incluem *Lactococcus* (leite), *Lactobacillus* (leite, carne, vegetais e cereais), *Leuconostoc* (vegetais, leite), *Pediococcus* (vegetais, carne), *Oenococcus oeni* (vinho) e *Streptococcus thermophilus* (leite). Além de desempenhar papel na biopreservação dos alimentos fermentados, esses micro-organismos melhoram as características físico-químicas e organolépticas dos alimentos (INÉS et al., 2008).

Diversos estudos têm demonstrado a importância das BAL na conservação de alimentos e no controle de patógenos, devido principalmente a sua produção de metabólitos com propriedades antimicrobianas (DEEGAN et al., 2006, MORAES, 2011). Salvatierra et al. (2004) observaram uma redução no número de células de *Staphylococcus aureus* em iogurtes contendo culturas de *L. casei* CRL 431 e *L. acidophilus* CRL 730. Em iogurtes ausentes de probióticos a contagem de *S. aureus* se manteve alta durante 28 dias de armazenamento.

Chioda et al. (2007) relataram que culturas de *L. acidophilus* inibiram o crescimento de *Escherichia coli* BIA 26 em queijo. Guedes Neto et al. (2005) também observaram inibição de *Staphylococcus* spp. e *E. coli* CM2M17 isolados de amostras de queijo coalho por culturas de *Lactobacillus* spp..

2.2. O gênero *Enterococcus*

O gênero *Enterococcus* pertence à família Enterococcaceae (ARAÚJO; FERREIRA, 2013). São bactérias Gram positivas, anaeróbias facultativas,

crecem em amplas variações de pH (4,0 e 9,6) e podem apresentar-se na forma de cocos isolados, em pares ou em cadeias curtas. Sobrevivem em uma ampla faixa de temperatura entre 10°C e 45°C e podem permanecer viáveis a 60°C durante 30 min. Além disso, se multiplicam em meios com elevadas concentrações de sal (acima de 6,5%) e de sais biliares (40%), são homofermentativos, ou seja, fermentam a glicose produzindo exclusivamente ácido láctico (HEW; MAHER; VOGEL, 2007; ARAÚJO; FERREIRA, 2013).

Essas bactérias são amplamente distribuídas no ambiente, sendo encontradas em vários nichos ecológicos como intestino de humanos e animais, cavidade oral e trato genital feminino (MORENO et al., 2006; MOHAMED; HUANG, 2007), mas podem ser encontrados numa ampla gama de alimentos fermentados como leite, queijos, carne e vegetais (VALENZUELA et al., 2009). As espécies *E. faecalis* e *E. faecium* tem sido comumente isoladas de alimentos (EUZÉBY, 2011; ARAÚJO; FERREIRA, 2013).

Enterococcus thailandicus foi descrita há pouco tempo sendo pela primeira vez isolada de salame fermentado produzido na Tailândia (TANASUPAWAT; SUKONTASING; LEE, 2008). Em estudo realizado por LAUKOVÁ et al. (2013) *E. thailandicus* foi isolada em intestino de castores. Os isolados apresentaram sensibilidade aos antibióticos novobiocina, penicilina, azitromicina, eritromicina, cloranfenicol, canamicina e vancomicina. Ainda segundo os autores, *E. thailandicus* produziu um tipo de bacteriocina capaz de inibir bactérias como *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Enterococcus pertencem ao grupo das bactérias lácticas e tem sido utilizados como culturas *starter* (PANGALLO et al., 2008), em virtude de suas características bioquímicas, como atividade proteolítica e lipolítica, que contribuem de forma favorável na textura e sabor de alimentos como os queijos (MORENO et al., 2006). Exercem papel importante nos alimentos devido a produção de bacteriocinas que auxiliam na preservação do produto alimentício, com ação contra vários patógenos transmitidos por alimentos como *Bacillus cereus*, *Clostridium* spp., *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* (VALENZUELA et al., 2009).

Muitas espécies são estudadas para uso como probióticos, pois mostram várias características desejáveis, como sobrevivência à acidez do estômago e a sais biliares chegando ao intestino em proporções elevadas. Além disso, possuem a capacidade de competir pela adesão no intestino, contra micro-organismos patogênicos e de produzir compostos antimicrobianos como enterocina (SAARELA et al., 2000; ROSSI et al., 2003; SIVIERI et al., 2008; ARAÚJO; FERREIRA, 2013). Uma redução de 40% na incidência de tumores de cólon foi observada após ingestão de uma suspensão oral de 10^8 UFC/mL de *E. faecium* CRL 183 por ratos quimicamente induzidos (SIVIERI et al., 2007). Um aumento dos níveis de colesterol HDL em homens que consumiram um produto fermentado contendo *E. faecium* CRL 183 e *L. jugurti* 416 foi também observado (ROSSI et al., 2003).

Lertworapreecha, Poonku e Chalermchakit (2011) concluíram que duas cepas de *E. faecium* demonstraram potencial para utilização como probióticos, pois apresentaram resistência ao ácido gástrico e aos sais biliares, aderência a mucosa intestinal e capacidade de inibição a patógenos, por meio de produção de bacteriocina.

Enterococcus sp. são também utilizadas como probióticos para tratar ou prevenir diarreias, estimular o sistema imunológico, promover o crescimento zootécnico ou como produção de bacteriocinas, uma alternativa ao uso de antibióticos na criação de animais (FRANZ et al., 2011; HU et al., 2015). Kuritza et al. (2011) avaliando os efeitos da adição de uma estirpe probiótica *E. faecium* na alimentação de galinhas observaram uma redução do número de células de *Salmonella minnesota*.

Um grande questionamento que se tem feito é com relação a segurança do uso de algumas espécies de *Enterococcus* como probióticos, pois algumas linhagens são capazes de apresentar e transferir genes de resistência a antibióticos usados no tratamento de infecções (SAAD, 2006; VALENZUELA et al., 2010).

Os micro-organismos desse gênero podem apresentar resistência intrínseca às cefalosporinas, sulfonamidas e aminoglicósídeos, no entanto, algumas espécies possuem resistência extrínseca ao cloranfenicol,

eritromicina, tetraciclina e vancomicina. Neste último caso os genes estão localizados em plasmídeos ou em transposons podendo ser transferidos para diferentes grupos de micro-organismos (ARAÚJO; FERREIRA, 2013).

Em especial, espécies de *Enterococcus* resistentes à vancomicina constituem um grave problema na cura de infecções humanas, uma vez que este antimicrobiano é utilizado no tratamento de infecções nosocomiais severas em pacientes geralmente imunocomprometidos. Dessa forma, é extremamente importante e indispensável a detecção deste tipo de resistência antes da aplicação destas espécies como culturas *starter* ou probióticos em alimentos (OGIER; SERROR, 2008).

Outra restrição ao uso de espécies do gênero *Enterococcus* como probióticos se refere a presença de fatores de virulência, uma vez que algumas linhagens apresentaram relação a doenças nosocomiais que causam infecções como bacteremia, endocardite, ou infecções do trato urinário (FRANZ et al., 2011; SUJATHA; PRAHARAJ, 2012). No entanto, alguns estudos já demonstraram que cepas que não apresentam fatores de virulência ou resistência a antibióticos são consideradas seguras para serem utilizadas como probióticos (PIMENTEL et al., 2007; TARASOVA et al., 2010).

2.3. O gênero *Weissella*

As bactérias do gênero *Weissella* são membros da família Leuconostocaceae e pertencem ao grupo das bactérias lácticas. São bactérias Gram positivas, catalase-negativa, anaeróbias facultativas, com forma de cocos ou bacilos e multiplicam-se nas temperaturas de 15°C a 45°C (FUSCO et al., 2015).

Os micro-organismos desse gênero podem ser encontrados numa grande variedade de habitats, tais como pele, trato gastrointestinal de humanos e animais, leite materno, plantas e em uma variedade de alimentos fermentados (FUSCO et al., 2015).

Existem 19 espécies de *Weissella* descritas, sendo que as espécies *W. viridescens*, *W. cibaria* e *W. confusa* são conhecidas como patógenos

oportunistas causadores de infecções, tais como bacteremia e endocardite em humanos (FUSCO et al., 2015).

Algumas espécies desse gênero também têm sido estudadas para aplicação biotecnológica e uso como probióticos, devido principalmente a sua atividade antimicrobiana (SERNA-COCK et al., 2013; YOSHIYAMA et al., 2013; EMERENINI et al, 2014).

Kang, Na e Oh (2005) relataram que cepas de *W. cibaria* isoladas de salivas de crianças inibiram a formação de biofilme *in vitro* e a proliferação de patógenos causadores da cárie dentária. Foi também observada uma redução da obesidade em ratos que se alimentaram de Kimchi fermentados contendo cepas de *W. koreensi* (PARK et al., 2012).

As espécies *W. confusa* e *W. cibaria* tem atraído a atenção da indústria de alimentos, pois apresentam capacidade em produzir dextranas com potencial aplicação prebiótica. As dextranas podem reduzir o risco de infecções e de diarreia, aumentar a função do intestino, do metabolismo e estimular o crescimento de bactérias benéficas, como bifidobactérias (RASTALL; GIBSON, 2014). Além disso, as dextranas podem ser utilizadas em várias aplicações nas indústrias clínicas, cosméticos, alimentação humana e animal como adoçantes e bebidas funcionais fermentadas à base de cereais (PATEL; GOYAL, 2011).

O fato de algumas espécies de *Weisella* serem consideradas patógenos oportunistas, assim como apresentar resistência intrínseca à vancomicina (OUOBA; LEI; JENSEN, 2008; AYENI et al., 2011), faz com que seja realizada uma avaliação cuidadosa sobre a sua segurança para aplicação como probióticos.

3. Probióticos

Há cerca de 100 anos, o cientista russo e também professor do Instituto Pasteur em Paris, Elie Metchnikoff, observou que o aumento na expectativa de vida dos caucasianos era devido à função benéfica das BAL presentes nos leites fermentados (HOLZAPFEL; SCHILLINGUER, 2002).

Em 1965, Lilly e Stillwell utilizaram pela primeira vez o termo probiótico definindo-o como substância de origem microbiológica que estimula o

crescimento de outros organismos (WGO, 2008). Em 1995, Fuller, propôs uma nova definição: "um probiótico é uma preparação composta por micro-organismos vivos ou estimulantes microbianos que afeta a microflora indígena do animal, planta ou alimento de uma forma benéfica" (MCGUIRE; MCGUIRE, 2015).

Atualmente o conceito de probiótico mais utilizado é o da Organização Mundial de Saúde que o define como micro-organismos vivos capazes de conferir benefícios a saúde do hospedeiro quando administrados em doses adequadas (FAO/WHO, 2001).

Os micro-organismos pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são os mais empregados como probióticos na indústria de alimentos (WGO, 2008).

Segundo a Comissão de Assessoramento Técnico-Científico em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos (CTCAF), as espécies de micro-organismos consideradas como potencialmente probióticas são *L. acidophilus*, *L. casei shirota*, *L. casei* variedade *rhamnosus*, *L. casei* variedade *defensis*, *L. paracasei*, *L. lactis*, *B. bifidum*, *B. animalis* (incluindo a subespécie *B. lactis*), *B. longum* e *E. faecium* (ANVISA, 2008).

Os produtos contendo probióticos devem sempre informar a espécie do micro-organismo (probiótico) presente que contribui para o equilíbrio da microbiota intestinal, além disso, deve ser declarado que o consumo do produto deve estar associado à alimentação equilibrada e a hábitos de vida saudáveis. Para exercer ação benéfica no hospedeiro é necessária a ingestão mínima de 10^8 a 10^9 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de células viáveis por dia (ANVISA, 2008).

Os leites fermentados e iogurtes são os alimentos probióticos que predominam no comércio mundial (KOMATSU; BURITI; SAAD, 2008). O mercado de alimentos contendo bactérias próbióticas é o segmento de bens de rápido consumo que mais cresce, devendo crescer 10% a cada ano (DE VOS, 2011).

O mercado global de produtos probióticos foi estimado em \$ 26 milhões em 2012, tendo recebido níveis imprevisíveis de sucesso, principalmente em

congruência com os seus benefícios para a saúde global. Os principais fornecedores de cepas probióticas incluem culturas da Nestlé SA (Suíça), Yakult Honsha (Japão) e Chr. Hansen (Dinamarca) (GLOBAL PROBIOTICS MARKET, 2014).

O primeiro critério para a seleção de potenciais probióticos é a sua identificação (GONÇALVES, 2009). Técnicas microbiológicas clássicas são realmente importantes para a seleção, e caracterização bioquímica (perfis de fermentação, tolerâncias ao NaCl, pH e temperatura), mas não são eficientes para classificar um micro-organismo taxonomicamente. Os métodos moleculares são eficientes, mesmo entre espécies bem relacionadas (YAVUZDURMAZ et al., 2007).

Das técnicas atuais se destacam, o sequenciamento do rDNA 16S e de outros genes, impressão digital genética, sondas de oligonucleotídeos e seleção de *primers* específicos que diferenciam bactérias proximamente relacionadas. Métodos moleculares adicionais, como a eletroforese em gel desnaturante, eletroforese em gradiente de temperatura e a hibridização *in situ* por fluorescência, são utilizados para auxiliar na identificação dos probióticos (FONTANA et al., 2013).

