

RODRIGO OTÁVIO MIRANDA

**DESENVOLVIMENTO DO MEIO DE CULTURA RAFINOSE-PROPIONATO
MUPIROCINA DE LÍTIO, SELETIVO PARA BIFIDOBACTÉRIAS, E
AVALIAÇÃO DE SUA ASSOCIAÇÃO COM O PETRIFILM™ AEROBIC
COUNT**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2013

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

M672d
2013

Miranda, Rodrigo Otávio, 1987-

Desenvolvimento do meio de cultura Rafinose-Propionato Mupirocina de Lítio, seletivo para bifidobactérias, e avaliação de sua associação com o Petrifilm™ Aerobic Count / Rodrigo Otávio Miranda. – Viçosa, MG, 2013.

xi, 66 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Luís Augusto Nero.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Leite fermentado - Adulteração e inspeção. 2. Probióticos.
3. Bactérias - Cultura e meios de cultura. 4. *Bifidobacterium*.
5. Testes microbiológicos. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 637.127

RODRIGO OTÁVIO MIRANDA

**DESENVOLVIMENTO DO MEIO DE CULTURA RAFINOSE-PROPIONATO
MUPIROCINA DE LÍTIO, SELETIVO PARA BIFIDOBACTÉRIAS, E
AVALIAÇÃO DE SUA ASSOCIAÇÃO COM O PETRIFILM™ AEROBIC
COUNT**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APRESENTADA: 22 de março de 2013.

Marcos Rodrigues de Mattos

Antônio Fernandes de Carvalho
(Co-orientador)

Luís Augusto Nero
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a minha mãe por ter sempre me apoiado em minhas escolhas, dando forças para que eu chegasse até aqui. A toda minha família, em especial minha madrinha e minhas tias Ângela, Eliza e Lulu pelas histórias de vida e os abraços de chegada e partida.

Agradeço ao meu orientador, Luís Augusto Nero, pelos ensinamentos e apoio em todas as etapas da minha vida acadêmica. Ao Professor Antônio Fernandes de Carvalho por me co-orientar e em especial pelos conselhos técnicos do meu projeto. Ao professor Marcos Rodrigues de Mattos por participar da banca examinadora da minha defesa de dissertação.

Às minhas amigas Gabi, Luana e Michelle por compartilharem os momentos no laboratório e fazerem sempre mais divertidas as horas passadas no trabalho e fora dele. Aos amigos feitos em Viçosa, em especial Lívia, Bebel, Ana, Caio, Luana e David pelas companhias na descontração ou nos domingos de descanso.

A todo pessoal do InsPOA e do Setor de Preventiva, colegas, estagiários e aos técnicos Luís e Dagoberto.

A todos os professores que compartilharam seus conhecimentos na graduação e no mestrado.

Aos meus amigos de Barbacena, especialmente Marco, Lili, Aline, Bárbara, Camila, Carol, por estarem presentes na minha vida.

À CAPES pela bolsa de Mestrado, e também ao CNPq e à FAPEMIG pelos financiamentos durante minha vida acadêmica.

E a todos que, mesmo não citados aqui, contribuíram de alguma forma a esse trabalho.

CONTEÚDO

LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	vi
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
1. Histórico dos leites fermentados.....	3
2. Probióticos	4
2.1. O gênero <i>Bifidobacterium</i>	6
2.2. Aspectos legais para utilização de probióticos.....	7
3. Metodologias de enumeração de bifidobactérias.....	8
4. Referências.....	13
Objetivos.....	18
Objetivo geral	18
Objetivos específicos	18
ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO.....	19
Resumo	20
Abstract.....	21
1. Introdução	22
2. Material e Métodos	23
2.1. Micro-organismos	23
2.2. Padrão de fermentação de carboidratos.....	24
2.3. Inibição e capacidade de redução de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC).....	24
2.4. Desempenho de meios de cultura seletivos para enumeração de bifidobactérias	25
2.5. Avaliação do RP-MUP associado a placas Petrifilm™ AC (3M Microbiology) para enumeração seletiva de bifidobactérias em leites fermentados.....	27
3. Resultados e Discussão	29
3.1. Padrão de fermentação de carboidratos.....	29
3.2. Inibição e capacidade de redução de TTC	30

3.3. Desempenho de meios de cultura seletivos para enumeração de bifidobactérias	31
3.4. Avaliação do RP-MUP associado a placas Petrifilm™ AC (3M Microbiology) para enumeração seletiva de bifidobactérias em leites fermentados.....	33
4. Conclusões	35
Agradecimentos	36
Referências Bibliográficas	36
CONCLUSÕES FINAIS	53
RESULTADOS DETALHADOS	54

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Estruturas químicas do cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio e do formazam, indicando sua redução por ação enzimática, e transformação de um composto incolor para um composto vermelho..... 12

ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

Figura 1. Aspectos dos meios de cultura MRS-cisteína adicionados com diferentes concentrações de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) (A: controle, sem TTC; B: 25 mg/L; C: 50 mg/L; D: 100 mg/L; E: 200 mg/L), semeados com Bb12 (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, Chr. Hansen) e incubados a 37 °C por 72 h em anaerobiose (GasPak, BD). 48

Figura 2. Variação dos valores de pH de leites fermentados produzidos com diferentes culturas starter (LF01: YoMix, Du Pont, e Bb12, Ch. Hansen; LF02: *L. casei* CCT 1465, *S. thermophilus* ST066, Ch. Hansen, e Bb12; LF03: *L. rhamnosus* ATCC 7469, *S. thermophilus* ST066, Ch. Hansen, e Bb12; e LF04: SAB 440A, Clerici Sacco) e estocados a 4 °C por até 28 dias..... 49

Figura 3. Dispersão de contagens de bifidobactérias inoculadas em leites fermentados e obtidas por semeadura em meios de cultura seletivos (TOS-MUP, Merck, e RP-MUP), incubados a 37 °C por 72 h em condições de anaerobiose (GasPak, BD)..... 50

Figura 4. Dispersão de contagens de bifidobactérias inoculadas em leites fermentados e obtidas por semeadura em Petrifilm™ AC (3M Microbiology) associado à RP-MUP, incubados a 37 °C por 24, 48 e 72 h em condições de anaerobiose (GasPak, BD). A: comparação entre as contagens obtidas em 24 e 48 h; B: 24 e 72 h; C: 48 e 72 h. ... 51

Figura 5. Dispersão de contagens de bifidobactérias inoculadas em leites fermentados e obtidas por semeadura em TOS-MUP (Merck), RP-MUP, e Petrifilm™ AC (3M Microbiology) associado à RP-MUP, incubados a 37 °C por 24, 48 e 72 h em condições de anaerobiose (GasPak, BD). Gráficos do lado esquerdo: contagens obtidas por TOS-MUP e Petrifilm™ AC associado a RP-MUP após 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C). Gráficos do lado direito: contagens obtidas por RP-MUP e Petrifilm™ AC associado a RP-MUP após 24 h (D), 48 h (E) e 72 h (F). 52

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Tabela 1. Principais micro-organismos utilizados em formulações de probióticos 5
- Tabela 2. Meios de cultura seletivos para *Bifidobacterium* spp. utilizados para controle de qualidade em produtos lácteos fermentados. 10

ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

- Tabela 1. Micro-organismos utilizados no presente estudo e meios de cultura empregados para purificação e obtenção de culturas..... 40
- Tabela 2. Composição do caldo Rafinose-Propionato (RP)..... 42
- Tabela 3. Número de cepas de cada grupo bacteriano capazes de fermentar diferentes carboidratos adicionados em caldo púrpura de bromocresol, após incubação a 37 °C por 72 h em anaerobiose. 43
- Tabela 4. Valores proporcionais das médias de contagem dos grupos de cepas de bifidobactérias, lactobacilos e estreptococos utilizando meios eletivos adicionados de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) em diferentes concentrações. Incubação a 37 °C por 48 h para lactobacilos e estreptococos, e por 72 h em anaerobiose para bifidobactérias..... 44
- Tabela 5. Valores proporcionais das médias de contagens de cepas de *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp. e *Streptococcus thermophilus* utilizando meios MRS-ABC, MRS-NNLP, TOS-MUP e RP-MUP. Incubação a 37 °C em anaerobiose por 72 h. 45
- Tabela 6. Contagem de *Lactobacillus* spp. e *Streptococcus thermophilus* nos leites fermentados artificialmente produzidos..... 46
- Tabela 7. Médias (\pm desvio padrão) de contagens de bifidobactérias inoculadas em leites fermentados e obtidas por diferentes meios de cultura e tempos de incubação. 47

RESULTADOS DETALHADOS

- Tabela 1. Perfil de fermentação de cepas de *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp. e *Streptococcus thermophilus* em caldo púrpura de bromocresol suplementado com diversos carboidratos. Incubação a 37 °C em anaerobiose por 72 h..... 55
- Tabela 2. Média das contagens de cepas de *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp. e *Streptococcus thermophilus* em meios de cultura adicionados de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC). Incubação a 37 °C em aerobiose por 48 h para lactobacilos e estreptococos e em anaerobiose por 72 h para bifidobactérias. 57
- Tabela 3. Valores proporcionais da média de contagem de cepas de *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp. e *Streptococcus thermophilus* em meios de cultura eletivos adicionados de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC). Incubação a 37 °C em

aerobiose por 48 h para lactobacilos e estreptococos e em anaerobiose por 72 h para bifidobactérias.....	59
Tabela 4. Média das contagens de cepas de <i>Bifidobacterium</i> spp., <i>Lactobacillus</i> spp. e <i>Streptococcus thermophilus</i> em meios de cultura eletivos, MRS-ABC, MRS-NNLP, TOS-MUP e RP-MUP. Incubação a 37 °C em anaerobiose por 72 h.	61
Tabela 5. Valores proporcionais da média de contagem de cepas de <i>Bifidobacterium</i> spp., <i>Lactobacillus</i> spp. e <i>Streptococcus thermophilus</i> em meios de cultura eletivos, MRS-ABC, MRS-NNLP, TOS-MUP e RP-MUP. Incubação a 37 °C em anaerobiose por 72 h.	63
Tabela 6. Parâmetros de correlação das médias de contagens de leites fermentados artificialmente produzidos com <i>Bifidobacterium</i> spp. utilizando os ágaros TOS-MUP, RP-MUP e Petrifilm™ AC com caldo RP-MUP. A incubação foi realizada em anaerobiose a 37 °C por 72 h para os ágaros e por 24, 48 e 72 h para os Petrifilm™ AC. As comparações foram feitas para os ágaros e entre os ágaros e o Petrifilm™ AC nos diferentes tempos de incubação.....	65
Tabela 7. Parâmetros de correlação das médias de contagens de leites fermentados artificialmente produzidos com <i>Bifidobacterium</i> spp. utilizando Petrifilm™ AC e caldo RP-MUP. A incubação foi realizada em anaerobiose a 37 °C e as comparações foram feitas entre os tempos de contagem 24, 48 e 72 horas.	66

RESUMO

MIRANDA, Rodrigo Otávio, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2013. **Desenvolvimento do meio de cultura Rafinose-Propionato Mupirocina de Lítio, seletivo para bifidobactérias, e avaliação de sua associação com o Petrifilm™ Aerobic Count.** Orientador: Luís Augusto Nero. Co-orientador: Antônio Fernandes de Carvalho.