Para ser um candidato a probiótico o micro-organismo deve apresentar uma série de características. As cepas devem ser consideradas seguras (GRAS - “generally recognized as safe”), ou seja, não patogênicas (BARBOSA, 2011). Além disso, o micro-organismo deve ter atividade antimicrobiana contra patógenos, capacidade de adesão à mucosa do intestino e conseguir sobreviver às condições adversas do estômago, como pH ácido e a presença de sais biliares (KOSIN; RAKSHIT, 2006; ANVISA, 2008; FONTANA et al., 2013).

O estômago vazio apresenta pH 0,9 após a ingestão de alimento aumenta para 2,5 a 3,5, levando em média de 2 a 4 horas para o esvaziamento gástrico (URNAU et al., 2012). A resistência dos probióticos a valores de pH baixo pode variar dependendo da espécie (MUÑOZ-QUEZADA et al., 2013). A sobrevivência em meios com pH 3,0 foi observado em 80% das cepas de *L. fermentum* AD1 durante o período de 3 horas (STOMPFOVÁ et al., 2005).

Bosch et al. (2012) relataram que duas cepas de *L. plantarum* apresentaram capacidade de sobrevivência maior do que 50% em pH 2,0 e 3,0.

A sobrevivência da BAL probióticas ao pH baixo é uma característica importante, pois o ácido do estômago humano que apresenta valores entre pH 0,9 a pH 3,0 na presença de alimentos é uma das barreiras que as bactérias encontram no trato gastrointestinal (ERKKILA; PETAJA, 2000). Assim, um probiótico deve sobreviver pelo menos, 90 minutos de exposição em pH 3,0 (BERNARDEAU; VERNOUX; GUEGUEN, 2001).

A presença dos sais biliares constitui outra condição adversa para a sobrevivência das bactérias lácticas probióticas. No intestino humano e dos animais, a concentração de sais biliares inicia com 2% p/v durante a digestão, chegando a um valor de 0,3% p/v (GOTCHEVA; HRISTOZOVA, 2002). Os sais biliares são liberados no intestino após ingestão de alimentos gordurosos, entretanto alguns micro-organismos apresentam a enzima capaz de hidrolisar os sais biliares e diminuir seu efeito detergente (ERKKILA; PETAJA, 2000).

Os sais biliares servem como barreira impedindo a aderência de micro-organismos no intestino, por isso as bactérias lácticas probióticas devem resistir as concentrações médias existentes no trato gastrointestinal humano (MAINVILLE; ARCAND; FARNWORTH, 2005; URNAU et al., 2012; MUÑOZ-QUEZADA et al., 2013).

Outra característica importante é a seleção segura das bactérias lácticas que serão utilizadas como probióticos com relação à resistência aos antimicrobianos comumente utilizados na terapia humana, em virtude da possibilidade da transmissão de genes de resistência a micro-organismos patogênicos (DANIELSEN; WIND, 2003; KOSIN; RAKSHIT, 2006).

Além disso, os candidatos a probióticos devem ter a capacidade de inibir micro-organismos patogênicos por meio da produção de substâncias antimicrobianas, como bacteriocinas, ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio (KOSIN; RAKSHIT, 2006; FONTANA et al., 2013). O efeito antimicrobiano do ácido láctico está relacionado principalmente com a redução do pH do meio e do pH intracelular do micro-organismo alvo (TAMANINI et al.,

2012). O peróxido de hidrogênio tem ação antimicrobiana em virtude da sua atividade oxidante (GONÇALVES, 2009).

Dentre os antimicrobianos produzidos pelas bactérias lácticas as bacteriocinas têm sido muito estudadas, pela importância nas indústrias de alimentos como bioconservantes, principalmente por não provocarem alterações sensoriais nos alimentos (HAJIKHANI; BEYATLI; ASLIM, 2007). A nisina é a única bacteriocina, até o momento, utilizada nas indústrias de alimentos como agente de conservação (KARPINSKI; SZKARADKIEWICZ, 2013).

O alvo das bacteriocinas é principalmente a membrana plasmática, com formação de poros, interferindo no potencial eletroquímico e dos mecanismos de transporte ativo (GONÇALVES, 2009). As bacteriocinas atuam principalmente sobre bactérias Gram-positivas, enquanto que a atividade inibitória contra bactérias Gram-negativas ocorre principalmente devido a ação combinada com ácidos orgânicos ou peróxido de hidrogênio (SAVADOGO et al., 2004; MARAGKOUidakis et al., 2009; ASKARI et al., 2012; KAZEMIPOOR et al., 2012).

Os probióticos devem, também, ser capazes de sobreviver às condições tecnológicas, ou seja, os micro-organismos devem manter viáveis e estáveis durante o processamento e estocagem do alimento até o seu consumo. A sobrevivência de bactérias probióticas nos alimentos abaixo da quantidade recomendada pode limitar sua habilidade de exercer os efeitos benéficos na saúde humana (SHAH, 2000; BARBOSA, 2011).

Para serem utilizadas comercialmente, as culturas de BAL devem apresentar além das propriedades benéficas e tecnológicas, a capacidade de serem incorporadas nos produtos alimentícios em consórcio com outras linhagens sem perderem a viabilidade e funcionalidade. Apesar de a maioria dos estudos sobre probióticos utilizar cepas individuais, a combinação de cepas tem mostrado eficácia. Pouco é conhecido sobre a utilização de consórcio de cepas probióticas, se esse processo resulta em efeitos aditivos ou sinérgicos ou em menor eficácia devido à inibição entre as cepas (CHAPMAN; GIBSON; ROWLAND, 2011). Alguns trabalhos tem demonstrado que as

misturas de probióticos são benéficas para a saúde do hospedeiro (SHIBOLET et al., 2002; OLIVARES et al., 2006b; KAJANDER et al., 2007; 2008; CHAPMAN; GIBSON; ROWLAND, 2011).

3.1. Probióticos e o benefício a saúde

Nos últimos anos a busca por uma alimentação saudável refletiu o interesse em alimentos que sejam capazes de desempenhar efeitos fisiológicos benéficos visando à prevenção de doenças e aumento na expectativa de vida (THAMER; PENNA, 2006).

Os probióticos têm sido utilizados principalmente para diminuir a inflamação intestinal restaurando o equilíbrio da microbiota (PRISCIANDARO et al., 2009). A presença de probióticos no trato gastrointestinal do hospedeiro pode inibir a sobrevivência de bactérias patogênicas mediante exclusão competitiva pela competição por nutrientes, espaço e sítios de adesão às células do epitélio intestinal, por modular a atividade imunológica, por inibirem a ação de toxinas e pela produção de substâncias antimicrobianas (SAAD, 2006; ATASSI; SERVIN, 2010; TEJERO-SARIÑENA et al., 2012; FONTANA et al., 2013).

Os probióticos interagem com a membrana intestinal, se aderindo as células do epitélio, competindo e impedindo a aderência de micro-organismos patogênicos (ROSTAGNO, 2003; FONTANA et al., 2013). Estudos demonstram que o uso de probióticos pode ajudar no controle da proliferação da *Helicobacter pylori* no estômago por meio da produção de bacteriocinas e ácidos orgânicos, impedindo a sua adesão em células epiteliais (LESBROS-PANTOFLICKOVA; CORTHÉSY-THEULAZ; BLUM, 2007). A atividade antimicrobiana foi relatada por Gagnon et al. (2004) que observaram a redução de 50% na população de *Escherichia coli* O157:H7 pela ação de bifidobactérias isoladas de fezes de recém-nascidos.

Algumas bactérias probióticas podem estar relacionadas com a redução dos níveis de colesterol devido à degradação dos sais biliares (EL-GAWAD et al. (2005). El-Gawad et al. (2005) observaram que os níveis de colesterol em ratos alimentados com leite fermentado contendo probióticos diminuíram em

comparação com os ratos que não foram alimentados com o leite fermentado contendo a bactéria benéfica.

A presença de bactérias probióticas podem aumentar a resposta imunológica do hospedeiro em virtude do aumento nos níveis de anticorpos IgA (Imunoglobulina A), citocininas e da atividade dos macrófagos contra patógenos (KOOP-HOOLIHAN, 2001). Díaz-Ropero et al. (2007) observaram um aumento na resposta imune de animais alimentados com bactérias do ácido-láctico isoladas do leite materno.

Outro benefício resultante do consumo de probióticos é com relação à degradação da lactose no intestino em função da produção da enzima β -D-galactosidase. Isto proporciona uma redução no desconforto abdominal associados às diarreias osmóticas, em indivíduos que apresentam deficiência na quantidade da β -D-galactosidase (SAAD, 2006). Além disso, o consumo de probióticos como lactobacilos e bifidobactérias pode estar associado à diminuição do risco de alergia alimentar, por meio da quebra de proteínas com potencial alergênico no trato intestinal (MORAIS; JACOB, 2006).

Segundo Denipote, Trindade e Burini (2010) vários estudos revelaram que o consumo de alimentos adicionados de probióticos está associado à redução de câncer no cólon, em virtude da inibição de bactérias responsáveis por converter substâncias pré-carcinogênicas (como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e as nitrosaminas) em carcinogênicas, inibição direta na formação de células tumorais, capacidade de ligação e/ou inativação de substâncias carcinogênicas e a estimulação do sistema imunológico do hospedeiro.

Embora se tenha conhecimento dos benefícios da ingestão de probióticos estudos precisam ainda ser realizados para comprovar a eficácia e a segurança de cada cepa, uma vez que os efeitos probióticos tendem a ser cepa específica, ou seja, o benefício atribuído a uma cepa não se aplica a outra (VANDERHOOF, 2008; FONTANA et al., 2013).

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos**. Atualizado em julho de 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: 10/05/2013.

ARAÚJO, T. F.; FERREIRA, C. L. L. F. The genus *Enterococcus* as probiotic: safety concerns. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Paraná, v. 56 n. 3, p. 457-466, 2013.

ARBOLEYA S., et al. Establishment and development of intestinal microbiota in preterm neonates. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 79, n. 3, p. 763-772, 2012.

ASKARI G. A., et al. Screenings of lactic acid bacteria isolated from dried fruits and study of their antibacterial activity. **Middle-East Journal of Scientific Research**, Pakistan, v. 11, n. 2, p. 209-215, 2012.

ATASSI, F.; SERVIN, A. L. Individual and co-operative roles of lactic acid and hydrogen peroxide in the killing activity of enteric strain *Lactobacillus johnsonii* NCC933 and vaginal strain *Lactobacillus gasseri* KS120.1 against enteric, uropathogenic and vaginosis-associated pathogens. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 304, n. 1, p. 29-38, 2010.

AXELSSON, L. T. L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. **Lactic acid bacteria**. 3rd Edition. New York: Marcel Dekker, 2004, p. 1-6.

AYENI, F. A., et al. Evaluation of the functional potential of *Weissella* and *Lactobacillus* isolates obtained from Nigerian traditional fermented foods and cow's intestine. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 147, n. 2, p. 97-104, 2011.

BARBOSA, F. H. F. et al. Probióticos – microrganismos a favor da vida. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Paraíba, v. 11, n. 1, p. 11-21, 2011.

BERNARDEAU, M.; VERNOUX, J. P.; GUEGUEN, M. Probiotic properties of two *Lactobacillus* strains in vitro. The Journal **Milchwissenschaft**, Munchen, v. 56, n. 12, p. 663-667, 2001.

BERNARDEAU, M. et al. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 126, n. 3, p. 278-285, 2008.

BOSCH, M. et al. Probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* CECT 7315 and CECT 7316 isolated from faeces of healthy children. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford v. 54, n. 3, p. 240-246, 2012.

BRUNO, L. M. **Manual de Curadores de Germoplasma – Micro-organismos: Bactérias Ácido-Lácticas**. Brasília, DF. 2011. Disponível em: <<http://www.cenargen.embrapa.br/curadorias/docs/manuais/doc336-151.pdf>>. Acesso em: 20/05/2013.

CABRERA-RUBIO, R. et al. The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. **American Journal of Clinical Nutrition**, England, v. 96, n. 3, p. 544-51, 2012.

CHAPMAN, C. M.; GIBSON, G. R.; ROWLAND, I. Health benefits of probiotics: are mixtures more effective than single strains? **European Journal of Nutrition**, England, v. 50, n. 1, p. 1-17, 2011.

CHIODA, T. P. et al. Inibição do crescimento de *Escherichia coli* isolada de Queijo “Minas Frescal” por *Lactobacillus acidophilus*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 2, p. 583-585, 2007.

COLLADO, M. C. et al. Maternal weight and excessive weight gain during pregnancy modify the immunomodulatory potential of breast milk. **Pediatric Research**, Baltimore, v. 72, n. 1, p. 77-85, 2012.

COTTER, D. P.; HILL, C.; ROSS, R. P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 3, n. 10, p. 777-778, 2005.

DANIELSEN, M.; WIND, A. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 82, n. 1, p. 1-11, 2003.

DEEGAN, L. H. et al. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. **International Dairy Journal**, England, v. 16, n. 9, p. 1058-1071, 2006.

DENIPOTE, F. G.; TRINDADE, E. B. S. M.; BURINI, R. C. Probióticos e prebióticos na atenção primária ao câncer de cólon. **Arquivos de Gastroenterologia**, São Paulo, v. 47, n. 1, p. 93-98, 2010.

DE VOS, W. M. Systems solutions by lactic acid bacteria: from paradigms to practice. **Microbial Cell Factories**, Netherlands, v. 10, n. 1, p. 1-13, 2011.

DIAZ-ROPERO, M. P. et al. Two *Lactobacillus* strains, isolated from breast milk, differently modulate the immune response. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 102, n. 2, p. 337-343, 2007.

EL-GAWAD, I. A. A. et al. The hypocholesterolaemic effect of milk yoghurt and soy-yoghurt containing bifidobacteria in rats fed on a cholesterol-enriched diet. **International Dairy Journal**, Barking, v. 15, n. 1, p. 37-44, 2005.

EMERENINI, E. C. et al. *In vitro* studies on antimicrobial activities of lactic acid bacteria isolated from fresh vegetables for biocontrol of tomato pathogens. **British Microbiology Research Journal**, Gurgaon, v. 4, n. 3, p. 351-359, 2014.

ERKKILA, S.; PETAJA, E. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. **Meat Science**, Oxford, v. 55, n. 3, p. 297-300, 2000.

EUZÉBY, J. P. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature – Genus *Enterococcus*. 2011. Disponível em: <http://www.bacterio.net/enterococcus.html>> Acesso em: 01/05/2015.

FAO/WHO: **Report Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria**, 2001. Disponível em: <

<http://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512e/a0512e00.pdf>>. Acesso em: 20/04/2013.

FELIS, G. E.; DELLAGIO, F. Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. **Current Issues Intestinal Microbiology**, Wymondham, v. 8, n. 2, p. 44-61, 2005.

FERNÁNDEZ, L. et al. The human milk microbiota: Origin and potential roles in health and disease. **Pharmacological Research**, London, v. 69, n. 1, p. 1-10, 2013.

FLINT, H. J. et al. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 6, n. 2, p. 121-131, 2008.

FONTANA, L. et al. Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. **British Journal of Nutrition**, London, v. 109, n. 2, p. 35-50, 2013.

FRANCIOSI, E. et al. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. **International Dairy Journal**, Barking, v. 19, n. 1, p. 3-11, 2009.

FRANZ, C. M. A. P. et al. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 151, n. 2, p.125-140, 2011.

FUSCO, V. et al. The genus *Weissella*: taxonomy, ecology and biotechnological potential. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 6, n. 155, p. 1-22, 2015.

GAGNON, M. et al. In vitro inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 by bifidobacterial strains of human origin. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 92, n. 1, p. 69-78, 2004.

GIRAFFA, G. Studying the dynamics of microbial population during food fermentation. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 28, n. 2, p. 251-260, 2004.

GIRAFFA, G.; CHANISHVILLI, N.; WIDYASTUTI, Y. Importance of Lactobacilli in food and feed biotechnology. **Research in Microbiology**, v. 6, n. 6, p. 1-8, 2010.

GLOBAL PROBIOTICS MARKET. **Market & Market**. 2014. Disponível em: <<http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/probiotic-market-advanced-technologies-and-global-market-69.html>>. Acesso em: 26/01/2015.

GOH, Y. J.; KLAENHAMMER, T. R. Genomic features of *Lactobacillus* species. **Frontiers in Bioscience**, Tampa, v. 14, n. 1, p. 1362-1386, 2009.

GONÇALVES, S. M. L. **Identificação e caracterização de bactérias do ácido láctico isoladas de um produto cárneo fermentado tradicional e do ambiente fabril**. 2009. 80f. Dissertação (Mestrado em Segurança Alimentar) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade técnica de Lisboa, Lisboa, 2009.

GONZÁLEZ, R. et al. Breast Milk and Gut Microbiota in African Mothers and Infants from an Area of High HIV Prevalence. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 11, p. 1-9, 2013.

GOTCHEVA, V. et al. Assessment of potencial probiotic properties of lactic acid bacteria and yeast stains. **Food Biotechnology**, United Kingdom, v. 16, n. 3, p. 211-225, 2002.

GUEDES NETO, L. G. et al. Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a microrganismos indicadores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, n. 2, p. 245-250, 2005.

HAJIKHANI, R.; BEYATLI, Y.; ASLIM, B. Antimicrobial activity of enterococci strains isolated from white cheese. **International Journal of Dairy Technology**, United Kingdom, v. 60, n. 2, p. 105-108, 2007.

HEW, C. M.; MAHER, K.; VOGEL, R. F. Expression of virulence-related genes by *Enterococcus faecalis* in response to diferente environments. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 30, n. 4, p. 257-267, 2007.

HOLZAPFEL, W. H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre and probiotics. **Food Research International**, Malaysia, v. 35, n. 2-3, p. 109-116, 2002.

HU, Y. et al. Dietary *Enterococcus faecalis* lab31 improves growth performance, reduces Diarrhea, and increases fecal *Lactobacillus* number of weaned piglets. **Plos One**, San Francisco, v. 24, n. 1, p.1-16, 2015.

INÊS A. et al. Revisão: as bactérias do ácido láctico do vinho – parte I. **Ciência Técnica Vitivinícola**, Portugal, v. 23, n. 2, p. 81-96, 2008.

JEURINK, P. V. et al. Human milk: a source of more life than we imagine. **Beneficial Microbes**, Netherlands, v. 4, n. 1, p. 17-30, 2013.

KAJANDER, K. et al. Effects of multispecies probiotic supplementation on intestinal microbiota in irritable bowel syndrome. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 26, n. 3, p. 463-473, 2007.

KAJANDER, K. et al. Clinical trial: multispecies probiotic supplementation alleviates the symptoms of irritable bowel syndrome and stabilizes intestinal microbiota. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 27, n. 1, p. 48-57, 2008.

KANG, M. S.; NA, H. S.; OH, J. S. Coaggregation ability of *Weissella cibaria* isolates with *Fusobacterium nucleatum* and their adhesiveness to epithelial cells. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 253, n. 2, p. 323-329, 2005.

KARPINSKI, T, M.; SZKARADKIEWICZ, A. K. Characteristic of Bacteriocines and their Application. **Polish Journal of Microbiology**, Poland, v. 62, n. 3, p. 223-235, 2013.

KAZEMIPOOR, M. et al. Screening of antibacterial activity of acid lactic bacteria isolated from fermented vegetables against food borne pathogens. **Archives des Sciences**, Switzerland, v. 65, n. 6, p. 453-466, 2012.

KLAENHAMMER, T. R. et al. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. **FEMS Microbiology Letters**, v. 29, n. 3, p. 393-409, 2005.

KOMATSU, T. R.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 44, n. 3, p. 329-347, 2008.

KOOP-HOOLIHAM, L. Prophylactic and Therapeutic: Uses of Probiotics – A review. **Journal of the American Dietetic Association**, Chicago, v. 101, n. 2, p. 229-241, 2001.

KOROPATKIN, N. M.; CAMERON, E. A.; MARTENS, E. C. How glycan metabolism shapes the human gut microbiota. **Nature Reviews Microbiology**, London, v.10, n. 5, p. 323-335, 2012.

KOSIN, B.; RAKSHIT, S. K. Microbial and Processing Criteria for Production of Probiotics: A Review. **Food Technology and Biotechnology**, Croatia, v. 44, n. 3, p. 371-379, 2006.

KURITZA, L. N. et al. Probióticos a base de *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 no controle da *Salmonella* Minnesota em frangos de corte. In: XXII CONGRESSO LATINO AMERICANO DE AVES, 2011, Buenos Aires. **Abstract...** Buenos Aires: 2011. Disponível em: < <http://pt.engormix.com/MA-avicultura/saude/artigos/probioticos-base-enterococcus-faecium-t544/165-p0.htm>>. Acesso em: 20 de maio de 2015.

LARA-VILLOSLADA, F. et al. Beneficial effects of probiotic bacteria isolated from breast milk. **British Journal of Nutrition**, v. 98, n. 1, p. 96-100, 2007.

LAUKOVÁ, A. et al. Properties of *Enterococcus thailandicus* isolates from beavers. **African Journal of Microbiology Research**, Nigeria, v. 7, n. 28, p. 3569-3574, 2013.

LERTWORAPREECHA, L.; POONKU, K.; CHALERMCHIAKIT, T. Selection of potential *Enterococcus faecium* isolated from Thai native chicken for probiotic use according to the in vitro properties. **Songklanakarian Journal of Science and Technology**, Hay Tai, v. 33, n. 1, p. 9-14, 2011.

LEROY, F.; DE VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science & Technology**, United Kingdom, v. 15, n. 2, p. 67-78, 2004.

LESBROS-PANTOFLICKOVA, D.; CORTHÉSY-THEULAZ, I.; BLUM, A. L. *Helicobacter pylori* and probiotics. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 137, n. 3, p. 812-818, 2007.

LIMA, C. D. L. C. et al. Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Minas Gerais, v. 61, n. 1, p. 266-272, 2009.

LIN, H. C. et al. Oral probiotics reduce the incidence and severity of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. **Pediatrics**, Oxford, v. 115, n. 1, p. 1-4, 2005.

MAINVILLE, I.; ARCAND, Y.; FARNWORTH, E. R. A dynamics model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 99, n. 3, p. 287-296, 2005.

MALDONADO, J. et al. Human milk probiotic *Lactobacillus fermentum* CECT5716 reduces the incidence of gastrointestinal and upper respiratory tract infections in infants. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, New York, v. 54, n. 1, p. 55-61, 2012.

MARAGKOUDAKIS, P. A. et al. Functional properties of novel protective lactic acid bacteria and application in raw chicken meat against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 130, n. 3, p. 219-226, 2009.

MARTÍN, R. et al. Cultivation-independent assessment of the bacterial diversity of breast milk among healthy women. **Research in Microbiology**, Italy, v. 158, n. 1, p. 31-37, 2007.

MARTÍN, V. et al. Sharing of bacterial strains between breast milk and infant feces. **Journal of Human Lactation**, United States, v. 28, n. 1, p. 36-44, 2012.

MCGUIRE, M. K.; MCGUIRE, M. A. Human Milk: Mother Nature's Prototypical Probiotic Food? **Advances in Food and Nutrition**, San Diego, v. 6, n. 1, p. 112-123, 2015.

MEHANNA, N. S. H. et al. Assessment of Potential Probiotic Bacteria Isolated from Breast Milk. **Middle-East Journal of Scientific Research**, Pakistan, v. 14, n. 3, p. 354-360, 2013.

MOHAMED, J. A.; HUANG, D. B. Biofilm formation by enterococci. **Journal of Medical Microbiology**, Germany, v. 56, n. 12, p. 1581-1588, 2007.

MORAES, P. M. **Identificação molecular de bactérias ácido lácticas isoladas de leite cru e queijo, e pesquisa de genes de bacteriocinas**. 2011. 76 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

MORAIS, M. B.; JACOB, C. M. A. O papel dos probióticos e prebióticos na prática pediátrica. **Jornal de Pediatria**, Porto Alegre, v. 82, n. 5, p. 189-197, 2006.

MORENO, M. R. F. et al. The role and application of enterococci in food and health. **International Journal Food Microbiology**, Amsterdam, v. 106, n. 1, p. 1-24, 2006.

MUÑOZ-QUEZADA, S. et al. Isolation, identification and characterisation of three novel probiotic strains (*Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 and *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036) from the faeces of exclusively breast-fed infants. **British Journal of Nutrition**, New York, v. 109, n. 2, p. 51-62, 2013.

NEAMTU, B. et al. Identification of probiotic strains from human milk in breastfed infants with respiratory infections. **Acta Universitatis Cibiniensis Series E: Food Technology**, Poland, v. 16, n. 2, p. 73-84, 2014.

NETO, M. A. Aleitamento materno e infecção ou da importância do mesmo na sua prevenção. **Acta Pediátrica Portuguesa**, Portugal, v. 1, n. 37, p. 6-23, 2006.

OGIER, J. C.; SERROR, P. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Enterococcus* genus. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 126, n. 3, p. 291-301, 2008.

OLIVARES, M. et al. Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 101, n. 1, p. 72-79, 2006a.

OLIVARES, M. et al. Oral administration of two probiotic strains, *Lactobacillus gasseri* CECT5714 and *Lactobacillus coryniformis* CECT5711, enhances the intestinal function of healthy adults. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 107, n. 2, p. 104-111, 2006b.

OLIVEIRA, C. P.; SILVA, J. A. Leite fermentado probiótico e suas implicações na saúde. **Revista Verde**, Mossoró, v. 6, n. 3, p. 25-31, 2011.

OUOBA, L. I. I.; LEI, V.; JENSEN, L. B. Resistance of potencial probiotic lactic acid bacteria and of African and European origin to antimicrobials: Determination and transferability of the resistance genes to other bacteria. **International Journal Food Microbiology**, Amsterdam, v. 121, n. 2, p. 217-224, 2008.