Os leites fermentados são ideais carreadores de micro-organismos probióticos devido a seu histórico de consumo e fabricação. A aplicação de bifidobactérias em produtos lácteos probióticos é geralmente associada a outras bactérias fermentadoras, com objetivos de garantir a qualidade tecnológica e sensorial do produto. A microbiota mista dos leites fermentados deve ser analisada diferencialmente com uso de meios seletivos para garantir a viabilidade e concentração de células. Metodologias alternativas rápidas para enumeração de micro-organismos, como o Petrifilm™, são vantajosas para a indústria de alimentos, porém requerem prévia padronização. O objetivo desse trabalho foi adaptar meios seletivos para bifidobactérias com plaqueamento em Petrifilm™ AC. Cepas de bifidobactérias, lactobacilos e estreptococos foram pesquisadas em relação ao perfil de fermentação de carboidratos, redução e inibição por cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) e desenvolvimento em meios seletivos para bifidobactérias. Adicionalmente, o meio de cultura Rafinose-Propionato-MUP (RP-MUP) com plaqueamento convencional e em Petrifilm™ AC com diferentes tempos de incubação foi comparado com a metodologia da ISO29981 com meio TOS-MUP em leites fermentados produzidos. A rafinose foi o carboidrato que apresentou maior especificidade de fermentação por bifidobactérias, sendo considerada a fonte de carbono a ser utilizada no desenvolvimento do meio de cultura alternativo RP-MUP. Todas as cepas de *Bifidobacterium* spp. conseguiram reduzir adequadamente o TTC, e não foram inibidas nas concentrações 25, 50 e 100 mg/L. TOS-MUP e RP-MUP foram os meios de cultura que apresentaram melhor seletividade para bifidobactérias, quando

comparadas aos meios MRS-ABC e MRS-NNLP. A associação do RP-MUP a placas Petrifilm™ AC permitiu a enumeração seletiva de bifidobactérias em leites fermentados, com equivalência de resultados com o RP-MUP e TOS-MUP utilizados pela metodologia convencional de plaqueamento (ANOVA, $p < 0.05$), e altos índices de correlação ($r = 0.99$, $p < 0.05$), inclusive em um tempo inferior de incubação (48 h). O protocolo alternativo proposto para enumeração de bifidobactérias em leites fermentados apresentou desempenho adequado, e representa uma vantagem para utilização pelas indústrias de alimentos no controle de qualidade de produtos probióticos com esses micro-organismos.

ABSTRACT

MIRANDA, Rodrigo Otávio, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2013. **Development of Raffinose-Propionate Lithium Mupirocin culture medium, selective for bifidobacteria, and evaluation of its association with Petrifilm™ Aerobic Count.** Advisor: Luís Augusto Nero. Co-advisor: Antônio Fernandes de Carvalho.

Fermented milks are ideal carriers of probiotic microorganisms due to their consumption and production history. The application of bifidobacteria in probiotic dairy products is usually associated with other fermenting bacteria, with the purpose of ensuring the technological and sensory qualities of the product. The mixed microbiota of fermented milks must be screened differentially with the usage of selective media to ensure the viability and concentration of the cells. Rapid alternative methodologies for the enumeration of microorganisms, like Petrifilm™, are advantageous to the food industry, but they need previous standardization. The aim of this study was to adapt selective media for bifidobacteria with Petrifilm™ AC plating. Bifidobacteria, lactobacilli and streptococci strains were screened for carbohydrate fermentation profile, reduction and inhibition by 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) and growth in selective media for bifidobacteria. Additionally, Raffinose-Propionate-MUP (RP-MUP) with conventional plating and using Petrifilm™ AC with different incubation times was compared to ISO29981 methodology with TOS-MUP medium in fermented milks produced. Raffinose was the carbohydrate that presented the higher fermentation specificity by bifidobacteria, being considered for the development of alternative selective medium RP-MUP. All bifidobacteria strains were able to adequately reduce TTC, and they were not inhibited by concentration of 25, 50 and 100 mg/L. TOS-MUP and RP-MUP were the culture media with best selectivity for bifidobacteria, when compared to MRS-ABC and MRS-NNLP media. RP-MUP and Petrifilm™ AC plates association allowed selective enumeration of bifidobacteria in fermented milks, with

equivalent results for RP-MUP and TOS-MUP used with conventional plating methodology (ANOVA; $p < 0.05$), and high correlation indexes ($r = 0.99$; $p < 0,05$), even with shorter incubation time (48 h). The suggested alternative protocol for the enumeration of bifidobacteria in fermented milks presented adequate performance, and represents an advantage for the usage by food industries in the quality control of probiotic products with these microorganisms.

INTRODUÇÃO

Leites fermentados são usualmente considerados alimentos funcionais, desde a associação feita por Metchnikov entre o consumo desses produtos com a saúde dos consumidores. Os probióticos evoluíram desse conceito e são considerados micro-organismos vivos e em concentração suficiente para determinar uma melhoria na saúde dos consumidores. Micro-organismos do gênero *Bifidobacterium* apresentam ampla aplicação em leites fermentados probióticos, devido a vários estudos demonstrando os benefícios em seu consumo. Internacionalmente, a concentração mínima considerada de micro-organismos probióticos nesses produtos deve ser de 10^6 a 10^8 UFC/g, o que garantiria o seu efeito benéfico ao consumidor. Entretanto, esses produtos frequentemente apresentam uma microbiota mista, com a utilização de bactérias lácticas fermentadoras para garantir sua qualidade tecnológica e sensorial.

Para um controle de qualidade adequado desses produtos é necessário que protocolos específicos e meios de cultura seletivos e diferenciais sejam utilizados. Diversos meios de cultura foram desenvolvidos para a enumeração seletiva de bifidobactérias em produtos lácteos. Entre eles se destaca o uso de antibióticos como dicloxacilina, mupirocina e a solução NNLP. Em 2010 foi publicada a ISO29981, que descreve um protocolo para enumeração presuntiva de bifidobactérias, empregando o meio TOS-MUP.

Ainda relacionado ao controle de qualidade de alimentos em indústrias, metodologias alternativas de enumeração de micro-organismos possuem diversas vantagens aos serem implantadas na rotina laboratorial, principalmente se determinam agilidade em sua execução, desde o preparo de material, estoque e obtenção de resultados. Essas metodologias requerem prévia padronização antes de serem utilizadas,

para garantia de equivalência com as metodologias tradicionais. Petrifilm™ AC é uma metodologia desenvolvida pela 3M para enumeração de aeróbios mesófilos. Dentre os componentes do Petrifilm™ AC, o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio, responsável pela coloração vermelha das colônias, pode não ser reduzido por alguns micro-organismos ou mesmo inibir os seus desenvolvimentos, o que pode determinar interferências na enumeração.

A associação de meios de cultura seletivos e diferenciais com placas Petrifilm™ AC já foi descrita em diversos estudos, que objetivaram o desenvolvimento de protocolos alternativos para enumeração de bactérias lácticas, ou culturas starter específicas, em leite fluido e leites fermentados. Um estudo recente demonstrou a pertinência da associação de placas Petrifilm™ AC com os caldos MRS-ABC e MRS-NNLP para enumeração de bifidobactérias em leites fermentados. Entretanto, o meio de cultura TOS-MUP aparentemente apresenta melhor seletividade para bifidobactérias quando comparado aos meios de cultura MRS-ABC e MRS-NNLP, o que justifica o desenvolvimento de um protocolo alternativo associado ao Petrifilm™ AC para ser utilizado no controle de qualidade de produtos probióticos adicionados desse grupo.

O presente estudo teve como objetivo desenvolver um protocolo alternativo para enumeração de bifidobactérias em leites fermentados, utilizando como referencial o meio de cultura seletivo TOS-MUP e sua associação com placas Petrifilm™ AC.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Histórico dos leites fermentados

O consumo e as técnicas de fabricação de leites fermentados se desenvolveram a partir da domesticação dos animais pelo homem, quando este mudou de uma vida nômade, de coletor e caçador, para uma vida de produtor. A utilização do leite das fêmeas dos animais se tornou uma vantagem para a sobrevivência do homem primitivo. Porém, com a ausência de técnicas de conservação, esse alimento altamente perecível se tornava impróprio para consumo após algumas horas (Tamime, 2002).

No entanto, o homem eventualmente conseguiu identificar diferenças entre um produto fermentado, com características específicas e agradáveis para o consumo, de um produto deteriorado, com alterações que impediam o consumo desse alimento. Assim, empiricamente, técnicas de produção de alimentos fermentados começaram a ser desenvolvidas, permitindo a obtenção de um novo produto e também a conservação dos mesmos por um maior período (Buttriss, 1997).

Os leites fermentados antigos eram empregados como medicamentos ou elixires, cujos processos de produção eram descritos como procedimentos familiares e misteriosos (Bourlioux, 2007). A fabricação dos leites fermentados permaneceu como artesanal e empírica até o início da ciência moderna, com a demonstração da fermentação e principalmente da associação feita no início do século XX por Ilya Metchnikov entre o consumo de um leite específico da região dos Balcãs (iogurte) e a longevidade excepcional dos habitantes dessa região (Hitchins & McDonough, 1989). A partir dessa observação, Metchnikov postulou que os principais responsáveis pela fermentação desse produto, hoje reconhecidos como *Streptococcus thermophilus* e

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus*, seriam capazes de sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal superior e colonizar o intestino, onde exerceriam suas propriedades terapêuticas (Vasiljevic & Shah, 2008). Posteriormente, constatou-se que esses micro-organismos não eram capazes de se estabelecer no intestino (Herter & Kendall, 1908), porém outras modificações foram demonstradas e outras bactérias apresentavam essa capacidade (Schrezenmeir & de Vrese, 2001).

2. Probióticos

O termo probiótico, no sentido moderno, nasceu em 1974, quando Parker (1974) o utilizou para denominar suplementos animais adicionados de micro-organismos vivos (Schrezenmeir & de Vrese, 2001). Esse conceito se desenvolveu e hoje probióticos são geralmente considerados como produtos contendo células viáveis de micro-organismos que quando consumidos apresentam uma melhora na saúde dos consumidores (FAO, 2006). Diversos veículos podem ser utilizados para a administração de probióticos, como cápsulas e barras cereais (Rivera-Espinoza & Gallardo-Navarro, 2010), porém os leites fermentados são os produtos de aplicação mais frequente, devido a grande relação entre probióticos e bactérias ácido lácticas com aplicações tecnológicas (De Vuyst, 2000).

Inúmeras vantagens são atribuídas aos probióticos, porém, a confirmação científica de grande parte delas ainda carece de estudos aprofundados (Pineiro & Stanton, 2007). Também é necessária cautela na sobreposição de resultados de estudos, devido a características particulares de cepas e modelos animais utilizados. Entre essas vantagens estão:

- Melhora do trânsito intestinal e constipação (Chmielewska & Szajewska, 2010);

- Tratamento e prevenção de diarreias como a de viajante e a associada ao uso de antibióticos, segundo (Cremonini et al., 2002; McFarland, 2007));
- Atividade antagonista sobre *Helicobacter pylori* (Gotteland et al., 2006);
- Melhoria na digestão da lactose em intolerantes (de Vrese et al., 2001);
- Estimulação do sistema imune intestinal (Corthésy et al., 2007);
- Antagonismo de patógenos intestinais (competição por sítio de ligação e nutrientes, produção de fatores inibitórios, (Cross, 2006));
- Supressão de câncer de cólon (Wollowski et al., 2001);
- Redução de colesterol sérico (Agerholm-Larsen et al., 2000).

O gênero *Lactobacillus* apresenta muitas espécies com potencial probiótico, porém outras bactérias são também utilizadas, e inclusive leveduras do gênero *Saccharomyces* possuem aplicação em alguns produtos. Na Tabela 1 são apresentadas as principais espécies utilizadas como probióticos em leites fermentados.