PANESAR, P. S. et al. Bioutilisation of whey for lactic acid production. **Food Chemistry**, Barking, v. 105, n. 1, p. 1-14, 2007.

PANGALLO, D. et al. Assessment of environmental enterococci: bacterial antagonism, pathogenic capacity and antibiotic resistance. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 94, n. 4, p. 555-562, 2008.

PARK, J. A. et al. Anti-obesity effect of kimchi fermented with *Weissella koreensis* OK1-6 as starter in high-fat diet-induced obese C57BL/6J mice. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 113, n. 6, p. 1507-1516, 2012.

PATEL, S.; GOYAL, A. Functional oligosaccharides: production, properties and applications. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 27, n. 5, p. 1119-1128, 2011.

PERAN, L. et al. A comparative study of the preventative effects exerted by two probiotics, *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum*, in the trinitrobenzenesulfonic acid model of rat colitis. **British Journal of Nutrition**, London, v. 97, n. 1, p. 96-103, 2007.

PÉREZ-CANO, F. J; DONG, H.; YAQOUB, P. In vitro immunomodulatory activity of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 and *Lactobacillus salivarius* CECT5713: two probiotic strains isolated from human breast milk. **Inmunobiology**, Stuttgart, v. 215, n. 12, p. 996-1004, 2010.

PIMENTEL, L. L. et al. Assessment of safety of enterococci isolated throughout traditional Terrincho cheesemaking: virulence factors and antibiotic susceptibility. **Journal Food Protection**, United States, v. 70, n. 9, p. 2161-2167, 2007.

PINTO, M. G. V. et al. *Lactobacillus* spp. in vitro probiotics properties from human faeces and traditional fermented products. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 109, n. 3, p. 1-10, 2006.

PRISCIANDARO, L. et al. Probiotics and Their Derivatives as Treatments for Inflammatory Bowel Disease. **Inflammatory Bowel Disease**, Malden, v. 15, n. 12, p. 1906-1914, 2009.

RASTALL, R. A.; GIBSON, G. R. Recent developments in prebiotics to selectively impact beneficial microbes and promote intestinal health. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 32, p. 42-46, 2014.

ROSS, P. R; MORGAN, S.; HILL, C. Preservation and fermentation: past, present and future. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 79, n. 1-2, p. 3-16, 2002.

ROSSI, E. A et al. Efeito de um novo produto fermentado de soja sobre lípidos séricos de homens adultos normocolesterolêmicos. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v. 53, n. 1, p. 47-5, 2003.

ROSTAGNO, H. S. et al. Utilização de probióticos e prebióticos em aves. In: FERREIRA, C. L. L. F. **Prebióticos e Probióticos**: atualização e prospecção. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2003, 205p.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, n. 1, p. 1-15, 2006.

SAARELA, M. et al. Probiotic bacteria: Safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, United Kingdom, v. 84, n. 3, p. 197-215, 2000.

SALVATIERRA, M. et al. Evaluación del efecto de cultivos prebióticos presentes en yogurt sobre *Staphylococcus aureus* y la producción de termonucleasa. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v. 54, n. 3, p. 298-302, 2004.

SANTOS, A. C. A. L. **Uso de Probióticos na recuperação da flora intestinal, durante antibioticoterapia**. 2010. 30 f. Trabalho de Conclusão do Curso (Especialização em Terapia Nutricional) - Instituto de Nutrição, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

SAVADOGO, A. et al. Antimicrobial Activities of Lactic Acid Bacteria Strains Isolated from Burkina Faso Fermented Milk. **Pakistan Journal of Nutrition**, Pakistan, v. 3, n. 3, p. 174-179, 2004.

SERNA-COCK, L. et al. Cellular response of the bovine mammary gland after *Weissella confusa* infusion to control *Streptococcus agalactiae*. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, Colombia, v. 26, n. 4, p. 280-287, 2013.

SETTANNI, L.; MOSCHETTI, G. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. **Food Microbiology**, Amsterdam, v. 27, n. 6, p. 691-697, 2010.

SHAH, N. P. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy food. **Journal Dairy Science**, v.83, n. 4, p.894-907, 2000.

SHIBOLET, O. et al. Variable response to probiotics in two models of experimental colitis in rats. **Inflammatory Bowel Diseases**, New York, v. 8, n. 6, p. 399-406, 2002.

SILVA, R. C. et al. Composição centesimal do leite humano e caracterização das propriedades físico-químicas de sua gordura. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 7, p. 1535-1538, 2007.

SIVIERI, K. et al. Demonstration of the cellular viability and safety of *Enterococcus faecium* CRL 183 in long-term experiments. **Lait**, Paris, v. 87, n. 1, p. 59-69, 2007.

SIVIERI, K. et al. Probiotic *Enterococcus faecium* CRL 183 inhibit chemically induced colon cancer in male *Wistar* rats. **European Food Research and Technology**, Germany, v. 228, n. 2, p. 231-237, 2008.

SOLIS, G. et al. Establishment and development of lactic acid bacteria and bifidobacteria microbiota in breastmilk and the infant gut. **Anaerobe**, v. 16, n. 3, p. 307–310, 2010.

SOTO, A. et al. Lactobacilli and Bifidobacteria in human breast milk: influence of antibiotherapy and other host and clinical factors. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, New York, v. 59, n. 1, p. 78-88, 2014.

STOMPFOVÁ, V. et al. Application of potential probiotic *Lactobacillus fermentum* AD1 strain in healthy dogs. **Anaerobe**, v. 12, n. 2, p. 1-5, 2005.

SUJATHA, S.; PRAHARAJ, I. Glycopeptide resistance in gram-positive cocci: a review. **Interdisciplinary Perfectives on Infectious Diseases**, Cairo, v. 2012, p. 1-10, 2012.

TAMANINI, R. et al. Antagonistic activity against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* from lactic acid bacteria isolated from raw milk. **Ciências Agrárias**, Recife, v. 33, n. 5, p. 1877-1886, 2012.

TANASUPAWAT, S.; SUKONTASING, S.; LEE, J. K. *Enterococcus thailandicus* sp. nov., isolated from fermented sausage ('mum') in Thailand. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, England, v. 58, n. 7, p. 1630-1634, 2008.

TARASOVA, E. et al. The influence of probiotic *Enterococcus faecium* strain L5 on the microbiota and cytokines expression in rats with dysbiosis induced by antibiotics. **Beneficial Microbes**, Netherlands, v. 1, n. 3, p. 265-270, 2010.

TEJERO-SANIÑENA, S. et al. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a range of probiotics against pathogens: evidence for the effects of organic acids. **Anaerobe**, v. 18, n. 5, p. 530-538, 2012.

THAMER, K. G.; PENNA, A. L. B. Caracterização de Bebidas Lácteas Funcionais Fermentadas por Probióticos e Acrescidas de Prebiótico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 589-595, 2006.

TRENTO, F. K. H. S. **Leite humano como fonte de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas e com potencial probiótico**. 2012. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

URNAU, D. et al. Isolamento, identificação e caracterização quanto à resistência ao pH ácido e presença de sais biliares de cepas probióticas de leites fermentados comerciais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Minas Gerais, v. 67, n. 384, p. 5-10, 2012.

VALENZUELA, A. S. et al. Virulence factors, antibiotic resistance, and bacteriocins in enterococci from artisan foods of animal origin. **Food Control**, Netherlands, v. 20, n. 4, p. 381-385, 2009.

VALENZUELA, A. S. et al. Isolation and identification of *Enterococcus faecium* from seafoods: antimicrobial resistance and production of bacteriocin-like substances. **Food Microbiology**, Amsterdam, v. 27, n. 7, p. 955-961, 2010.

VANDERHOOF, J. A. Probiotics in Allergy Management. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, Philadelphia, v. 47, n. 2, p. 38-40, 2008.

VOS, P. et al. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**: The Firmicutes Volume Three, 2nd Ed. New York: Springer Science & Business Media, 2011, 1450p.

WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANISATION (WGO). **Probióticos e Prébióticos**. Milwaukee, 2008. Disponível em: <http://www.worldgastroenterology.org/assets/downloads/pt/pdf/guidelines/19_probiotics_prebiotics_pt.pdf> Acesso em: 04/05/2013.

XAFRANSKI, H. **Verificação de bactérias probióticas em leite materno provenientes do Banco de Leite Humano (BHL) de Blumenau**. 2010. 21 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, 2010.

YAVUZDURMAZ, H. **Isolation, characterization, determination of probiotic properties of lactic acid bacteria from human milk.** 2007. 80 f. (Master of Science in Food Engineering) - Graduate School of Engineering and Sciences of Izmir Institute of Technology, Izmir, 2007.

YOSHIYAMA, M. et al. Inhibition of *Paenibacillus larvae* by lactic acid bacteria isolated from fermented materials. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 112, n. 7, p. 62-67, 2013.

CAPÍTULO 2

Propriedades probióticas de bactérias lácticas isoladas de leite humano

Este artigo será submetido à Journal of Applied Microbiology

Propriedades probióticas de bactérias lácticas isoladas de leite humano

Nayara Alves Reis¹, Norma Suely Evangelista-Barreto¹, Margarete Alice Fontes Saraiva², Elizabeth Amélia Alves Duarte¹, Elaine Araújo de Carvalho¹, Brenda Borges Vieira¹

¹Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Brasil

²Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Biológicas e Exatas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Brasil

Correspondência: Norma Suely Evangelista-Barreto, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Brasil.

E-mail: nsevelista@ufrb.edu.br

RESUMO

Introdução: O objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar bactérias lácticas isoladas de leite humano, com ênfase nas propriedades probióticas.

Métodos e Resultados: As culturas foram testadas quanto a capacidade de inibir *Enterococcus faecalis*, *Salmonella* Enteretidis, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, suscetibilidade a antimicrobianos, tolerância a acidez e a presença de sais biliares. Os isolados foram identificados por meio de testes bioquímicos e sequenciamento do gene 16S rRNA. A maioria dos isolados Gram-positivos e catalase negativa pertence ao gênero *Enterococcus* (84,6%). Os isolados apresentaram inibição sobre *E. faecalis* e *S. Enteretidis*, 97% sobre *L. monocytogenes* e *S. aureus* e 78,8% contra *E. coli*. O teste de suscetibilidade a nove antibióticos mostrou que a maior parte dos isolados apresentou resistência a gentamicina (50%) e vancomicina (47%). Doze isolados selecionados apresentaram crescimento em pH 3,0 e a 0,1% de sais biliares. Dois isolados *E. faecalis* (F1) e *W. confusa*, (F8) apresentaram resistência aos valores mais baixos de pH, 2,5 e 2,0, respectivamente.

Conclusões: A partir do leite humano foi possível isolar bactérias lácticas com potencial para serem utilizadas como probióticos.

Significado e impacto do estudo: As bactérias lácticas isoladas de lactação leite humano têm potencial uso como probióticos.

Palavras-chave: antagonismo, leite humano, bactérias lácticas, *Enterococcus*, probióticos.

ABSTRACT

Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from human milk

Aims: The objective of this study was to identify and characterize lactic acid bacteria isolated from human milk, with emphasis on probiotic properties.

Methods and Results: Strains were tested for the ability to inhibit *Enterococcus faecalis*, *Salmonella* Enteritidis, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, susceptibility to antimicrobial agents, acid and bile salts tolerance. The isolates were identified by biochemical tests, and 16S rRNA. Most Gram-positive and catalase negative isolates belong to the genus *Enterococcus* (84.6%). The isolates showed inhibition on *E. faecalis* and *Salm.* Enteritidis, 97% of *L. monocytogenes* and *Staph. aureus* and 78.8% against *E. coli*. The susceptibility test to nine antibiotics showed that most of the isolates were resistant to gentamicin (50%) and vancomycin (47%). Twelve selected isolates grew at pH 3.0 and 0.1% of bile salts. Two *E. faecalis* isolates (F1) and *W. confuse* (F8) showed resistance to lower pH values, 2.5 and 2.0 respectively.

Conclusions: It was possible to isolate lactic acid bacteria with potential for use as probiotics from human milk.

Significance and Impact of the Study: The lactic acid bacteria isolated from lactating human milk have potential use as probiotics.

Key-words: Antagonism, human milk, lactic bacteria, *Enterococcus*, probiotics.

INTRODUÇÃO

O leite humano (LH) é um alimento altamente nutritivo e fonte de micro-organismos para o desenvolvimento e composição inicial da microbiota intestinal do recém-nascido, um importante mecanismo de defesa do organismo contra doenças (González *et al.* 2013). A comunidade microbiana no LH é influenciada pelos micro-organismos presentes no intestino da mãe, pois eles são transportados por células dendríticas e macrófagos por meio do sistema linfático até as glândulas mamárias (Jeurink *et al.* 2013). As bactérias comumente isoladas do LH pertencem aos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (Martín *et al.* 2012; Jeurink *et al.* 2013) e são potencialmente probióticas para o intestino infantil (Martín *et al.* 2007).

Bactérias probióticas são definidas como "micro-organismos vivos que administrados em quantidades adequadas conferem benefício à saúde do hospedeiro" (FAO/WHO, 2001). As bactérias do ácido láctico (BAL) probióticas colonizam e predominam no intestino dos recém-nascidos devido as suas características fisiológicas e a presença de promotores de crescimento no LH, como os oligossacarídeos (Martín *et al.* 2007; Arboleya *et al.* 2012).

As BAL isoladas do LH tem sido atrativas quanto a sua aplicação probiótica, por ser de origem humana e poder residir no intestino (Martin *et al.* 2004). A produção de substâncias antimicrobianas, competição por nutrientes, aderência ao epitélio e estimulação do sistema imune são alguns dos mecanismos envolvidos no efeito probiótico das bactérias (Olivares *et al.* 2006).

Dentre os critérios usados para selecionar um micro-organismo probiótico, ser seguro (Generally recognized as safe - GRAS) é o mais importante (Barbosa *et al.* 2011). A seleção de probióticos inclui ainda a capacidade de sobrevivência a acidez do estômago e aos sais biliares, adesão à mucosa do intestino e inibição de patógenos (Gupta and Garg, 2009).

Embora seja conhecido os benefícios da ingestão de bactérias probióticas, os efeitos benéficos e as características probióticas são específicos para cada cepa. Dessa forma, estudos devem ser realizados para que os candidatos a probióticos sejam corretamente selecionados e as suas propriedades probióticas sejam comprovadas (Shokryazdan *et al.* 2014).

Diante do exposto e tendo em vista o papel do leite humano como fonte de bactérias com potencial probiótico, esse trabalho teve como objetivo isolar e identificar bactérias lácticas que apresentem características probióticas a fim de que possam ser utilizadas no desenvolvimento de produtos funcionais.

MATERIAL e MÉTODOS

Preparo das amostras de leite humano e isolamento de bactérias lácticas

Treze amostras de leite humano cru de treze nutrizes foram obtidas no Banco de Leite Humano (BLH), Hospital Clériston Andrade em Feira de Santana, Bahia, Brasil. Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (no. de protocolo 19776313.6.0000.0056-03/12/2013).

As amostras de leite após diluição decimal seriada em água peptonada 0,1% foram inoculadas em agar MRS (De Man, Rogosa e Sharpe) acrescido de

0,004% de púrpura de bromocresol e 0,5% de carbonato de cálcio e incubadas a 37°C por 48 h.

Micro-organismos e condições de crescimento

As BAL isoladas foram cultivadas em agar MRS a 37°C por 24 h e as bactérias indicadoras *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Listeria monocytogenes* CERELA, *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 e *Salmonella* Enteritidis foram cultivados em caldo BHI a 37°C por 24 h.

Identificação preliminar das bactérias lácticas

Identificação preliminar foi realizada usando coloração de Gram, atividade de catalase, fermentação de carboidratos (glicose, manitol, sorbitol e arabinose), crescimento em diferentes temperaturas (10°C e 45°C) e tolerância em meio contendo 6,5% de NaCl (Klein, 2003).

Extração de DNA e PCR

As BAL foram cultivadas *overnight* em caldo MRS a 37°C e extraído o DNA usando Kit Wizard[®] SV Genomic DNA Purification System (Promega, USA) para bactérias Gram-positivas. A integridade e a quantidade do DNA foram verificadas usando eletroforese em gel de agarose a 0,8% e Qubit[®] 2.0 Fluorometer (Invitrogen, USA), respectivamente e o PCR obtido em termociclador Veriti Thermal Cycler PCR (Applied Biosystems) usando Master Mix e Taq DNA polimerase (Promega, USA). Os *primers* foram sintetizados pela Integrated DNA Technology, Inc (Brasil). Os produtos de PCRs foram purificados usando kit Illustra[®] GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare Life Sciences, Madison, USA).

Identificação molecular das bactérias lácticas

As BAL selecionadas foram identificadas pelo sequenciamento do gene 16S rRNA. A amplificação por PCR foi realizada usando *primers* universais 8fn - 5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3' e 1492r - 5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3' (Weisburg *et al.* 1991) nas seguintes condições: temperatura inicial de desnaturação 95°C/3 min.; 30 ciclos de amplificação a 95°C/1 min.; 52°C/1 min.; 72°C/2 min. e temperatura de extensão final de 72°C/10 min.. O sequenciamento foi realizado na empresa ACTGene Análises Moleculares LTDA e as sequências analisadas com o programa Sequencher 4.1.4 (Gene Code Corporation). As sequências obtidas foram analisadas por homologia com as constadas em bancos de dados no programa BLAST do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Altschul *et al.* 1990).

Atividade antagônica das bactérias lácticas

A atividade inibitória das BAL foi verificada pela formação de halo de inibição sobre as culturas indicadoras (Ryan *et al.* 1996). O espectro de inibição foi definido da seguinte forma: + fraca inibição (halos até 4 mm de diâmetro), ++ média inibição (halos de 5 a 9 mm de diâmetro) e +++ forte inibição (halos a partir de 10 mm de diâmetro) (Chioda *et al.* 2007). Ação antagônica também foi verificada entre as BAL.

Suscetibilidade antimicrobiana

Suscetibilidade antimicrobiana foi avaliada pelo método de difusão de discos em agar (CLSI, 2012) usando os antimicrobianos ampicilina (10 µg),

amoxicilina e ácido clavulânico (10 µg), clindamicina (2 µg), cloranfenicol (30 µg), eritromicina (5 µg), gentamicina (10 µg), imipinem (10 µg), tetraciclina (30 µg) e vancomicina (30 µg) (Laborclin®).

Sobrevivência das bactérias lácticas expostas as condições de acidez e diferentes concentrações de sais biliares

As BAL foram inoculadas em caldo MRS em diferentes valores de pH 2,0, 2,5, 3,0 e 7,0 (controle) e em caldo MRS contendo 0,05%, 0,1% e 0,5% (p/v) de sais biliares mistos e sem sais biliares (controle) e incubadas a 37°C por 3 h. Alíquotas de cada bactéria foram semeadas em agar MRS (37°C/24 h) e a sobrevivência dos isolados verificada pelo crescimento das colônias. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

RESULTADOS

De um total de 150 bactérias isoladas, apenas 33 colônias apresentaram características típicas de BAL, ou seja, forma circular, borda e estrutura lisa, com brilho e cor amarela, indicativo da produção de ácido, devido o indicador ácido básico (púrpura de bromocresol) presente no meio de cultura, coloração de Gram positiva e atividade de catalase negativa.

Nos testes fenotípicos a maioria dos isolados foram classificados pertencendo ao gênero *Enterococcus* (26/33). Os demais isolados, (07/33) foram classificados nos gêneros *Vagococcus*, *Aerococcus*, *Helcococcus* ou *Alloiococcus*. Essa classificação se deve a ausência de crescimento dos isolados a 45°C (Tabela 1).

No teste de antagonismo todos os isolados apresentaram forte inibição (halos de inibição >10 mm) sobre *E. faecalis* e *S. Enteritidis*, 97% sobre *L. monocytogenes* e *S. aureus* e 78,8% contra *E. coli* (Tabela 2). Apenas um isolado (denominado B2) não apresentou atividade inibitória sobre dois micro-organismos indicadores (Tabela 2), não sendo selecionada para dar continuidade aos próximos ensaios. Não foi observado efeito antagônico entre as BAL.

No teste de suscetibilidade antimicrobiana maior percentual de resistência das BAL foi verificado para a gentamicina, vancomicina e ampicilina (Tabela 3). Devido a resistência observada a vancomicina, apenas 17 isolados foram selecionados para os testes de tolerância a acidez e sais biliares. Setenta e um por cento dos isolados apresentaram crescimento em pH 3,0. Dois isolados (F1 e F8) apresentaram crescimento em pH 2,5 e 2,0 e 1 isolado (F8) apresentou crescimento em pH 2,0 (Figura 1). Dez isolados apresentaram crescimento em meio contendo 0,05% e 0,1% de sais biliares. Três isolados apresentaram crescimento na concentração de 0,5% de sais biliares (Figura 1). Os isolados A, B1, B3, B4 E E7 não apresentaram crescimento para o pH e sais biliares (Figura 1).

Com base nos resultados obtidos, 12 isolados foram selecionados para identificação molecular a nível de espécie por meio do sequenciamento da região 16S rRNA (Tabela 4). As análises das sequências dos isolados utilizando o programa BLAST detectaram identidades de 98% a 100%. Dois isolados foram confirmados como *E. faecalis* (E3 e F1), quatro foram identificados como *E. thailandicus* (C4, C5, D1 e D3) e dois como *W. confusa*

(F6 e F8). Dos quatro isolados que poderiam pertencer aos gêneros, *Vagococcus*, *Aerococcus*, *Helcococcus* e *Alloiococcus*, dois foram identificados como *E. durans* (C1, C3) e dois como *E. thailandicus* (C2 e D2) (Tabela 4).

DISCUSSÃO

Pela identificação bioquímica o gênero predominante das BAL isoladas das nutrizes era *Enterococcus*. Ao comparar as sequências do RNA ribossomal 16S dos isolados probióticos com as sequências disponíveis no banco de dados (NCBI), a espécie predominante foi *E. thailandicus*, *E. durans* e *E. faecalis*. Com a análise molecular foi possível identificar ainda duas cepas de *W. confusa*. Atualmente, a análise molecular tem sido útil em promover a identificação definitiva dos micro-organismos, visto que quando se utiliza um número limitado de testes fenotípicos os resultados nem sempre são precisos, pois os caracteres fenotípicos podem não ser expressos ou podem ser difíceis de serem classificados (Farber *et al.* 2001; Marin *et al.* 2006).

A predominância da espécie *E. thailandicus* nas nutrizes foi uma surpresa visto que são poucas as informações sobre essa espécie, em virtude de ter sido isolada e descrita recentemente apenas em embutidos fermentados e em animais (Tanasupawat *et al.* 2008; Lauková *et al.* 2013). Sequências do gene 16S rRNA mostraram que *E. thailandicus* é filogeneticamente próxima as espécies de *E. hiraе* LMG 6399T, *E. durans* LMG 10746T e *E. faecium* LMG 11423T (Tanasupawat *et al.* (2008). No entanto, ela não foi identificada como pertencente a uma dessas espécies devido ao seu baixo coeficiente de parentesco obtido pela técnica de hibridização DNA/DNA e também pelas

diferentes características fenotípicas, como crescimento em pH 5,0 e ausência de crescimento a 10°C.

Acredita-se que a presença de *W. confusa* se deve as nutrizes que se encontravam no início da amamentação, uma vez que Cabrera-Rubio et al. (2012) relatou esta espécie sendo uma das principais espécies no colostro de mulheres filandeses. *Weisella confusa* tem sido considerada candidata a futuros estudos como probiótico devido a sua atividade antimicrobiana, resistência a baixos valores de pH e aos sais biliares (Serna-Cock et al. 2010; Lee et al. 2012).

A baixa diversidade de gêneros e espécies de BAL isoladas e identificadas neste estudo, pode estar relacionada a composição do LH das lactantes. A composição microbiana do leite materno é influenciada por diferentes fatores como hábitos nutricionais, genética, microbiota intestinal, saúde, peso, tipo de parto, uso de antibióticos e idade gestacional das lactantes. As interações com a microbiota da pele materna também contribuem para moldar a microbiota do leite (Fernández et al. 2013; McGuire and McGuire, 2015). Os constituintes nutricionais do leite (proteínas, sais minerais, vitaminas, ácidos graxos e carboidratos complexos) nos diferentes períodos de lactação também contribuem para a predominância de uma determinada espécie bacteriana no leite materno (González et al. 2013; McGuire and McGuire, 2015).

No presente estudo o gênero *Enterococcus* dominou a microbiota de BAL no leite materno (84,6%), corroborando com alguns trabalhos em outras partes do mundo (Mehanna et al. 2013; Tusar et al. (2014); McGuire and McGuire, 2015).

O teste de antagonismo entre os isolados mostrou que as BAL podem ser utilizadas em consórcios em um mesmo produto probiótico. O uso de vários probióticos em um único produto tem sido uma estratégia mais eficaz do que a utilização de uma única cultura probiótica, devido à soma dos efeitos benéficos de cada cepa (Chapman *et al.* 2011). A capacidade de competição com outros micro-organismos no trato intestinal é uma característica importante para a seleção de probióticos, uma vez que constitui uma forma de controlar ou inibir patógenos entéricos. Além disso, a sua utilização pode ser uma alternativa ao uso de antibióticos no tratamento de infecções intestinais (Shokryazdan *et al.* 2014).

Os 10 isolados de *Enterococcus* (Tabela 4) são candidatos a probióticos, uma vez que inibem dois importantes patógenos entéricos, *L. monocytogenes* e *S. Enteritidis*. Recentemente, culturas de *E. faecalis* isoladas de leite humano inibiram o crescimento de bactérias indicadoras como *E. coli* 0157:H7, *P. aeruginosa*, *Salmonella* spp. (Mehanna *et al.* 2013) e *S. aureus* (Heikkila and Saris, 2003).

Weisella confusa também apresentou atividade antimicrobiana sobre *E. coli*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *S. Enteritidis*. Atividade antimicrobiana de *W. confusa* foi relatada sobre *Helicobacter pylori* (Nam *et al.* 2002), *E. coli* e *K. pneumoniae* (Serna-Cock *et al.* 2013).