Tabela 1. Principais micro-organismos utilizados em formulações de probióticos

Gênero	Espécie
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. adolescentis</i>
	<i>B. animalis</i>
	<i>B. bifidum</i>
	<i>B. breve</i>
	<i>B. infantis</i>
	<i>B. longum</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. acidophilus</i>
	<i>L. casei</i>
	<i>L. plantarum</i>
	<i>L. rhamnosus</i>
<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cereviasae</i>

2.1. O gênero *Bifidobacterium*

Atualmente, *Bifidobacterium* é um dos gêneros com maior aplicação em leites fermentados probióticos. Esse gênero é composto de micro-organismos Gram positivos, pleomórficos, frequentemente apresentando forma de bacilos bifurcados ou com as extremidades dilatadas (Scardovi, 1986). Esses micro-organismos utilizam como principal via de utilização de carboidratos a chamada “bifido-shunt”, que envolve a atividade da enzima frutose-6-fosfato fosfoquetolase (F6PPK), com rendimento de fermentação de três moles de acetato e dois moles de lactato para cada dois moles de glicose (De Vries et al., 1967). Esse fato, além do alto conteúdo guanina e citosina (G+C%), não permitiriam a classificação de bifidobactérias como bactérias ácido lácticas (BAL), porém ainda são associadas a esse grupo microbiano devido ao seu emprego como probiótico (Vasiljevic & Shah, 2008).

O gênero *Bifidobacterium* foi inicialmente relatado por Tissier em 1899 em fezes de crianças amamentadas por leite materno (Mitsuoka & Kaneuchi, 1977). A observação da reduzida prevalência de transtornos intestinais em bebês amamentados com leite materno, em comparação àqueles alimentados com fórmulas, foi associada a maior proporção de bifidobactérias na população do intestino dos bebês do primeiro grupo (Balmer & Wharton, 1989). Essa maior proporção de bifidobactérias que outros grupos microbianos ocorre principalmente devido ao efeito estimulante do leite materno, denominado de fator bífido (“bifidus factor”, do inglês) (Liepke et al., 2002). Os principais componentes responsáveis foram identificados como oligossacarídeos complexos, não digeríveis pelo trato gastrointestinal, porém fermentáveis pelas bifidobactérias presentes no intestino, causando uma seleção natural dessa população (Coppa et al., 2004).

Após a interrupção da amamentação, a microbiota intestinal sofre variações induzidas pela ausência desses fatores bífidos (Magne et al., 2006). Outros grupos microbianos passam a se multiplicar e a ocupar uma proporção maior da população intestinal (Hopkins et al., 2002). Alguns representantes desse grupo são putrefativos e produtores de gases, o que leva a desconfortos intestinais e produção de compostos tóxicos para as células intestinais (Collado et al., 2009). Dessa maneira, a reintrodução de bifidobactérias como probióticos na alimentação levaria a um restabelecimento do equilíbrio da microbiota.

2.2. Aspectos legais para utilização de probióticos

Em 2001, uma comissão conjunta da Organização de Alimentos e Agricultura dos Estados Unidos (FAO) e da Organização Mundial da Saúde (OMS) se reuniu para definir as propriedades nutricionais e de saúde de alimentos probióticos. Essa comissão definiu protocolos para a seleção e aplicação de cepas probióticas, incluindo técnicas para definir e mensurar os seus benefícios (Pineiro & Stanton, 2007). Adicionalmente, essa comissão também estabeleceu normas para a rotulagem dos alimentos probióticos, indicando a necessidade de identificação da cepa utilizada no produto e a garantia de uma concentração mínima.

Um fator determinante para assegurar a característica probiótica de um produto é a viabilidade e a concentração de células no momento do consumo (Shah, 2000). As cepas utilizadas devem ser capazes de sobreviver ao pH ácido estomacal e a exposição ao sais biliares da parte inicial do intestino delgado. Porém, essas condições adversas podem reduzir em parte o número da população inicial consumida (Ding & Shah, 2007). Também deve-se considerar que o consumo diário do probiótico deve ser em tal nível

que proporcione alteração significativa na população do trato gastro-intestinal dos consumidores. Assim sendo, os diferentes alimentos probióticos devem apresentar concentração específica de células em toda sua vida de prateleira (FAO, 2006).

Internacionalmente, a concentração considerada adequada de bifidobactérias em alimentos probióticos deve variar entre 10^6 e 10^8 UFC por mililitro ou grama em leites fermentados (Kopp-Hoolihan, 2001). No Brasil, o Regulamento Técnico de Identidade de Leites Fermentados especifica que leites fermentados com bifidobactérias devem apresentar contagem mínima de 10^6 UFC/g (Brasil, 2007).

Leites fermentados contendo probióticos são frequentemente produzidos com uma associação de diferentes cepas, garantindo a qualidade sensorial, vantagens tecnológicas e a qualidade probiótica (Saxelin et al., 1999). Dessa maneira, a população desse tipo de alimento necessita de análise diferencial, para permitir a contagem dos diferentes gêneros e espécies de micro-organismos que são utilizados na sua produção. Embora os protocolos oficiais recomendados pela legislação brasileira para controle de qualidade de produtos fermentados não especifiquem, a enumeração desses diferentes gêneros e espécies deve ser realizada utilizando-se meios de cultura seletivos e diferenciais (Lourens-Hattingh & Viljoen, 2001).

3. Metodologias de enumeração de bifidobactérias

O uso de meios seletivos ou diferenciais em microbiologia tem grande aplicação para o controle de qualidade e inocuidade dos alimentos. Por meio das diferenças fenotípicas dos grupos microbianos, podem-se selecionar condições específicas de multiplicação ou características que permitam diferenciá-los em um mesmo meio de cultivo. A capacidade de utilização de um carboidrato específico geralmente é utilizada

em meios seletivos, favorecendo o desenvolvimento de um grupo alvo, o que caracteriza um enriquecimento. O uso de substâncias antimicrobianas para inibir a multiplicação de outros grupos caracteriza a seleção. Em meios de cultura diferenciais, ingredientes específicos permitem a visualização de pelo menos dois grupos microbianos, com diferentes características derivadas de diversidades fenotípicas (Madigan et al., 2005).

Diferentes meios foram desenvolvidos para enumeração de bifidobactérias em produtos lácteos fermentados, e principais são apresentados na Tabela 2. O primeiro meio seletivo para bifidobactérias foi formulado por Teraguchi et al. (1978), que utilizou como base o meio Glicose-Sangue-Fígado suplementado com cisteína e uma solução de antibióticos denominada NNLP (ácido nalidíxico, sulfato de neomicina, cloreto de lítio e sulfato de paromomicina). Posteriormente, Laroia & Martin (1991) traduziram esse trabalho originalmente publicado em japonês, e popularizaram esse meio de cultura para enumeração seletiva de bifidobactérias. Devido à dificuldade de preparo do meio base, Dave & Shah (1996) propuseram a alternativa de utilizar como base o ágar de Man Rogosa Sharpe (MRS), usualmente utilizado para enumeração de bactérias lácticas, associado à mesma solução NNLP, e suplementado com cisteína. Sozzi et al. (1990) demonstraram que concentrações específicas de dicloxacilina poderiam ser utilizadas para selecionar bifidobactérias em relação à bactérias lácticas em meios de cultura, como Triptona-Fitona-Levedura (TPY) ou MRS. A dicloxacilina também é utilizada em associação ao cloreto de lítio e à cisteína, originando o meio MRS-ABC (Christian-Hansen, 2005; Lima et al., 2009). Outros meios de cultura ainda apresentavam em sua composição propionato de sódio, mupirocina e TOS (oligossacarídeo transgalactosilado) (Matsuki et al., 1999; Sonoike et al., 1986). Em 2010, a International Organization for Standardization (ISO) apresentou um protocolo internacional para enumeração de bifidobactérias em leites fermentados - ISO 29981

(ISO, 2010). O meio de cultura TOS-MUP é utilizado nessa técnica e apresenta os componentes TOS e propionato de sódio como agentes de enriquecimento, e a mupirocina de lítio como agente seletivo.

Tabela 2. Meios de cultura seletivos para *Bifidobacterium* spp. utilizados para controle de qualidade em produtos lácteos fermentados.

Meio de Cultura	Suplementos	Referência
Glicose-Sangue-Fígado NNLP	Ácido Nalidíxico	Teraguchi et al. (1978)
	Sulfato de Neomicina	Laroia & Martin (1991)
	Cloreto de Lítio	
	Sulfato de Paromomicina	
	Cisteína	
MRS-NNLP	Ácido Nalidíxico	Dave & Shah (1996)
	Sulfato de Neomicina	
	Cloreto de Lítio	
	Sulfato de Paromomicina	
	Cisteína	
TPY ou MRS + dicloxacilina	Dicloxacilina	Sozzi et al. (1990)
MRS-ABC	Dicloxacilina	Christian-Hansen (2005)
	Cloreto de Lítio	
	Cisteína	
BSM (<i>Bifidobacterium</i> Selective Medium)	Cisteína	Leuschner et al. (2003)
	Mupirocina	
TOS-Propionato *	TOS	Sonoike et al. (1986)
	Propionato de sódio	Matsuki et al. (1999)
TOS-MUP	TOS	ISO (2010)
	Cisteína	
	Propionato de sódio	
	Mupirocina	

* Ágar eletivo

A indústria de alimentos requer praticidade e agilidade nas análises de qualidade de produtos. As análises microbiológicas clássicas geralmente necessitam de grande quantidade de vidrarias e equipamentos, além de serem dispendiosas em relação ao tempo. Devido à vida de prateleira de alguns produtos ser curta, a economia de tempo nas análises de qualidade é caracterizada como uma vantagem (Jasson et al., 2010).

Diversas metodologias alternativas para análises microbianas têm sido desenvolvidas, que visam reduzir o tempo de análise e aumentar a sensibilidade ou especificidade das técnicas (Jasson et al., 2010). Dentre as técnicas de enumeração alternativas, se destaca o uso de filmes em substituição às convencionais placas de Petri. O sistema Petrifilm™ é uma dessas alternativas, sendo constituído por um sistema de duplo filme, sendo o primeiro filme impregnado com agentes nutritivos, seletivos e diferenciais (considerando o grupo alvo de micro-organismos a ser enumerado), e o segundo impregnado com agentes geleificantes, que quando hidratado com a amostra diluída, forma um gel que permite o crescimento de colônias de maneira similar ao que ocorre convencionalmente em ágar distribuído em placas de Petri. O uso dessa técnica reduz o consumo de material laboratorial, como ágares e vidrarias, e também diminui o tempo e espaço de incubação (Rosmini et al., 2004).

O Petrifilm™ AC (Aerobic Count) é destinado à enumeração de micro-organismos aeróbios mesófilos. O filme apresenta meio de cultura não seletivo, semelhante ao ágar padrão de contagem, um agente geleificante e cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC), um indicador de crescimento das colônias. Como descrito, o procedimento usual para utilização desse sistema é a diluição da amostra em uma solução diluente (como NaCl 0.85%), e plaqueamento direto no filme inferior, impregnado com os agentes nutritivos.

O Petrifilm™ AC pode ser utilizado para enumeração seletiva de grupos específicos de micro-organismos caso seja empregado um diluente de amostra composto com agentes seletivos específicos. Como alternativa para enumeração de bactérias ácido lácticas em Petrifilm™ AC diversos estudos compararam o desempenho dessas associações com as metodologias convencionais para enumeração de bactérias lácticas em leite e em produtos lácteos fermentados, ou mesmo empregando essa

metodologia como forma de controle de qualidade desses produtos (Miranda et al., 2011; Nero et al., 2006; Nero et al., 2008).

O cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) foi inicialmente sintetizado por Pechmann e Runge em 1894. Esse composto é incolor na sua forma oxidada, se tornando vermelho quando reduzido (Figura 1). Inicialmente o TTC foi utilizado como indicador de germinação de sementes, porém verificou-se posteriormente que bactérias e leveduras também possuem capacidade de reduzir essa substância organicamente. Assim, quando o TTC é clivado enzimaticamente, origina o formazam que é armazenado no interior das células como grânulos de cor vermelha (Zhivich et al., 1990).

O TTC tem diversas aplicações em microbiologia, especialmente para evidenciar a formação de colônias por bactérias em meios sólidos e nos sistemas de plaqueamento em filme. Devido à incapacidade de algumas espécies ou cepas bacterianas reduzirem o TTC, alguns meios diferenciais também empregam esse composto. Algumas cepas bacterianas também podem apresentar inibição de multiplicação dependendo da concentração do TTC no meio de cultura (Beloti et al., 1999).

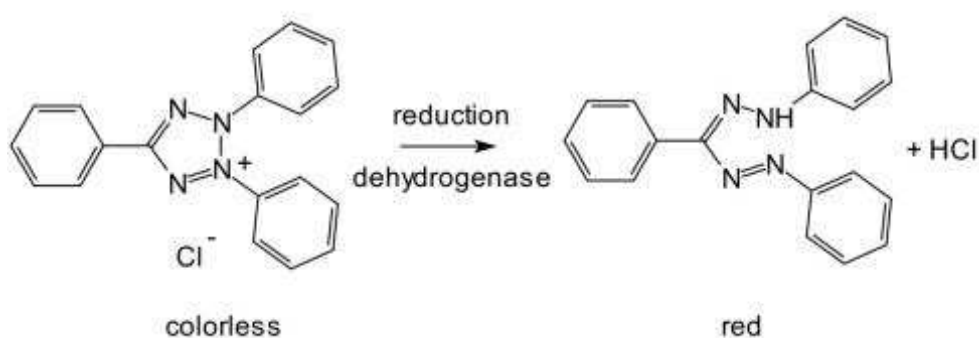


Figura 1. Estruturas químicas do cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio e do formazam, indicando sua redução por ação enzimática, e transformação de um composto incolor para um composto vermelho.

Devido a essas características, e por ser utilizado como indicador de formação de

colônias nas placas Petrifilm™ AC, estudos que avaliem a pertinência de utilização desse sistema para o controle de qualidade microbiológica em alimentos devem considerar a capacidade de redução do TTC por sua microbiota, assim como o potencial inibitório desse composto. Em leite cru, verificou-se que parte de sua microbiota autóctone não possui capacidade de reduzir o TTC, formando colônias brancas nas placas de Petrifilm™ AC, impedindo a enumeração e subestimando as contagens. Em relação a bactérias ácido lácticas, estudos demonstraram que determinados gêneros e espécies também não conseguem reduzir o TTC, além de serem inibidos em diferentes concentrações (Beloti et al., 1999).

4. Referências

- Agerholm-Larsen, L., Bell, M., Grunwald, G., & Astrup, A., 2000. The effect of a probiotic milk product on plasma cholesterol: a meta-analysis of short-term intervention studies. *European Journal of Clinical Nutrition* 54:856.
- Balmer, S. & Wharton, B., 1989. Diet and faecal flora in the newborn: breast milk and infant formula. *Archives of disease in childhood* 64:1672-1677.
- Beloti, V., Barros, M.A.F., De Freitas, J.C., Nero, L.A., De Souza, J.A., Santana, E.H.W., & Franco, B.D.G.M., 1999. Frequency of 2,3,5-trihenyltetrazolium chloride (TTC) non-reducing bacteria in pasteurized milk. *Revista de Microbiologia* 30:137-140.
- Bourlioux, P., 2007. Histoire des laits fermentés. *Cahiers de Nutrition et de Diététique* 42:9-14.
- Brasil, 2007. Regulamento técnico de identidade e qualidade de leites fermentados. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento.
- Buttriss, J., 1997. Nutritional properties of fermented milk products. *International Journal of Dairy Technology* 50:21-27.
- Chmielewska, A. & Szajewska, H., 2010. Systematic review of randomised controlled trials: probiotics for functional constipation. *World Journal of Gastroenterology* 16:69.

- Christian-Hansen, 2005. *L. acidophilus*, *L. casei* and bifidobacteria in fermented milk products - guidelines, p. 1-8, Method for counting probiotic bacteria.
- Collado, M.C., Isolauri, E., Salminen, S., & Sanz, Y., 2009. The impact of probiotic on gut health. *Current drug metabolism* 10:68-78.
- Coppa, G.V., Bruni, S., Morelli, L., Soldi, S., & Gabrielli, O., 2004. The first prebiotics in humans: human milk oligosaccharides. *Journal of clinical gastroenterology* 38:S80-S83.
- Corthésy, B., Gaskins, H.R., & Mercenier, A., 2007. Cross-talk between probiotic bacteria and the host immune system. *The Journal of Nutrition* 137:781S-790S.
- Cremonini, F., Di Caro, S., Nista, E.C., Bartolozzi, F., Capelli, G., Gasbarrini, G., & Gasbarrini, A., 2002. Meta-analysis: the effect of probiotic administration on antibiotic-associated diarrhoea. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 16:1461-1467.
- Cross, M.L., 2006. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 34:245-253.
- Dave, R.I. & Shah, N.P., 1996. Evaluation of media for selective enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, and bifidobacteria. *Journal of Dairy Science* 79:1529-1536.
- de Vrese, M., Stegelmann, A., Richter, B., Fenselau, S., Laue, C., & Schrezenmeir, J., 2001. Probiotics - compensation for lactase insufficiency. *The American Journal of Clinical Nutrition* 73:421s-429s.
- De Vries, W., Gerbrandy, J., & Stouthamer, A.H., 1967. Carbohydrate metabolism in *Bifidobacterium bifidum*. *Biochimica et Biophysica Acta* 136:415-425.
- De Vuyst, L., 2000. Technology aspects related to the application of functional starter cultures. *Food Technology and Biotechnology* 38.
- Ding, W. & Shah, N., 2007. Acid, bile, and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria. *Journal of food science* 72:M446-M450.
- FAO, 2006. Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation, FAO Food and Nutrition Paper. World Health Organization & Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Gotteland, M., Brunser, O., & Cruchet, S., 2006. Systematic review: are probiotics useful in controlling gastric colonization by *Helicobacter pylori*? *Alimentary pharmacology & therapeutics* 23:1077-1086.

- Herter, C.A. & Kendall, A.I., 1908. An observation on the fate of *B. bulgaricus* (in Bacillac) in the digestive tract of a monkey. *Journal of Bacteriology* 5:293-302.
- Hitchins, A.D. & McDonough, F.E., 1989. Prophylactic and therapeutic aspects of fermented milks. *The American Journal of Clinical Nutrition* 49:675-684.
- Hopkins, M.J., Sharp, R., & Macfarlane, G.T., 2002. Variation in human intestinal microbiota with age. *Digestive and Liver Disease* 34:S12-S18.
- ISO, 2010. Milk products — enumeration of presumptive bifidobacteria — colony count technique at 37 °C. International Organization for Standardization.
- Jasson, V., Jacxsens, L., Luning, P., Rajkovic, A., & Uyttendaele, M., 2010. Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. *Food Microbiology* 27:710-730.
- Kopp-Hoolihan, L., 2001. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. *Journal of the American Dietetic Association* 101:229-241.
- Laroya, S. & Martin, J.H., 1991. Methods for enumerating and propagating bifidobacteria. *Cultured Dairy Products Journal* 26:32-33.
- Leuschner, R.G.K., Bew, J., Simpson, P., Ross, P.R., & Stanton, C., 2003. A collaborative study of a method for the enumeration of probiotic bifidobacteria in animal feed. *International Journal of Food Microbiology* 83:161-170.
- Liepke, C., Adermann, K., Raida, M., Mägert, H.-J., Forssmann, W.-G., & Zucht, H.-D., 2002. Human milk provides peptides highly stimulating the growth of bifidobacteria. *European Journal of Biochemistry* 269:712-718.
- Lima, K.G.d.C., Kruger, M.F., Behrens, J., Destro, M.T., Landgraf, M., & Franco, B.D.G.d.M., 2009. Evaluation of culture media for enumeration of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium animalis* in the presence of *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. *LWT - Food Science and Technology* 42:491-495.
- Lourens-Hattingh, A. & Viljoen, B.C., 2001. Yogurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal* 11:1-17.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J., & Brock, T.D., 2005. *Brock Biology of Microorganisms*.
- Magne, F., Hachelaf, W., Suau, A., Boudraa, G., Mangin, I., Touhami, M., Bouziane-Nedjadi, K., & Pochart, P., 2006. A longitudinal study of infant faecal microbiota during weaning. *FEMS - Microbiology Ecology* 58:563-571.
- Matsuki, T., Watanabe, K., Tanaka, R., Fukuda, M., & Oyaizu, H., 1999. Distribution

- os bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene targeted species-specific primers. *Applied and Environmental Microbiology* 65:4506-4512.
- McFarland, L.V., 2007. Meta-analysis of probiotics for the prevention of traveler's diarrhea. *Travel medicine and infectious disease* 5:97-105.
- Miranda, R.O., Neto, G.G., de Freitas, R., Fernandes de Carvalho, A., & Nero, L.A., 2011. Enumeration of bifidobacteria using Petrifilm™ AC in pure cultures and in a fermented milk manufactured with a commercial culture of *Streptococcus thermophilus*. *Food Microbiology* 28:1509-1513.
- Mitsuoka, T. & Kaneuchi, C., 1977. Ecology of the bifidobacteria. *The American Journal of Clinical Nutrition* 30:1799-1810.
- Nero, L.A., Beloti, V., Barros, M.A.F., Ortolani, M.B.T., Tamanini, R., & Franco, B.D.G.M., 2006. Comparison of Petrifilm Aerobic Count plates and de Man-Rogosa-Sharpe agar for enumeration of lactic acid bacteria. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology* 14:249-257.
- Nero, L.A., Rodrigues, L.d.A., Viçosa, G.N., & Ortolani, M.B.T., 2008. Performance of Petrifilm Aerobic Count plates on enumeration of lactic acid bacteria in fermented milks. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology* 16:132-139.
- Parker, R., 1974. Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Anim. Nutr. Health* 29.
- Pechmann, H. & Runge, P., 1894. Oxydation der Formazylverbindungen. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* 27:323-324.
- Pineiro, M. & Stanton, C., 2007. Probiotic bacteria: legislative framework - requirements to evidence basis. *The Journal of Nutrition* 137:850S-853S.
- Rivera-Espinoza, Y. & Gallardo-Navarro, Y., 2010. Non-dairy probiotic products. *Food Microbiology* 27:1-11.
- Rosmini, M.R., Signorini, M.L., Schneider, R., & Bonazza, J.C., 2004. Evaluation of two alternative techniques for counting mesophilic aerobic bacteria in raw milk. *Food Control* 15:39-44.
- Saxelin, M., Grenov, B., Svensson, U., Fonden, R., Reniero, R., & Mattila-Sandholm, T., 1999. The technology of probiotics. *Trends in Food Science & Technology* 10:387-392.
- Scardovi, V., 1986. Genus Bifidobacterium, p. 1418-1434. In: Wilkins, W. (Ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Baltimore.
- Schrezenmeir, J. & de Vrese, M., 2001. Probiotics, prebiotics, and synbiotics—

- approaching a definition. *The American Journal of Clinical Nutrition* 73:361s-364s.
- Shah, N.P., 2000. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Science* 83:894-907.
- Sonoike, K., Mada, M., & Mutai, M., 1986. Selective agar medium for counting viable cells of bifidobacteria in cultured milk. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan [Shokuhin Eiseigaku Zasshi]* 27:238-244.
- Sozzi, T., Brigidi, P., Mignot, O., & Matteuzzi, D., 1990. Use of dicloxacillin for the isolation and counting of *Bifidobacteria* from dairy products. *Lait* 70:357-361.
- Tamime, A.Y., 2002. Fermented milks: a historical food with modern applications—a review. *European Journal of Clinical Nutrition* 56:S2-S15.
- Teraguchi, S., Uehara, M., Ogasa, K., & Mitsuoka, T., 1978. [Enumeration of bifidobacteria in dairy products (author's transl)]. *Nihon saikingaku zasshi. Japanese journal of bacteriology* 33:753.
- Vasiljevic, T. & Shah, N.P., 2008. Probiotics—From Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal* 18:714-728.
- Wollowski, I., Rechkemmer, G., & Pool-Zobel, B.L., 2001. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. *The American Journal of Clinical Nutrition* 73:451s-455s.
- Zhivich, A., Koldobskii, G., & Ostrovskii, V., 1990. Tetrazolium salts (review). *Chemistry of Heterocyclic Compounds* 26:1319-1328.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar e adequar meios de enumeração seletiva de bifidobactérias em produtos lácteos fermentados para adaptação em metodologia alternativa de plaqueamento com placas Petrifilm™ AC.