A capacidade de algumas BAL em produzir diferentes compostos antimicrobianos é uma das características fisiológicas para reduzir ou inibir o crescimento de patógenos no intestino. Além disso, a produção de altas concentrações de ácido láctico em combinação com sais biliares inibem o

crescimento de bactérias patogênicas Gram-negativas no intestino (Argyri *et al.* 2013).

As bactérias do gênero *Enterococcus* são conhecidas por produzirem compostos inibidores, como bacteriocinas, que inibem bactérias Gram-positivas deterioradoras em alimentos e patógenos intestinais (Tambekar and Bhutada, 2010). Lauková *et al.* (2013) isolaram linhagens de *E. thailandicus* capazes de produzir uma bacteriocina que inibia *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

Para selecionar com segurança bactérias com potencial probiótico é necessário determinar o fenótipo de resistência a antibióticos, assim como a presença de genes que conferem resistência aos mesmos e se esses genes podem ser transferidos para bactérias de outras espécies (Zanirati *et al.* 2015).

O principal fator que tem favorecido a emergência de bactérias resistentes a antimicrobianos, se deve ao seu uso abusivo no tratamento de infecções humanas ou como promotor de crescimento na produção animal (Herrerros *et al.* 2005). A cadeia alimentar é considerada o principal meio de transmissão de bactérias resistentes para humanos. Dessa forma, cepas que possuem genes de resistência que podem ser transmitidos a bactérias patogênicas não devem ser utilizadas como probióticos em alimentos (Klare *et al.* 2007).

O uso de cepas do gênero *Enterococcus* como probiótico tem sido motivo de discussão devido algumas cepas serem virulentas e apresentarem resistência intrínseca a alguns antimicrobianos. Algumas BAL apresentam resistência a algumas classes de antimicrobianos como β -lactâmicos, cefalosporinas, aminoglicosídeos, quinolona, imidazole, nitrofurantoína e

fluoroquinolonas (Herreros *et al.* 2005), sendo a resistência a vancomicina um fator limitante quanto ao seu uso como probiótico (Cruz *et al.*, 2012).

A sobrevivência das cepas as condições adversas prevalentes no trato gastrointestinal, como acidez do estômago e a presença de sais biliares no intestino, é uma característica necessária a toda linhagem probiótica (Muñoz-Quezada *et al.* 2013).

Todos os isolados apresentaram crescimento nas concentrações de 0,05% e 0,1% de sais biliares e pH 3,0. O valor de pH 3,0 tem sido utilizado como padrão para investigar a tolerância de linhagens probióticas a acidez em testes *in vitro* (Shokryazdan *et al.* 2014), em virtude da redução na viabilidade das cepas em pH 2,0 (Bhatt *et al.* 2012). A concentração de sais biliares no intestino humano pode variar de acordo com a dieta e secreção de enzimas pancreáticas (Shokryazdan *et al.* 2014), sendo a concentração média de 0,1% (Begley *et al.* 2005) podendo alcançar 0,5% (Pfeiler and Klaenhammer 2007).

Resultados semelhantes foram relatados por Urnau *et al.* (2012), ao estudarem a resistência de bactérias lácticas em pH 3,0; 2,5 e 2,0 e resistência aos sais biliares a 0,3%, durante 3 e 6 h de exposição e verificarem que houve melhor sobrevivência em pH 3,0.

Apenas dois isolados *E. faecalis* (F1) e *W. confusa* (F8) apresentaram resistência em pH, 2,5 e 2,0, respectivamente. A resistência dos probióticos em baixo pH e aos sais biliares depende muito da espécie (Muñoz-Quezada *et al.* 2013). A capacidade de resistir a presença de sais biliares está relacionada a atividade da enzima BSH presente em bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Enterococcus*. Essa enzima é capaz de diminuir os efeitos tóxicos dos sais

biliares aumentando a sobrevivência das cepas no intestino e com isso seus efeitos benéficos (Argyri *et al.* 2013). A tolerância ao pH ácido de algumas bactérias lácticas está relacionada a presença da enzima ATPase que pode ser encontrada nesse grupo de micro-organismo (Lertworapreecha *et al.* 2011).

Alguns componentes dos alimentos no qual os probióticos estão adicionados tem se mostrado apropriados para a manutenção e proteção de cepas durante sua passagem pelo trato gastrointestinal e exposição ao pH baixo e sais biliares (Argyri *et al.* 2013). Na tentativa de melhorar a viabilidade das cepas probióticas no alimento, pesquisas têm focado na proteção das culturas probióticas durante a produção, armazenamento e passagem do produto pelo trato gastrintestinal (Hungria and Longo, 2009).

Neste estudo, observa-se que o leite materno, proveniente de nutrízes é uma fonte de bactérias lácticas, com propriedades probióticas, como atividade inibitória de patógenos e resistência as condições adversas prevalentes no trato gastrointestinal. O gênero *Enterococcus* foi predominante, destacando-se a espécie *E. thailandicus* uma espécie nova que ainda se tem poucas relatos na literatura.

Entre as bactérias lácticas isoladas, 12 são candidatas aos próximos estudos, como testes *in vitro* de aderência a células CaCo-2, atividade de β -galactosidase, presença de genes e fatores de virulência, viabilidade durante o armazenamento, indução do sistema imune, bem como testes *in vivo* ou dados clínicos, estudos necessários para a utilização segura destes micro-organismos probióticos em alimentos.

AGRADECIMENTOS

Agradecimento a Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela bolsa de mestrado concedida.

CONFLITO DE INTERESSE

Nenhum conflito de interesse declarado.

REFERÊNCIAS

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410.

Arbolea, S., Binetti, A., Salazar, N., Fernández, N., Solís, G., Hernández-Barranco, A., Margolles, A., de Los Reyes-Gavilán, C.G., Gueimonde, M. (2012) Establishment and development of intestinal microbiota in preterm neonates. *FEMS Microbiol. Ecol.* **79**, 763-772.

Argyri, A.A.A, Zoumpopoulou, G.B., Karatzas, K.-A.G.C, Tsakalidou, E.B, Nychas, G.-J. E.D, Panagou, E.Z.D and Tassou, C.C.A. (2013) Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by *in vitro* tests. *Food Microbiol.* **33**, 282-291.

Ayeni, F.A., Sánchez, B., Adeniyi, B.A., Reyes-gavilán, C.G., Margolles, A. and Ruas-Madiedo, P. (2011) Evaluation of the functional potential of *Weissella* and *Lactobacillus* isolates obtained from Nigerian traditional fermented foods and cow's intestine. *Int. J. Food Microbiol.* **147**, 97-104.

Barbosa, F.H.F., Barbosa, L.P.J.L., Bambirra, L.H.S. and Aburjaile, F.F. (2011) Probióticos – microrganismos a favor da vida. *Rev. Biol. Ciên. Terra* **11**, p. 11-21.

Begley, M., Gahan, C.G.M. and Hill, C. (2005). The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**, 625-651.

Bhatt, V.D., Vaidya, Y.H., Kunjadia, P.D. and Kunjadia, A.P. (2012) Isolation and characterization of probiotic bacteria from human milk. *Int. J. Pharm. Sci. and Health Care* **3**, p. 62-70.

Cabrera-Rubio, R., Collado, M.C., Laitinen, K., Salminen, S., Isolauri, E. and Mira, A. (2012) The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *Am. J. Clin. Nutr.* **96**, p. 544-51.

Cauwerts, K., Decostere, A., De Graef, E.M., Haesebrouck, F., Pasmans, F. (2007) High prevalence of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from broilers carrying the *erm(B)* gene. *Avian Pathol* **36**, 395-399.

Chapman, C.M., Gibson, G.R. and Rowland, I. (2011) Health benefits of probiotics: are mixtures more effective than single strains? *Eur. J. Nutr.* **50**, 1-17.

Chioda, T.P., Schocken-Iturrinoll, R.P., Garcia, G.R., Pigatto, C.P., Ribeiro, C.A.M., Ragazzani, A.V.F. (2007) Inibição do crescimento de *Escherichia coli* isolada de Queijo “Minas Frescal” por *Lactobacillus acidophilus*. *Ciênc. Rural* **37**, 583-585.

Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) (2012) *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-second informational supplement*,

31,1-186. Disponível em: <<http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/M100S22E.pdf>>. Acesso: 10/02/2015.

Costa, H.H.S., Souza, M.R., Acúrcio, L.B., Cunha, A.F., Resende, M.F.S. and Nunes, Á.C. (2013) Potencial probiótico *in vitro* de bactérias ácido-láticas isoladas de queijo-de-minas artesanal da Serra da Canastra MG. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* **65**, 1858-1866.

Diez, A.M., Björkroth, J., Jaime, I. and Rovira, J. (2009) Microbial, sensory and volatile changes during the anaerobic cold storage of morcilla de burgos previously inoculated with *Weissella viridescens* and *Leuconostoc mesenteroides*. *Int. J. Food Microbiol.* **131**, 168-177.

Donnet-Hughes, A., Perez, P.F., Doré, J., Leclerc, M., Levenez, F., Benyacoub, J., Serrant, P., Segura-Roggero, I. and Schiffrin, E.J. (2010) Potential role of the intestinal microbiota of the mother in neonatal immune education. *P. Nutr. Soc.* **69**, 407-415.

FAO/WHO (2001) Report Joint FAO/WHO *Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria*. Disponível em: <<http://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512e/a0512e00.pdf>>. Acesso em: 20/04/2013.

Farber, J.M. et al (2001) Molecular typing and differentiation. In: *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* ed. Farber, J.M. et al. pp.127-158. Washington D.C.: APHA.

Fernández, L., Langa, S., Martínez, V., Maldonado, A., Jiménez, E., Martín, R. and Rodríguez, J.M. (2013) The human milk microbiota: Origin and potential roles in health and disease. *Pharmacol. Res.* **69**, p. 1-10.

González, R., Mandomando, I., Fumado, V., Saco, C., Macete, E., Alonso, P. L. and Menéndez, C. (2013) Breast Milk and Gut Microbiota in African Mothers and Infants from an Area of High HIV Prevalence. *Plos One* **8**, 1-9.

Gupta, V. and Garg, R. (2009) Probiotics. *Indian J. Med. Microbiol.* **27**, 202-209.

Heikkilä, M.P. and Saris, P.E. (2003) Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the comensal bacteria of human milk. *J. Appl. Microbiol.* **95**, 471-478.

Herreros, M. A., Sandoval, H., González, L., Castro, J. M., Fresno, J. M. and Tornadijo, M. E. (2005) Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). *Food Microbiol.* **22**, 455-459.

Hungria, T. D. and Longo, P.L. (2009) Viabilidade de *Lactobacillus casei* em alimento probiótico infantil relacionada a vida-de-prateleira. *Rev. Saúde* **3**, 10-15.

Jeurink, P.V., van Bergenhenegouwen, J., Jiménez, E., Knippels, L.M, Fernández, L., Garssen, J., Knol, J., Rodríguez, J.M., Martín, R. (2013) Human milk: a source of more life than we imagine. *Beneficial Microbes* **4**, 17-30, 2013.

Khodayar-Pardo, P., Mira-Pascual, L., Collado, M. C. and Martínez-Costa, C. (2014) Impact of lactation stage, gestational age and mode of delivery on breast milk microbiota. *J. Perinatol.* **34**, 599-605.

Klare, I., Konstabel, C., Wener, C., Huys, G., Vankerckhoven, V., Kahlmeter, G., Hildebrandt, B., Muller-Bertling, S., Witte, W. and Goossens, H. (2007) Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. *J. Antimicrob. Chem.* **59**, 900-912.

Klein, G. (2003) Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *Int. J. Food Microbiol.* **88**, 123-131.

Laborclin 3.ed. (2003) *Tabela de sensibilidade dos discos de antibióticos*. Pinhais: Laborclin Produtos para Laboratório. Ficha para interpretação dos resultados (monodiscos e polidiscos de antibióticos Laborclin).

Lauková, A., Kandričáková, A., Imrichová, J., Stropfová, V., Miltko, R., Kowalik, B. and Belzecki, G. (2013). Properties of *Enterococcus thailandicus* isolates from beavers. *Afr.J. Microbiol. Res.* **7**, 3569-3574.

Lee, K.W., Park, J.Y., Jeong, H.R., Heo, H.J., Han, N.S. and Kim, J.H. (2012) Probiotic properties of *Weissella* strains isolated from human faeces. *Anaerobe* **18**, 96-102.

Lertworapreecha, N., Poonsuk, K. and Chalermchakit, T. (2011) Selection of potential *Enterococcus faecium* isolated from Thai native chicken for probiotic use according to the *in vitro* properties. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* **33** 9-14.

Maldonado, J., Cañabate, F., Sempere, L., Vela, F., Sánchez, A. R., Narbona, E., López-Huertas, E., Geerlings, A., Valero, A. D., Olivares, M. and Lara-Villoslada, F. (2012) Human milk probiotic *Lactobacillus fermentum* CECT5716 reduces the incidence of gastrointestinal and upper respiratory tract infections in

infants. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **54**, 55-61.