Objetivos específicos

- ✓ Estabelecer padrões de fermentação de carboidratos por bifidobactérias e culturas starter utilizadas na produção de leites fermentados, visando a seleção de compostos restritos para bifidobactérias;
- ✓ Avaliar a capacidade de redução e possível ação inibitória do composto cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio em cepas de bifidobactérias e culturas de bactérias ácido lácticas utilizadas na produção de leites fermentados;
- ✓ Avaliar meios de cultura seletivos para enumeração de bifidobactérias (MRS-NNLP, MRS-ABC e TOS-MUP)
- ✓ Desenvolver meio de cultura seletivo, baseado no TOS-MUP, associação a placas Petrifilm™ AC e enumeração de bifidobactérias;
- ✓ Avaliar o desempenho do meio de cultura seletivo desenvolvido para enumeração de bifidobactérias em leites fermentados.

ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

Desenvolvimento do meio de cultura Rafinose-Propionato Mupirocina de Lítio, seletivo para bifidobactérias, e avaliação de sua associação com o Petrifilm™ Aerobic Count.

Rodrigo Otávio Miranda¹, Antônio Fernandes de Carvalho², Luís Augusto Nero¹

¹ Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa

² Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa

Artigo a ser submetido para publicação no periódico **Food Microbiology**

Resumo

Bifidobactérias são amplamente utilizadas em produtos lácteos probióticos com bactérias lácticas fermentadoras como lactobacilos e *Streptococcus thermophilus*. Para garantir a viabilidade e a contagem das culturas, é necessária a enumeração diferencial dessa população. Diversos meios de cultura seletivos foram desenvolvidos para bifidobactérias, e o emprego de metodologias alternativas para enumeração pode ser de grande interesse para a indústria. O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de cepas de *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp. e *S. thermophilus* fermentarem diferentes carboidratos, reduzirem cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC), e se desenvolverem em diferentes meios de cultura seletivos para bifidobactérias. Considerando essa caracterização, leites fermentados foram preparados com bifidobactérias, que foram enumeradas pela metodologia convencional com meio TOS-MUP e meio Rafinose-Propionato-MUP (RP-MUP), e associando RP-MUP com Petrifilm™ AC. A rafinose foi escolhida para modificação do meio TOS-MUP devido a capacidade fermentativa desse carboidrato por todas as cepas de *Bifidobacterium*, e por apenas uma cepa de *L. acidophilus*. Todas as bifidobactérias foram capazes de reduzir o TTC. Os meios TOS-MUP e RP-MUP foram semelhantes na enumeração tanto de cepas isoladas como em leites fermentados. O Petrifilm™ AC obteve contagens semelhantes ao ágar TOS-MUP, mesmo com tempo de incubação de 24 e 48 h ($p < 0.05$), e apresentou alta correlação com a metodologia convencional ($r = 0.99$, $p < 0.05$). No presente estudo, o meio RP-MUP associado ao Petrifilm™ AC e incubação de 48 h em anaerobiose foi eficiente na enumeração seletiva de bifidobactérias em leites fermentados probióticos.

Palavras chave: bifidobactérias, enumeração seletiva, Petrifilm AC, TOS-MUP, RP-MUP

Abstract

Bifidobacteria are largely used in probiotic dairy products with lactic bacteria as lactobacilli and *Streptococcus thermophilus*. To ensure culture viability and count, there is a need for differential enumeration of this population. Several selective culture media were developed for bifidobacteria, and the usage of alternative methodologies may be of great interest for the industry. The aim of this study was to evaluate the ability of *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp. e *S. thermophilus* strains to ferment different carbohydrates, reduce 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride and develop in selective culture media for bifidobacteria. Considering this characterization, fermented milks were prepared with bifidobacteria, being enumerated by conventional methodology with TOS-MUP medium and Raffinose-Propionate-MUP (RP-MUP), and associating RP-MUP with Petrifilm™ AC. Raffinose was selected for modification of TOS-MUP media due to the fermentation ability of this carbohydrate by all strains of *Bifidobacterium* spp., and just one strain of *L. acidophilus*. All bifidobacteria were able to reduce TTC. TOS-MUP and RP-MUP media were similar in the enumeration both in isolated strains and in fermented milks. Petrifilm™ AC obtained similar counts to TOS-MUP agar, even with incubation times of 24 and 48 h ($p < 0.05$), and presented high correlation with the conventional methodology ($r = 0.99$, $p < 0.05$). In the present study, RP-MUP media associated to Petrifilm™ AC and incubation for 48 h in anaerobiosis was efficient for selective enumeration of bifidobacteria in probiotic fermented milks.

Key words: bifidobacteria, selective enumeration, Petrifilm™ AC, TOS-MUP, RP-MUP

1. Introdução

Probióticos são definidos como produtos contendo micro-organismos viáveis em concentração suficiente para determinar uma melhoria na saúde do consumidor (FAO, 2006). O gênero *Bifidobacterium* possui destaque nesse contexto por possuir várias espécies com comprovada atividade probiótica, que são frequentemente adicionadas em leites fermentados (Tamime, 2002). Após a adição de uma cultura probiótica em um alimento, é necessário que sua população seja monitorada para garantir que a sua concentração mínima seja mantida durante toda a vida de prateleira do produto, o que garante a funcionalidade do mesmo (Shah, 2000).

Vários meios de cultura foram desenvolvidos para enumeração seletiva de bifidobactérias, sendo basicamente compostos pelo meio de Man, Rogosa & Sharpe (MRS) adicionado de diferentes compostos antimicrobianos ou suas combinações, (Dave & Shah, 1996; Leuschner et al., 2003; Lima et al., 2009). Em 2010, a International Organization for Standardization publicou a ISO 29981, um protocolo para enumeração de bifidobactérias em leites fermentados que emprega um meio de cultura que contém um oligossacarídeo transgalactosilado (TOS) e mupirocina de lítio como agente inibidor (ISO, 2010).

Para monitoramento das populações de bifidobactérias, as indústrias de alimentos demandam metodologias que, além de utilizar meio de cultura seletivos, sejam rápidas e práticas na execução. Nesse sentido, o sistema Petrifilm™ (3M Microbiology, St. Paul, MN, EUA) representa uma alternativa viável e rotineiramente utilizada em laticínios, e as placas Petrifilm™ Aerobic Count (AC) já foram associadas a agentes seletivos para enumeração de diferentes grupos de bactérias lácticas, e bifidobactérias (Gonçalves et al., 2009; Miranda et al., 2011; Nero et al., 2006; Ortolani et al., 2007). Um ponto crítico

para a utilização das placas Petrifilm™ AC é o indicador de cor utilizado para visualização das colônias formadas, o 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC), que pode inibir a multiplicação de algumas espécies bacterianas ou não ser reduzido, comprometendo a performance do sistema (Beloti et al., 2002).

Jasson et al. (2010) descrevem a necessidade de padronização e testes de desempenho de metodologias alternativas para enumeração de micro-organismos em alimentos, como bifidobactérias. Assim, esse estudo teve como objetivo desenvolver um meio de cultura baseado no TOS-MUP e associá-lo ao Petrifilm™ AC, avaliando a sua performance para a enumeração seletiva de bifidobactérias em leites fermentados.

2. Material e Métodos

2.1. *Micro-organismos*

Os micro-organismos, meios de cultura para estoque e recuperação, e suas condições de incubação utilizados nesse estudo são descritos na Tabela 1. Todos os micro-organismos foram mantidos em meios de cultura próprios adicionados de glicerol a 20% (v/v), a -20 °C. Para uso, alíquotas das culturas estocadas eram estriadas em meios de cultura adicionados de ágar bacteriológico (Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra) a 15 g/L, e incubadas conforme descrito na Tabela 1. Colônias isoladas de cada micro-organismo eram então transferidas para meios de cultura e incubadas (Tabela 1), até atingir uma turbidez semelhante à escala 1 de MacFarland, que corresponde a aproximadamente 3×10^8 unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL). Essas culturas foram utilizadas nos experimentos descritos a seguir.

2.2. Padrão de fermentação de carboidratos

Alíquotas de 1 mL das culturas foram centrifugadas a $14.000 \times g$, com posterior descarte do sobrenadante e suspensão do pellet bacteriano com 1 mL de uma solução de NaCl 0.85% (m/v). Caldo púrpura de bromocresol (BD) foi preparado e suplementado com soluções de diferentes carboidratos (frutose, glicose, lactose, maltose, manitol, melibiose, rafinose, raminose, sacarose, sorbitol e xilose, todos da Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA), a fim de se obter 11 diferentes meios de cultura com concentração finais de 20 g/L para cada carboidrato, e pH ajustado em 7.0 com NaOH 1N.

Alíquotas de 100 μ L de cada caldo suplementado foram distribuídas em poços de placas de microtitulação, e em seguida inoculadas com 10 μ L de cada uma das culturas dos micro-organismos. Os conjuntos foram incubados a 37 °C por 72 h, em anaerobiose (GasPak EZ™ Gas Generating Container Systems, BD), e a alteração da coloração do meio de cultura (roxa para amarela) indicou a capacidade do micro-organismo inoculado em fermentar o carboidrato adicionado. Esse experimento foi conduzido em duplicata.

Os resultados foram agrupados considerando os gêneros testados, calculando-se as frequências de micro-organismos capazes de fermentar os diferentes carboidratos adicionados ao meio de cultura.

2.3. Inibição e capacidade de redução de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC)

As culturas de micro-organismos foram diluídas em escala seriada decimal em NaCl 0.85% (m/v) até atingir a concentração aproximada de 10^2 UFC/mL. Em seguida, as diluições selecionadas foram semeadas em profundidade e em duplicata em ágar MRS (Oxoid) suplementado com cisteína (Sigma-Aldrich, 0.5 g/L, MRS-C) (culturas de

Bifidobacterium spp.), ágar MRS (Oxoid) (*Lactobacillus* spp.) e ágar M17 (*Streptococcus thermophilus*), e nos mesmos meios de cultura suplementados com soluções de TTC (Sigma-Aldrich) nas concentrações finais de 25, 50, 100 e 200 mg/L. Todas as placas foram incubadas a 37 °C por 48 h (MRS e M17) e a 37 °C por 72 h em condições de anaerobiose (GasPak, BD) (MRS-C). Após incubação, as colônias formadas foram enumeradas e os resultados expressos em UFC/mL.

Para cada micro-organismo, as contagens obtidas nos meios de cultura suplementados com TTC foram convertidas em valores proporcionais, utilizando-se como referência as contagens obtidas nos mesmos meios de cultura sem TTC. Esses valores foram agrupados conforme os gêneros dos micro-organismos testados, e comparados por Análise de Variância e Teste Tukey para verificação de diferenças significativas ($p < 0.05$), utilizando-se o software XLSTAT 2010.2.03 (Addinsoft, New York, NY, EUA). Também avaliou-se a capacidade de redução de TTC pelos micro-organismos pela formação de colônias de coloração vermelha nos meios de cultura suplementados com essa substância.

2.4. Desempenho de meios de cultura seletivos para enumeração de bifidobactérias

As culturas foram diluídas em escala seriada decimal em NaCl 0.85% (m/v) até atingir a concentração aproximada de 10^2 UFC/mL. Em seguida, as diluições selecionadas foram plaqueadas em profundidade e em duplicata nos seguintes meios de cultura seletivos:

- ✓ TOS-MUP: ágar base TOS-propionato (Merck) adicionado de solução de mupirocina de lítio (MUP, Merck, 50 mg/L) (ISO, 2010);
- ✓ RP-MUP: meio de cultura proposto como alternativa para enumeração de bifidobactérias, composto por um meio de cultura base denominado caldo rafinose

propionato (RP, Tabela 2), adicionado de ágar bacteriológico (Oxoid, 15 g/L) e solução de MUP (Merck, 50 mg/L).

- ✓ MRS-NNLP: ágar MRS (BD) adicionado de soluções esterilizadas por filtração (Millex 0.22 mm, Millipore, Bedford, MA, EUA) de ácido nalidíxico (Sigma-Aldrich, 15 mg/L), sulfato de neomicina (Calbiochem, San Diego, CA, EUA, 100 mg/L), cloreto de lítio (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha, 3.0 g/L), sulfato de paromomicina (Sigma-Aldrich, 200 mg/L), e hidrocloreto de L-cisteína (Sigma-Aldrich, 0.5 g/L) (Dave & Shah, 1996);
- ✓ MRS-ABC: preparado conforme descrito na Tabela 1 (Christian-Hansen, 2005);

Como controle das populações das culturas de *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., e *S. thermophilus*, as mesmas diluições foram semeadas em profundidade e em duplicata em ágar MRS-C, MRS, e M17, respectivamente. As placas de MRS-NNLP, MRS-ABC, TOS-MUP, RP-MUP e MRS-C foram incubadas a 37 °C por 72 h em anaerobiose (GasPak EZ™, BD), e as placas de MRS e M17 foram incubadas a 37 °C por 48 h. Após incubação, as colônias formadas em cada meio de cultura foram enumeradas, e os resultados expressos em UFC/mL.

Para cada micro-organismo, as contagens obtidas nos meios de cultura seletivos foram convertidas em valores proporcionais, utilizando-se como referência as contagens obtidas nos meios de cultura controle. Esses valores foram agrupados conforme os gêneros dos micro-organismos testados, e comparados por Análise de Variância e Teste Tukey para verificação de diferenças significativas ($p < 0.05$), utilizando-se o software XLSTAT 2010.2.03 (Addinsoft).

2.5. Avaliação do RP-MUP associado a placas Petrifilm™ AC (3M Microbiology) para enumeração seletiva de bifidobactérias em leites fermentados

Leite desnatado reconstituído (LDR) foi preparado adicionando-se leite em pó desnatado (Molico, Nestlé do Brasil, São Paulo, SP, Brasil) em água destilada estéril (100 g/L), submetido a tratamento térmico (90 °C por 5 min), resfriado a 41 °C e utilizado para produção dos seguintes leites fermentados:

- ✓ LF 01: iogurte produzido com cultura starter YoMix (Du Pont, Palo Alto, CA, EUA, composto por *S. thermophilus* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) e adicionado de Bb12 (Chr. Hansen, Hørsholm, Dinamarca, *B. animalis* subsp. *lactis*);
- ✓ LF 02: produto fermentado produzido com as culturas ST066 (Clerici-Sacco Group, Cadorago, Itália, *S. thermophilus*), *L. casei* subsp. *casei* (CCT 1465) e adicionado de Bb12 (Chr. Hansen, *B. animalis* subsp. *lactis*);
- ✓ LF 03: produto fermentado produzido com as culturas ST066 (Clerici-Sacco, *S. thermophilus*), *L. rhamnosus* (ATCC 7469) e adicionado de Bb12 (Chr. Hansen, *B. animalis* subsp. *lactis*);
- ✓ LF 04: produto fermentado produzido com cultura starter SAB 440A (Clerici-Sacco, composto por *S. thermophilus*, *L. acidophilus* e *B. lactis* subsp. *lactis*)

As culturas starter comerciais utilizadas (YoMix, ST066, SAB 440A, e Bb12) foram preparadas conforme as instruções de seus fabricantes. As culturas de *L. casei* subsp. *casei* CCT 1465 e *L. rhamnosus* ATCC 7469 foram inoculadas nos leites fermentados para obtenção de concentrações finais de aproximadamente 10⁶ UFC/g. Após inoculação no LDR, alíquotas de 200 mL de cada um dos produtos foram

distribuídas em frascos estéreis, incubadas a 42 °C por 4.5 h, e em seguida armazenados a 4 °C. Os leites fermentados foram produzidos e analisados em triplicata.

Amostras de cada leite fermentado foram coletadas após a produção, e após 15 e 28 dias de produção. Cada amostra foi diluída em escala seriada decimal em solução Ringer ¼ (Merck) e duas diluições foram selecionadas e semeadas em profundidade e em duplicada em ágar MRS-NNLP, MRS-ABC, TOS-MUP e RP-MUP, preparados conforme descrito anteriormente. Adicionalmente, as mesmas amostras foram diluídas em escala seriada decimal em caldo RP-MUP (Tabela 2), e as mesmas diluições selecionadas anteriormente foram semeadas em triplicata em Petrifilm™ AC (3M Microbiology). Todas as placas foram incubadas a 37 °C por 72 h em anaerobiose (GasPak EZ™, BD). As placas de Petrifilm™ AC foram incubadas por 24, 48 e 72 h. Após incubação, as colônias formadas foram enumeradas e os resultados para cada leite fermentado foi expresso como UFC/g. As contagens obtidas foram convertidas em log₁₀, e comparadas por Análise de Variância e Teste de Tukey para verificação de diferenças significativas entre os meios de cultura avaliados e tempos de incubação ($p < 0.05$), e submetidos a regressão linear para verificação dos níveis de correlação entre as contagens ($p < 0.05$), utilizando-se o software XLSTAT 2010.2.03 (Addinsoft).

Como controle da produção dos leites fermentados, as amostras coletadas logo após a produção também foram semeadas em profundidade e em duplicada em ágar MRS (BD) e ágar M17 (Oxoid) e incubadas a 37 °C por 48 h, para enumeração de *Lactobacillus* spp. e *S. thermophilus*, respectivamente. Adicionalmente, o pH de todas as amostras foi mensurado com o auxílio de um pHmetro.

3. Resultados e Discussão

3.1. Padrão de fermentação de carboidratos

As frequências de micro-organismos capazes de fermentar os diferentes carboidratos testados, agrupados por gêneros, são apresentadas na Tabela 3. Todas as cepas de *Bifidobacterium* spp. testadas foram capazes de fermentar glicose, lactose, rafinose e sacarose. Segundo Scardovi (1986), apenas *B. bifidum*, *B. cuniculi* e *B. minimum* não são capazes de fermentar a rafinose entre os representantes do gênero *Bifidobacterium*; entretanto, essas espécies não foram incluídas no estudo. Scalabrini et al. (1998) demonstraram a capacidade de *Bifidobacterium* spp. em fermentar rafinose naturalmente presente em extrato hidrossolúvel de soja. Zavaglia et al. (1998) testaram a capacidade de bifidobactérias isoladas de fezes em utilizar diferentes carboidratos, sendo observado que a rafinose não foi fermentada pela maioria dos isolados de *B. bifidum*. Roy et al. (1997) desenvolveram um meio de cultura seletivo para bifidobactérias (RAF 5.1) cuja fonte de carbono é a rafinose, e conseguiram enumerar seletivamente culturas de *Bifidobacterium* spp., inclusive *B. bifidum*, em queijo.

Considerando os outros micro-organismos pesquisados, apenas uma cepa de *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, SAB 440A) foi capaz de fermentar a rafinose (Tabela 3). A capacidade de *L. acidophilus* fermentar a rafinose foi demonstrada por Gueimonde et al. (2004), apesar dessa característica variar de acordo com a cepa avaliada (Kandler & Weiss, 1986). Dentre os carboidratos testados, a rafinose apresentou melhor desempenho como agente de enriquecimento em meios de cultura para seleção de bifidobactérias (Tabela 3), sendo considerada para esse fim nas etapas posteriores do estudo.

3.2. Inibição e capacidade de redução de TTC

As proporções de contagens obtidas dos gêneros de micro-organismos semeados em meios de cultura com diferentes concentrações de TTC são apresentadas na Tabela 4. Para *Bifidobacterium* spp. e *S. thermophilus* o TTC determinou uma redução significativa das contagens apenas quando adicionado na concentração de 200 mg/L ($p < 0.05$). As diferentes concentrações de TTC determinaram comportamentos variados de inibição nas cepas de *Lactobacillus* spp., com diferenças significativas a partir de 50 mg/L em relação ao controle ($p < 0.05$); *L. fermentum* ATCC 23271, *L. paracasei* CCT 0566 e três cepas de *L. casei* (CIRMBIA 667, CIRMBIA 771 e CCT 1465) foram inibidos pelo TTC na menor concentração testada (25 mg/L). Nero et al. (2006) observaram que o TTC presente nas placas Petrifilm™ AC inibiu a formação adequada de colônias por *L. casei* CRL 705A nesse sistema associado a MRS, o que comprometeu o seu desempenho quando comparado à metodologia convencional de plaqueamento.

Todas as cepas de *L. plantarum* e *L. rhamnosus* incluídos no estudo (Tabela 1) não reduziram ou apresentaram dificuldade em reduzir o TTC, o que determinou a formação de colônias brancas ou róseas nos meios de cultura suplementados com essa substância. Sakai et al. (2010) consideraram essa característica para o desenvolvimento de um meio de cultura suplementado com TTC (30 mg/L) para enumeração diferencial de *L. plantarum* em culturas mistas com *L. casei* e *L. paracasei*. Entretanto, TTC nessa concentração seria capaz para inibir algumas cepas de *L. casei* e *L. paracasei* avaliadas no presente estudo. A baixa capacidade de redução de *L. plantarum* também foi observada por Shafiei et al. (2012), que descreveram a formação de colônias róseas dessa espécie no meio de cultura Elliker's lactic Agar, que contém o TTC como substância indicadora.

MRS-C suplementado com TTC desenvolveu uma coloração avermelhada difusa após incubação (Figura 1), mesmo sem inoculação dos micro-organismos. Essa alteração também foi observada por Champagne et al. (2009) em Petrifilm™ AC adicionado de um meio de cultura que também continha cisteína. Aparentemente, a associação de cisteína e TTC no meio de cultura pode determinar a redução não específica do TTC, apesar de não comprometer a identificação e enumeração das colônias (Figura 1).

3.3. Desempenho de meios de cultura seletivos para enumeração de bifidobactérias

As proporções de contagens obtidas dos gêneros de micro-organismos em meios de cultura seletivos e comparadas com seus respectivos controles são apresentadas na Tabela 5. Exceto para o MRS-NNLP, todos os meios de cultura avaliados para contagem de *Bifidobacterium* spp. não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle em MRS-C ($p > 0.05$). Considerando os dados para *Lactobacillus* spp., todos os meios de cultura avaliados apresentaram diferenças significativas em relação ao controle em MRS ($p < 0.05$), indicando seus potenciais seletivos; entretanto, apenas TOS-MUP e RP-MUP determinaram ausência total de contagens das culturas desse gênero. As cepas de *S. thermophilus* não apresentaram contagens em MRS-NNLP, TOS-MUP e RP-MUP, e apesar de apresentarem menores contagens no MRS-ABC quando comparado ao controle em M17, essa diferença não foi significativa ($p > 0.05$).