Marin, V.A., Lemos, A.A. and Freitas, E.I. (2006) Detecção de patógenos presentes nos alimentos: A falta de padronização e validação de métodos moleculares no Brasil. *Hig. Alim.* **20**, 46-50.

Martín, R., Langa, S., Reviriego, C., Jiménez, E., Marín, M.L., Olivares, M., Boza, J., Jiménez, J., Fernández, L., Xaus, J. and Rodríguez, J.M. (2004) The comensal microflora of human milk: new perspectives for food bacteriotherapy and probiotics. *Trends Food Sci. Tech.* **15**, 121-127.

Martín, R., Heilig, H.G, Zoetendal, E.G, Jiménez, E., Fernández, L., Smidt, H., Rodríguez, J.M. (2007) Cultivation-independent assessment of the bacterial diversity of breast milk among healthy women. *Res. Microbiol.* **158**, 31-37.

Martín, V., Maldonado-Barragán, A., Moles, L., Rodriguez-Baños, M., del Campo, R., Fernández, L., Rodríguez, J.M., Jiménez, E. (2012) Sharing of bacterial strains between breast milk and infant feces. *J. Hum. Lact.* **28**, 36-44.

Mcguire, M.K. and Mcguire, M.A. (2015) Human Milk: Mother Nature's Prototypical Probiotic Food? *Adv. Nutr.* **6**, 112-123.

Mehanna, N.S.H., Tawfik, N.F., Salem, M.M.E., Effat, B.A.M. and El-Rab D.A.G. (2013) Assessment of Potential Probiotic Bacteria Isolated from Breast Milk. *Middle-East J. Sci. Res.* **14**, 354-360.

Muñoz-Quezada, S., Chenoll, E., Vieites, J. M., Genovés, S., Maldonado, J., Bermúdez-brito, M., C., Matencio, E., Bernal, M. J., Romero, F., Suárez, A., Ramón, D. and Gil, A. (2013) Isolation, identification and characterisation of three novel probiotic strains (*Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034,

- Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 and *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036) from the faeces of exclusively breast-fed infants. *Brit. J. Nutr.* **109**, 51-62.
- Nam, H., Ha, M., Bae, O. and Lee, Y. (2002) Effect of *Weissella confusa* Strain PL9001 on the Adherence and Growth of *Helicobacter pylori*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 4642-4645.
- Ogier, J. C. and Serror, P. (2008) Safety assessment of dairy microorganisms: the *Enterococcus* genus. *Int J of Food Microbiol* **126**, 291-301.
- Olivares, M., Díaz-Ropero, M.P., Martín, R., Rodríguez, J.M. and Xaus, J. (2006) Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk. *J. Appl. Microbiol.* **101**, 72-79.
- Perez-Cano, F.J., González-Castro, A., Castellote, C., Franch, A. and Castell, M. (2010) Influence of breast milk polyamines on suckling rat immune system maturation. *Dev. Comp. Immunol.* **34**, 210-218.
- Pfeiler, E.A. and Klaenhammer, T.R. (2007) The genomics of lactic acid bacteria. *Trends Microbiol.* **15**, 546-553.
- Poeta, P., Costa, D., Rodrigues, J. and Torres, C. (2006) Antimicrobial resistance and the mechanisms implicated in faecal enterococci from healthy humans, poultry and pets in Portugal. *J. Vet. Med. B. infect. Dis. Vet. Public. Health* **53**, 203-208.
- Ryan, M.P, Rea, M.C, Hill, C. and Ross, R.P. (1996) An application in cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad-spectrum bacteriocin, lacticin 3147. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 612-619.

Rima, M.A., Ehrmann, A., Korakli, M., Yazaji, S. and Vogel, R.F. (2011) Phenotypic and genotypic analysis of lactic acid bacteria in local fermented food, breast milk and faeces of mothers and their babies. *Syst. Appl. Microbiol.* **34**, 148-155.

Serna-Cock, L., Hernández, L.J.V. and Gaona, R.C. (2010) Cinética de fermentación y acción antimicrobiana de *Weissella confusa* contra *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*. *Ver. Fac. Ing. Univer. Antioquia* **55**, 55-65.

Serna-Cock, L., Enríquez, C., Gaona, R.C. and Vásquez, A. (2013) Cellular response of the bovine mammary gland after *Weissella confusa* infusion to control *Streptococcus agalactiae*. *Rev. Colom. Cien. Pec.* **26**, 280-287.

Shokryazdan, P., Sieo, C. C., Kalavathy, R., Liang, J. B. Alitheen, N.B., Jahromi, M.F. and Ho, Y.W. (2014) Probiotic Potential of *Lactobacillus* Strains with Antimicrobial Activity against Some Human Pathogenic Strains. *BioMed Res. Int.* **2014**, 1-16.

Tambekar, D.H. and Bhutada, S.A. (2010) Na evaluation of probiotic potential of *Lactobacillus* sp. from milk of domestic animals and comercial available probiotic preparations in prevention of enteric bacterial infections. *Recent Res. Sci. Tech.* **2**, 82-88.

Tanasupawat, S., Sukontasing, S. and Lee, J.K. (2008) *Enterococcus thailandicus* sp. nov., isolated from fermented sausage ('mum') in Thailand. *International J. Systematic Evol. Microbiol.* **58**, 1630-1634.

Tusar, T., Zerdoner, K., Bogovic, M.B., Paveljsek, D., Benedik, E., Brantanic, B., Fidler, N. and Rogelj, I. (2014) Cultivable bacteria from milk from Slovenian breastfeeding mothers. *Food Technol Biotechnol* **52**, 242-7.

Urnau, D., Cirolini, A., Terra, N.N., Cavalheiro, C.P., Milani, L.I.G. and Fries, L.L.M. (2012) Isolamento, identificação e caracterização quanto à resistência ao pH ácido e presença de sais biliares de cepas probióticas de leites fermentados comerciais. *Rev. Inst. Lat. Cândido Tostes* **67**, 5-10.

Valenzuela, A.S., Benomar, N., Abriouel, H., Cañamero, M.M. and Gálvez, A. (2010) Isolation and identification of *Enterococcus faecium* from seafoods: antimicrobial resistance and production of bacteriocin-like substances. *Food Microbiol.* **27**, 955-961.

Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D. A. and Lane, D.J. (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **173**, 697-703.

Zanirati, D.F., Abatemarco, M.J., S. Sandes, H.C., Nicoli J.R., Nunes, A.C. and Neumann, E. (2015) Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures. *Anaerobe* **32**, 70-76.

Tabela 1 - Análise bioquímica das bactérias lácticas isoladas de leite humano.

ISOLADOS	CRESCIMENTO EM DIFERENTES CONDIÇÕES			FERMENTAÇÃO DE CARBOIDRATOS				GÊNEROS
	10 °C	45 °C	6,5% NaCl	GLI	ARA	SOR	MAN	
A	-	-	-	-	ND	ND	ND	*V/A/H/A
B1	-	-	+	-	ND	ND	ND	*V/A/H/A
B2	-	+	+	-	-	-	-	<i>Enterococcus</i>
B3	-	+	+	-	-	-	-	<i>Enterococcus</i>
B4	-	-	-	-	ND	ND	ND	*V/A/H/A
C1	-	-	+	-	ND	ND	ND	*V/A/H/A
C2	-	-	+	-	ND	ND	ND	*V/A/H/A
C3	-	-	+	-	ND	ND	ND	*V/A/H/A
C4	-	+	+	-	-	+	+	<i>Enterococcus</i>
C5	-	+	+	-	-	+	+	<i>Enterococcus</i>
D1	-	+	+	-	-	+	+	<i>Enterococcus</i>
D2	-	-	+	-	ND	ND	ND	*V/A/H/A
D3	-	+	+	-	-	+	+	<i>Enterococcus</i>
E1	-	+	+	-	-	+	+	<i>Enterococcus</i>
E2	-	+	+	-	-	+	+	<i>Enterococcus</i>
E3	-	+	+	-	-	+	+	<i>Enterococcus</i>
E4	-	+	+	-	-	+	+	<i>Enterococcus</i>
E5	-	+	+	-	-	+	+	<i>Enterococcus</i>
E6	-	+	+	-	-	+	+	<i>Enterococcus</i>
E7	-	+	+	-	-	+	+	<i>Enterococcus</i>
E8	-	+	+	-	-	+	+	<i>Enterococcus</i>
E9	-	+	+	-	-	+	+	<i>Enterococcus</i>
E10	-	+	+	-	-	+	+	<i>Enterococcus</i>
E11	-	+	+	-	-	+	+	<i>Enterococcus</i>
F1	-	+	+	-	-	+	+	<i>Enterococcus</i>
F2	-	+	+	-	-	+	+	<i>Enterococcus</i>
F3	-	+	+	-	-	+	+	<i>Enterococcus</i>
F4	-	+	+	-	-	+	+	<i>Enterococcus</i>
F5	-	+	+	-	-	+	+	<i>Enterococcus</i>
F6	-	+	+	-	-	+	+	<i>Enterococcus</i>
F7	-	+	+	-	-	+	+	<i>Enterococcus</i>
F8	-	+	+	-	-	+	+	<i>Enterococcus</i>
F9	-	+	+	-	-	+	+	<i>Enterococcus</i>

GLI: produção de gás a partir de glicose, ARA: arabinose, SOR: sorbitol, MAN: manitol, - negativo (sem crescimento), +positivo (crescimento)

ND: Não determinado - Isolados que não cresceram a temperatura de 45 °C e por isso não foi determinado o perfil de fermentação aos carboidratos testados.

*Quatro gêneros diferentes: V/A/H/A - *Vagococcus/Aerococcus/Helcococcus/Alloiococcus*

Tabela 2 – Inibição das bactérias lácticas isoladas de leite humano sobre micro-organismos indicadores.

ISOLADOS	MICRO-ORGANISMOS INDICADORES*									
	EC	EF	LM	SA	SE					
A	(+++)	16,33	(+++)	13,29	(+++)	15,49	(+++)	13,96	(+++)	27,24
B1	(+++)	16,33	(+++)	14,15	(+++)	16,68	(+++)	13,47	(+++)	26,99
B2	(+++)	15,29	(+++)	14,15	(-)		(-)		(+++)	20,00
B3	(+++)	16,06	(+++)	14,15	(+++)	13,75	(+++)	13,85	(+++)	23,00
B4	(+++)	11,72	(+++)	15,52	(+++)	14,38	(+++)	15,35	(+++)	26,16
C1	(-)		(+++)	13,12	(+++)	18,13	(+++)	14,01	(+++)	24,84
C2	(-)		(+++)	15,07	(+++)	22,86	(+++)	20,40	(+++)	32,10
C3	(-)		(+++)	15,54	(+++)	19,75	(+++)	14,46	(+++)	34,81
C4	(+++)	19,47	(+++)	20,07	(+++)	27,66	(+++)	17,20	(+++)	30,20
C5	(+++)	16,64	(+++)	15,02	(+++)	27,44	(+++)	16,09	(+++)	27,22
D1	(+++)	16,64	(+++)	15,97	(+++)	20,11	(+++)	14,62	(+++)	26,14
D2	(+++)	17,71	(+++)	16,76	(+++)	23,53	(+++)	16,04	(+++)	36,88
D3	(+++)	21,51	(+++)	20,83	(+++)	27,90	(+++)	17,13	(+++)	39,00
E1	(+++)	14,46	(+++)	13,59	(+++)	19,99	(+++)	15,72	(+++)	31,45
E2	(+++)	15,30	(+++)	13,98	(+++)	19,19	(+++)	13,49	(+++)	25,67
E3	(+++)	18,53	(+++)	17,40	(+++)	19,47	(+++)	16,28	(+++)	32,18
E4	(+++)	13,82	(+++)	18,29	(+++)	20,47	(+++)	16,32	(+++)	29,10
E5	(+++)	17,13	(+++)	19,59	(+++)	21,64	(+++)	14,26	(+++)	28,38
E6	(+++)	18,83	(+++)	17,47	(+++)	19,68	(+++)	14,08	(+++)	26,03
E7	(+++)	17,82	(+++)	16,52	(+++)	18,58	(+++)	18,23	(+++)	29,61
E8	(+++)	19,33	(+++)	16,75	(+++)	18,81	(+++)	16,00	(+++)	28,59
E9	(+++)	17,43	(+++)	14,21	(+++)	15,71	(+++)	14,60	(+++)	26,42
E10	(+++)	17,25	(+++)	15,13	(+++)	15,99	(+++)	17,63	(+++)	28,58
E11	(+++)	17,95	(+++)	15,64	(+++)	21,20	(+++)	17,49	(+++)	27,42
F1	(-)		(+++)	16,97	(+++)	23,11	(+++)	14,62	(+++)	25,86
F2	(-)		(+++)	15,29	(+++)	26,75	(+++)	14,76	(+++)	26,62
F3	(-)		(+++)	15,28	(+++)	20,74	(+++)	14,66	(+++)	28,88
F4	(-)		(+++)	16,58	(+++)	17,07	(+++)	13,65	(+++)	27,95
F5	(+++)	15,14	(+++)	13,39	(+++)	14,64	(+++)	13,87	(+++)	26,03
F6	(+++)	16,93	(+++)	14,14	(+++)	20,83	(+++)	22,37	(+++)	22,96
F7	(+++)	14,83	(+++)	18,32	(+++)	16,75	(+++)	14,61	(+++)	29,87
F8	(+++)	16,58	(+++)	19,91	(+++)	17,97	(+++)	15,79	(+++)	26,13
F9	(+++)	20,11	(+++)	17,44	(+++)	16,78	(+++)	16,87	(+++)	29,32

* EC: *Escherichia coli*, EF: *Enterococcus faecalis*, LM: *Listeria monocytogenes*, AS: *Staphylococcus aureus*, SE: *Salmonella* Enteritidis.

- Padrão para medida de diâmetro dos halos de inibição: - negativo, não houve inibição; + fraca inibição (até 4 mm); ++ média inibição (de 5 a 9 mm); +++ forte inibição (a partir de 10 mm).

Tabela 3 - Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos pelas bactérias lácticas isoladas de leite humano.

ISOLADOS	ANTIMICROBIANOS								
	AMP	AMOX+AC	CLI	CLO	ERI	GEN	IMP	TET	VAN
A	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B1	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B3	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B4	R	S	I	S	S	S	S	S	S
C1	S	S	I	S	I	I	S	S	S
C2	S	S	S	S	I	R	S	S	S
C3	S	S	I	S	I	R	S	S	S
C4	R	S	R	S	R	S	S	I	S
C5	R	R	R	S	R	S	S	S	S
D1	S	S	I	S	I	R	S	S	S
D2	R	S	R	S	R	S	S	S	S
D3	R	S	R	S	I	S	S	I	S
E1	S	S	S	S	S	R	S	I	R
E2	S	S	I	S	S	R	S	I	R
E3	S	S	I	S	S	R	S	I	S
E4	R	S	S	S	S	S	S	S	R
E5	S	S	I	S	S	R	S	S	R
E6	S	S	I	S	S	R	S	I	R
E7	S	S	I	S	S	R	S	I	S
E8	R	R	I	S	S	R	S	S	R
E9	I	S	I	S	S	R	S	I	R
E10	R	R	I	S	S	R	S	S	R
E11	S	S	I	S	S	R	S	I	R
F1	S	S	I	S	S	R	R	R	S
F2	S	S	I	R	S	I	S	R	R
F3	S	S	I	S	S	I	S	S	R
F4	R	S	I	S	S	R	S	R	R
F5	S	S	S	S	S	S	S	S	R
F6	S	S	I	S	S	S	S	R	S
F7	S	S	I	S	S	R	S	S	R
F8	S	S	S	S	S	S	S	I	S
F9	S	S	I	S	S	S	S	S	R

*AMP- ampicilina (10 µg), AMOX+AC- amoxicilina+ácido clavulânico (10 µg), CLI- clindamicina (2 µg), CLO- cloranfenicol (30 µg), ERI- eritromicina (5 µg), GEN- gentamicina (10 µg), IMP- imipinem (10 µg), TET- tetraciclina (30 µg) e VAN- vancomicina (30 µg). R = resistente; I = intermediário; S = sensível.

Quadro 1 - Sobrevivência das bactérias lácticas isoladas de leite humano a baixos valores de pH e a diferentes concentrações de sais biliares.

Isolados	pH				Sais biliares (%p/v)		
	2.0	2.5	3.0	7.0	0,05	0,1	0,5
A, B1, B3, B4, E7							
C1, C2, C4, C5, D3, F6							
C3, D1 D2, E3							
F1							
F8							

*Ausência de crescimento celular após exposição as condições testadas por 3 horas

*Presença de crescimento celular após exposição as condições testadas por 3 horas



Tabela 4 - Identificação por 16S rRNA dos isolados de bactérias lácticas de leite humano.

ISOLADO	IDENTIDADE(%)	TAXONOMIA	Nº DE ACESSO ¹
C1	99	<i>Enterococcus durans</i>	KC213478.1
C2	98	<i>Enterococcus thailandicus</i>	NR_114015.1
C3	99	<i>Enterococcus durans</i>	KC213478.1
C4	99	<i>Enterococcus thailandicus</i>	NR_114015.1
C5	99	<i>Enterococcus thailandicus</i>	NR_114015.1
D1	99	<i>Enterococcus thailandicus</i>	NR_114015.1
D2	99	<i>Enterococcus thailandicus</i>	NR_114015.1
D3	99	<i>Enterococcus thailandicus</i>	NR_114015.1
E3	99	<i>Enterococcus faecalis</i>	KM822773.1
F1	100	<i>Enterococcus faecalis</i>	KM457441.1
F6	99	<i>Weisella confusa</i>	KC845200.1
F8	99	<i>Weisella confusa</i>	JX188072.1

¹Números de acesso correspondem às sequências descritas da espécie indicada na coluna anterior.

Anexo 1 - Normas da revista Journal of Applied Microbiology

Manuscripts should be drafted as concisely as possible. As space in the Journal is at a premium, the Editors always reserve the right to require authors to reduce the length of their manuscripts. Manuscripts will not be reviewed unless the English is of a publishable standard. The main text of the manuscript should be prepared as a Word document (.doc) or Rich Text Format (.rtf) file. Text must be double-spaced, and the pages of the manuscript must be numbered consecutively. The title page should show the title of the manuscript; the names of authors and place(s) where the work was done; an abbreviated running headline not exceeding 35 letters and spaces; and the complete contact details for the corresponding author. Original Articles should contain the following sections in this order:

- **ABSTRACT:** A brief summary of about 150-200 words, should give the major findings of the investigation under the following four headings: Aims; Methods and Results; Conclusions; Significance and Impact of Study. A list of between five and eight keywords should be added;

- **INTRODUCTION:** A balance must be struck between the pure and applied aspects of the subject;

- **MATERIALS AND METHODS:** Ensure that the work can be repeated according to the details provided. By submission of a manuscript, the authors consent that biological material, including plasmids, viruses and microbial strains, unobtainable from national collections will be made available to members of the scientific community for non-commercial purposes subject to national and international regulations governing the supply of biological material.

- **RESULTS:** Well-prepared tables and figures must be a cardinal feature of the 'Results' section because they convey the major observations to readers who scan a paper. Information provided in tables and figures should not be repeated in the text, but focus attention on the importance of the principal findings of the study. In general, journal papers will contain between one and seven figures and tables;

- **DISCUSSION:** This must not recapitulate the results and authors must avoid the temptation of preparing a combined 'Results and Discussion' section;

- **REFERENCES:** The Harvard system should be used. Citation of references having three or more names should be cited in the text as Jones *et al.* (1992) at the first and subsequent times of quoting the reference. A series of references should be given in ascending date order (Green and Smith 1946; Jones *et al.* 1956). Names with the prefixes de, do van, von, etc. will be placed in alphabetical order of the first letter of the prefix, e.g. von Braun would appear under 'V'. Different publications having the same author(s) and year will be distinguished by, for example, 1992a, 1992b. Papers or other publications having no obvious author(s) should usually be cited as 'Anon.' with the year in the text and bibliography. Web sites should be quoted in the text with an access date. Abbreviate journal titles according to Index Medicus (http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/terms_cond.html). Personal communications should be cited in the text with initials and family name of all individuals.

The following is an example of order and style to be used in the manuscript:

Fricker, C.R. (1995) Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in water. In Protozoan Parasites in Water ed. Betts, W.B., Casemore, D., Fricker, C.R., Smith, H.V. and Watkins, J. pp.91-96. London: The Royal Society of Chemistry.

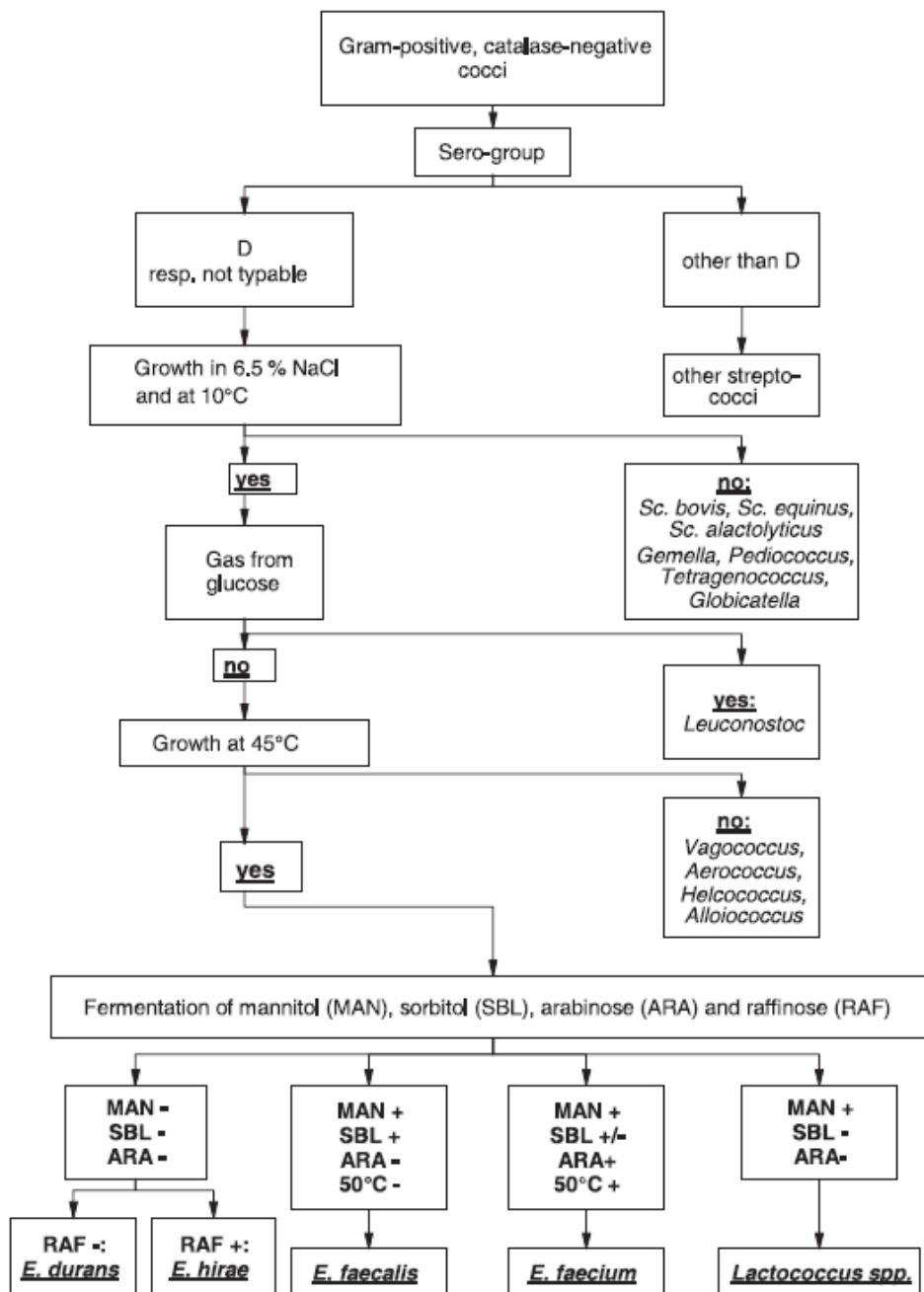
Garner, J.S. and Favero, M.S. (1985) *Guidelines for Handwashing and Hospital Environment Control*. US Public Health Service, Centers for Disease Control HHS No. 99-117. Washington DC: Government Printing Office.

Laverick, M.A., Wyn-Jones, A.P. and Carter, M.J. (2004) Quantitative RT-PCR for the enumeration of noroviruses (Norwalk-like viruses) in water and sewage. *Lett Appl Microbiol* **39**, 127-135.

Tables: Tables must be prepared using the same word processing package as the manuscript text. They should not be embedded but be placed immediately following the main text. Do not submit tables separately. Tables must not include ruled vertical or horizontal lines with the exception of headers and a footer.

Figures: Figures may be uploaded to the online submission site as separate files or included within the main manuscript file following the text and tables.

Anexo 2 - Chave de identificação para bactérias lácticas de acordo com Klein 2003.



Anexo 3 - Níveis de suscetibilidade de bactérias lácticas a antimicrobianos de acordo com diâmetros dos halos de inibição (mm).

Antimicrobianos	Padrão interpretativo (zonas de inibição em mm)*	
	Resistente	Suscetível
Amoxicilina+ácido clavulânico	<19	>20
Ampicilina	<19	>20
Bacitracina	<08	>13
Cefalexina	<14	>18
Cefalotina	<14	>18
Ciprofloxacina	<15	>21
Clorafenicol	<12	>18
Eritromicina	<13	>18
Estreptomicina	<11	>15
Gentamicina	<12	>15
Imipenem	<13	>16
Kanamicina	<13	>18
Neomicina	<12	>17
Norfloxacina	<12	>17
Oxacilina	<09	>14
Penicilina G.	<20	>29
Rifampicina	<24	>25
Sulfonamida	<12	>17
Tetraciclina	<14	>19
Vancomicina	<09	>12

*LARBOCLIN, 2003.