MRS-ABC foi desenvolvido para enumeração seletiva de *Bifidobacterium* spp. em produtos lácteos (Christian-Hansen, 2005). Um de seus principais agentes seletivos é a dicloxacilina, que já foi descrita como um componente com potencial utilização em meios de cultura seletivos para enumeração de bifidobactérias, em concentrações que

variam entre 2 e 4 mg/L (D'Aimmo et al., 2007; Sozzi et al., 1990). Entretanto, MRS-ABC é originalmente adicionado de dicloxacilina na concentração de 0.5 mg/L, o que pode explicar a baixa seletividade desse meio de cultura em relação a *Lactobacillus* spp. e *S. thermophilus* (Tabela 5). Lima et al. (2009) modificaram a concentração de dicloxacilina em MRS-ABC para 2 mg/L, e observaram seletividade adequada para *Bifidobacterium* spp.

Embora seja frequentemente descrito como meio de cultura usualmente utilizado para enumeração de bifidobactérias, o MRS-NNLP determina o desenvolvimento deficiente de colônias desses micro-organismos, além de permitir a formação de colônias por outras espécies de bactérias ácido lácticas (Darukaradhy et al., 2006; Dave & Shah, 1996; Lim et al., 1995; Miranda et al., 2011; Moriya et al., 2006). Essas deficiências do MRS-NNLP também foram observadas no presente estudo (Tabela 5), o que reforça a limitação de sua utilização como meio de cultura a ser considerado para o monitoramento de bifidobactérias em leites fermentados.

TOS-MUP e RP-MUP foram os únicos meios de cultura avaliados que não determinaram formação de colônias de *Lactobacillus* spp. e *S. thermophilus*, indicando seu potencial seletivo para *Bifidobacterium* spp. em culturas mistas com esses micro-organismos (Tabela 5). Apenas *B. animalis* subsp. *animalis* CIRMBIA 1335 não apresentou formação de colônias nesses dois meios de cultura. TOS-MUP foi desenvolvido a partir de um estudo colaborativo (IDF, 2007) que determinou a sua inclusão como meio de cultura seletivo para *Bifidobacterium* spp. na ISO 29981 (ISO, 2010). Mupirocina é o seu agente seletivo, e já foi utilizado em diferentes meios de cultura empregados para isolamento e enumeração de bifidobactérias (Leuschner et al., 2003; Rada, 1997; Simpson et al., 2004; Turrone et al., 2009).

Além da mupirocina, TOS-MUP contém o TOS, obtido pela transformação da lactose pela enzima β -galactosidase. A obtenção desse composto requer aparelhagem específica (ISO, 2010; Toba et al., 1985), e por essa razão foi proposta a utilização da rafinose como fonte de carboidrato alternativa, devido aos resultados obtidos anteriormente (Tabela 3). Assim, o RP-MUP foi desenvolvido, e apresentou desempenho similar ao TOS-MUP para enumeração seletiva de *Bifidobacterium* spp. (Tabela 5).

3.4. Avaliação do RP-MUP associado a placas Petrifilm™ AC (3M Microbiology) para enumeração seletiva de bifidobactérias em leites fermentados

As contagens obtidas em MRS e M17, utilizados como controles na produção dos leites fermentados, são apresentadas na Tabela 6, e os valores no pH ao longo da estocagem das amostras são apresentados na Figura 2. Os resultados obtidos indicam que os leites fermentados produzidos apresentaram as características microbiológicas e tecnológicas usuais desses produtos (Tamime & Robinson, 2007).

As médias das contagens de bifidobactérias obtidas pelos diferentes meios de cultura e tempos de incubação são apresentadas na Tabela 7. Apenas as contagens de bifidobactérias de LF 04 obtidas em Petrifilm™ AC associado ao RP-MUP após 24 h de incubação foram significativamente inferiores às demais ($P < 0.01$). Contagens de bifidobactérias obtidas pelos outros meios de cultura e em diferentes tempos de incubação não apresentaram diferenças significativas ($p > 0.05$). Esses resultados indicam que os protocolos alternativos propostos para enumeração de bifidobactérias em leites fermentados (RP-MUP, e RP-MUP associado a placas Petrifilm™ AC com incubação a 24, 48 e 72 h) não apresentaram diferenças significativas quando comparados aos resultados obtidos pelo protocolo ISO 29981, que utiliza o TOS-MUP.

A equivalência entre as contagens obtidas por TOS-MUP e RP-MUP pode ser confirmada pela dispersão desses dados apresentados na Figura 3. Os parâmetros de correlação apresentados indicam a equivalência entre esses meios de cultura para enumeração de bifidobactérias em leites fermentados. Considerando os resultados obtidos previamente (Tabela 5), a equivalência entre esses dois meios de cultura era esperada.

Uma das vantagens do sistema Petrifilm™ é a redução do tempo de incubação necessário para a obtenção de resultados finais. As médias de contagens de bifidobactérias obtidas nesse sistema associado ao RP-MUP após diferentes tempos de incubação (24, 48 e 72 h) não apresentaram diferenças significativas entre si (exceto para LF04, Tabela 7), e a Figura 4 apresenta as dispersões desses dados. Embora todos os índices de correlação sejam considerados ótimos ($r = 0.99$), os parâmetros adicionais de correlação indicam deficiências de equivalências quando as contagens obtidas em 24 h são consideradas (a, inclinação das retas, e b, intercepto). Adicionalmente, as colônias formadas após 24 h de incubação no Petrifilm™ AC associado ao RP-MUP tenderam a apresentar um tamanho reduzido, o que dificultou a contagem adequada. A necessidade de um tempo de incubação superior a 24 h para enumeração adequada de bactérias lácticas e bifidobactérias em Petrifilm™ AC associado a meios de cultura seletivos já foi descrita em estudos similares (Miranda et al., 2011; Nero et al., 2008).

Finalmente, a Figura 5 mostra as dispersões das contagens de bifidobactérias de leites fermentados obtidas pelas metodologias convencionais de enumeração utilizando TOS-MUP e RP-MUP, comparadas com os resultados obtidos pelo Petrifilm™ AC associado ao RP-MUP após 24, 48 e 72 h de incubação. Novamente, pode ser identificado que embora os índices de correlação em todas as comparações sejam considerados ótimos ($r = 0.99$), os parâmetros adicionais de correlação tendem a se

aproximar dos valores ideais ($a = 1.0$, e $b = 0.0$) à medida que o tempo de incubação do Petrifilm™ AC aumenta de 24 para 72 h.

As análises apresentadas demonstram a equivalência entre os meios de cultura TOS-MUP e RP-MUP, e também a possibilidade de associar os mesmos em Petrifilm™ AC para obtenção de contagens confiáveis de bifidobactérias em leites fermentados. Nesse contexto, a utilização do sistema Petrifilm™ representa uma vantagem para as indústrias de alimentos, por permitir a obtenção de resultados em um tempo inferior ao descrito pela ISO 29981 (ISO, 2010), além de maior praticidade para execução das análises, e preparo e descarte de material (Jasson et al., 2010).

4. Conclusões

Considerando os resultados obtidos, a rafinose foi identificada como o único carboidrato fermentado exclusivamente por todas as cepas de *Bifidobacterium* spp. avaliadas, além de *L. acidophilus*. Adicionalmente, o TTC apresentou atividade inibitória sobre as cepas de *Bifidobacterium* spp. incluídas no estudo apenas quando a concentração foi de 200 mg/L. Esses resultados permitiram a elaboração de um meio de cultura alternativo para enumeração de bifidobactérias, o RP-MUP, que apresentou seletividade similar ao TOS-MUP e melhor desempenho que o MRS-NNLP e MRS-ABC. Finalmente, a associação do RP-MUP a placas Petrifilm™ AC permitiu a enumeração seletiva de bifidobactérias em leites fermentados, com obtenção de resultados finais em um tempo inferior ao descrito no protocolo ISO 29981, e representando uma alternativa viável às indústrias de alimentos para o monitoramento desses produtos.

Agradecimentos

Os autores agradecem a CAPES, CNPq e FAPEMIG.

Referências Bibliográficas

- Beloti, V., Barros, M.D., Nero, L.A., Pachemshy, J.A.D., de Santana, E.H.W., & Franco, B., 2002. Quality of pasteurized milk influences the performance of ready-to-use systems for enumeration of aerobic microorganisms. *International Dairy Journal* 12:413-418.
- Champagne, C.P., Raymond, Y., Gonthier, J., & Audet, P., 2009. Enumeration of the contaminating bacterial microbiota in unfermented pasteurized milks enriched with probiotic bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 55:410-418.
- Christian-Hansen, 2005. *L. acidophilus*, *L. casei* and bifidobacteria in fermented milk products - guidelines, p. 1-8, Method for counting probiotic bacteria.
- D'Aimmo, M.R., Modesto, M., & Biavati, B., 2007. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* spp. isolated from dairy and pharmaceutical products. *International Journal of Food Microbiology* 115:35-42.
- Darukaradhya, J., Phillips, M., & Kailasapathy, K., 2006. Selective enumeration of *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* spp., starter lactic acid bacteria and non-starter lactic acid bacteria from Cheddar cheese. *International Dairy Journal* 16:439-445.
- Dave, R.I. & Shah, N.P., 1996. Evaluation of media for selective enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, and bifidobacteria. *Journal of Dairy Science* 79:1529-1536.
- FAO, 2006. Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation, FAO Food and Nutrition Paper. World Health Organization & Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Gonçalves, M.M., Freitas, R., Nero, L.A., & Carvalho, A.F., 2009. Enumeration of starter cultures during yogurt production using Petrifilm™ AC plates associated with acidified MRS and M17 broths. *Journal of Dairy Research* 76:229-233.
- Gueimonde, M., Delgado, S., Mayo, B., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., & de los Reyes-Gavilán, C.G., 2004. Viability and diversity of probiotic *Lactobacillus* and

- Bifidobacterium* populations included in commercial fermented milks. *Food Research International* 37:839-850.
- IDF, 2007. Selective enumeration of bifidobacteria in dairy products: development of a standard method, p. 1-20, Bulletin of the International Dairy Federation. International Dairy Federation.
- ISO, 2010. Milk products — enumeration of presumptive bifidobacteria — colony count technique at 37 °C. International Organization for Standardization.
- Jasson, V., Jacxsens, L., Luning, P., Rajkovic, A., & Uyttendaele, M., 2010. Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. *Food Microbiology* 27:710-730.
- Kandler, O. & Weiss, N., 1986. Genus *Lactobacillus*. *Bergey's manual of systematic bacteriology* 2:1063-1065.
- Leuschner, R.G.K., Bew, J., Simpson, P., Ross, P.R., & Stanton, C., 2003. A collaborative study of a method for the enumeration of probiotic bifidobacteria in animal feed. *International Journal of Food Microbiology* 83:161-170.
- Lim, K.S., Huh, C.S., & Baek, Y.J., 1995. A selective enumeration medium for bifidobacteria in fermented dairy products. *Journal of Dairy Science* 78:2108-2112.
- Lima, K.G.d.C., Kruger, M.F., Behrens, J., Destro, M.T., Landgraf, M., & Franco, B.D.G.d.M., 2009. Evaluation of culture media for enumeration of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium animalis* in the presence of *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. *LWT - Food Science and Technology* 42:491-495.
- Miranda, R.O., Neto, G.G., de Freitas, R., Fernandes de Carvalho, A., & Nero, L.A., 2011. Enumeration of bifidobacteria using Petrifilm™ AC in pure cultures and in a fermented milk manufactured with a commercial culture of *Streptococcus thermophilus*. *Food Microbiology* 28:1509-1513.
- Moriya, J., Fachin, L., Gândara, A.L.N., & Viotto, W.H., 2006. Evaluation of culture media for the counts of *Bifidobacterium animalis* in the presence of yoghurt bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology* 37:516-520.
- Nero, L.A., Beloti, V., Barros, M.A.F., Ortolani, M.B.T., Tamanini, R., & Franco, B.D.G.M., 2006. Comparison of Petrifilm Aerobic Count plates and de Man-Rogosa-Sharpe agar for enumeration of lactic acid bacteria. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology* 14:249-257.

- Nero, L.A., Rodrigues, L.d.A., Viçosa, G.N., & Ortolani, M.B.T., 2008. Performance of Petrifilm Aerobic Count plates on enumeration of lactic acid bacteria in fermented milks. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology* 16:132-139.
- Ortolani, M.B.T., Vicoso, G.N., Beloti, V., & Nero, L.A., 2007. Screening and enumeration of lactic acid bacteria in milk using three different culture media in Petrifilm™ Aerobic Count plates and conventional pour plate methodology. *Journal of Dairy Research* 74:387-391.
- Rada, V., 1997. Detection of *Bifidobacterium* species by enzymatic methods and antimicrobial susceptibility testing. *Biotechnology Techniques* 11:909-912.
- Roy, D., Mainville, I., & Mondou, F., 1997. Selective enumeration and survival of bifidobacteria in fresh cheese. *International Dairy Journal* 7:785-793.
- Sakai, T., Oishi, K., Asahara, T., Takada, T., Yuki, N., Matsumoto, K., Nomoto, K., & Kushiro, A., 2010. M-RTL agar, a novel selective medium to distinguish *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* from *Lactobacillus rhamnosus*. *International Journal of Food Microbiology* 139:154-160.
- Scalabrini, P., Rossi, M., Spetolli, P., & Matteuzzi, D., 1998. Characterization of *Bifidobacterium* strains for use in soymilk fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 39:213-219.
- Scardovi, V., 1986. Genus *Bifidobacterium*, p. 1418-1434. In: Wilkins, W. (Ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Baltimore.
- Shafiei, Y., Razavilar, V., Mirzaei, H., & Javadi, A., 2012. Differential cultivation and enumeration of *Lactobacillus plantarum* (PTCC 1058) in the presence of yogurt starter bacteria. *African Journal of Microbiology Research* 6.
- Shah, N.P., 2000. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Science* 83:894-907.
- Simpson, P.J., Fitzgerald, G.F., Stanton, C., & Ross, R.P., 2004. The evaluation of a mupirocin-based selective medium for the enumeration of bifidobacteria from probiotic animal feed. *Journal of Microbiological Methods* 57:9-16.
- Sozzi, T., Brigidi, P., Mignot, O., & Matteuzzi, D., 1990. Use of dicloxacillin for the isolation and counting of *Bifidobacteria* from dairy products. *Lait* 70:357-361.
- Tamime, A.Y., 2002. Fermented milks: a historical food with modern applications—a review. *European Journal of Clinical Nutrition* 56:S2-S15.
- Tamime, A.Y. & Robinson, R.K., 2007. *Tamime and Robinson's yoghurt: science and technology*. Woodhead Publishing Ltd.

- Toba, T., Yokota, A., & Adachi, S., 1985. Oligosaccharide structures formed during the hydrolysis of lactose by *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. *Food Chemistry* 16:147-162.
- Turroni, F., Foroni, E., Pizzetti, P., Giubellini, V., Ribbera, A., Merusi, P., Cagnasso, P., Bizzarri, B., de'Angelis, G.L., Shanahan, F., van Sinderen, D., & Ventura, M., 2009. Exploring the diversity of the bifidobacterial population in the human intestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology* 75:1534-1545.
- Zavaglia, A.G., Kociubinski, G., Pérez, P., & De Antoni, G., 1998. Isolation and characterization of *Bifidobacterium* strains for probiotic formulation. *Journal of Food Protection* 61:865-873.

Tabela 1. Micro-organismos utilizados no presente estudo e meios de cultura empregados para purificação e obtenção de culturas.

Gênero	espécie	especificação ^a	meio de cultura, estoque ^b	meio de cultura ^b , isolamento	incubação
<i>Bifidobacterium</i>	--	CIRMBIA 1387	MRS, L-cisteína (0.5 g/L)	MRS-ABC: Dicloxacilina (0.5 mg/L), cloreto de lítio (1.1 g/L), e L-cisteína (0.5 g/L)	37 °C, 72 h, anaerobiose (GasPak)
	--	CIRMBIA 1394			
	<i>animalis</i>	CIRMBIA 1388			
	<i>animalis</i>	CIRMBIA 1389			
	<i>animalis</i>	CIRMBIA 1390			
	<i>animalis</i>	CIRMBIA 1392			
	<i>animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	CIRMBIA 1335			
	<i>animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	Bb12, Chr. Hansen			
	<i>animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	CIRMBIA 1340			
	<i>animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	BI-07, Du Pont			
	<i>lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	SAB 440A, Clerici-Sacco			
	<i>longum</i>	CIRMBIA 1391			
	<i>longum</i>	CIRMBIA 1395			
<i>longum</i> subsp. <i>longum</i>	LGM P-17500, CSL				
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	SAB 440A, Clerici-Sacco	MRS	MRS, pH 5.2	37 °C, 48 h
	<i>acidophilus</i>	ATCC 4356			
	<i>acidophilus</i>	LA-5, Chr. Hansen			
	<i>brevis</i>	ATCC 367			
	<i>casei</i>	CIRMBIA 667			
	<i>casei</i>	CIRMBIA 767			
	<i>casei</i>	CIRMBIA 769			
	<i>casei</i>	CIRMBIA 771			
	<i>casei</i> subsp. <i>alactosus</i>	CCT 1376			
	<i>casei</i> subsp. <i>casei</i>	CCT 1465			

Continuação da Tabela 1.

Gênero	espécie	especificação ^a	meio de cultura ^b , estoque	meio de cultura ^b , isolamento	incubação
<i>Lactobacillus</i>	<i>casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i>	CCT 0842	MRS	MRS, pH 5.2	37 °C, 48 h
	<i>casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i>	CCT 5835			
	<i>casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i>	CCT 6645			
	<i>paracasei</i>	CCT 0566			
	<i>paracasei</i>	CCT 7501			
	<i>delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Yo-Mix, DuPont			
	<i>delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	CCT 3744			
	<i>delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	ATCC 4797			
	<i>fermentum</i>	ATCC 23271			
	<i>fermentum</i>	ATCC 9338			
	<i>helveticus</i>	ATCC 12046			
	<i>leichmanii</i>	ATCC 7830			
	<i>paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	ATCC 335			
	<i>plantarum</i>	ATCC 10012			
	<i>plantarum</i>	ATCC 8014			
	<i>rhamnosus</i>	ATCC 7469			
	<i>rhamnosus</i>	ATCC 9595			
<i>Streptococcus</i>	<i>thermophilus</i>	SAB 440A, Clerici-Sacco	M17, lactose 5 g/L	M17, lactose 5 g/L	37 °C, 24 h
	<i>thermophilus</i>	Yo-Mix, DuPont			
	<i>thermophilus</i>	ST066, Clerici-Sacco			

^aCIRMBIA: Coleção de culturas do Centre de ressources biologiques dédié aux bactéries d'intérêt alimentaire, INRA, Rennes, França; ATCC: Coleção de culturas do American Type Culture Collection, Manassas, VA, EUA, CCT: Coleção de culturas da Fundação André Tosello, Campinas, SP, Brasil; Christian Hansen A/S, Hørsholm, Dinamarca; Du Pont, Palo Alto, CA, EUA ; Clerici-Sacco Group, Cadorago, Itália; CSL: Centro Sperimentale del Latte, Zelo Buon Persico, Itália.

^bMRS: de Man, Rogosa & Sharpe (Becton-Dickson and Company - BD, Franklin Lakes, NJ, EUA); L-cisteína (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA); M17 (Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra); dicloxacilina (Sigma-Aldrich); cloreto de lítio (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha); GasPak (BD).

Tabela 2. Composição do caldo Rafinose-Propionato (RP).

Reagente	Quantidade
Tripticase de Peptona	10,0 g
Extrato de Levedura	1,0 g
KH_2PO_4	3,0 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3,0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
Hidrocloreto de L-Cisteína	0,5 g
Propionato de Sódio	15,0 g
Rafinose	5,0 g
Água	950 mL

Tabela 3. Número de cepas de cada grupo bacteriano capazes de fermentar diferentes carboidratos adicionados em caldo púrpura de bromocresol, após incubação a 37 °C por 72 h em anaerobiose.

Grupo	n	Carboidrato										
		Fru	Gli	Lac	Mal	Man	Mel	Raf	Ram	Sac	Sor	Xil
Bifidobactérias	14	9	14	14	11	8	11	14	5	14	5	5
Lactobacilos	27	21	23	20	19	8	4	1	5	19	16	6
Estreptococos	3	1	3	3	0	0	0	0	0	3	0	0

n = número de cepas utilizadas; Fru = fructose; Gli = glucose; Lac = lactose; Mal = maltose; Man = manose; Mel = melibiose; Raf = rafinose; Ram = ramnose; Sac = sacarose; Sor = sorbitol; Xil = xilose.

Tabela 4. Valores proporcionais das médias de contagem dos grupos de cepas de bifidobactérias, lactobacilos e estreptococos utilizando meios eletivos adicionados de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) em diferentes concentrações. Incubação a 37 °C por 48 h para lactobacilos e estreptococos, e por 72 h em anaerobiose para bifidobactérias.

Grupo	n	Controle	TTC 25	TTC 50	TTC 100	TTC 200	ANOVA*
Bifidobactérias	13	100.0 ^a	98.56 ^a	95.47 ^a	78.85 ^a	30.51 ^b	F _(4,60) = 21.097, p < 0.0001
Lactobacilos	27	100.0 ^a	75.99 ^{a,b}	60.11 ^b	54.04 ^{b,c}	29.65 ^c	F _(4,130) = 13.363, p < 0.0001
Estreptococos	3	100.0 ^a	100.03 ^a	83.46 ^a	79.35 ^a	0.00 ^b	F _(4,10) = 22.35, p < 0.0001

n = número de cepas utilizadas; Controle = meio de cultura eletivo sem adição de TTC; TTC 25, TTC 50, TTC 100, TTC 200 = concentrações de TTC adicionado ao meio de cultura eletivo de 25, 50, 100 e 200 mg/L respectivamente; * Análise de Variância (ANOVA). Proporções com letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas na respectiva linha (teste Tukey, p < 0,05). F = teste ANOVA; gl = graus de liberdade; p = nível de significância.

Tabela 5. Valores proporcionais das médias de contagens de cepas de *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp. e *Streptococcus thermophilus* utilizando meios MRS-ABC, MRS-NNLP, TOS-MUP e RP-MUP. Incubação a 37 °C em anaerobiose por 72 h.

Grupo	n	Controles	ABC	NNLP	TOS-MUP	RP-MUP	ANOVA
Bifidobactérias	11	100.0 ^a	94.68 ^a	61.81 ^b	86.75 ^{a,b}	86.51 ^{a,b}	F _(4,50) = 4.888, p = 0.002
Lactobacilos	26	100.0 ^a	59.97 ^b	10.68 ^c	0.0 ^c	0.0 ^c	F _(4,125) = 79.020, P < 0.0001
Estreptococos	3	100.0 ^a	41.71 ^{a,b}	0.0 ^b	0.0 ^b	0.0 ^b	F _(4,10) = 6.822, P = 0.006

n = número de cepas utilizadas; Controles: MRS-cisteína para bifidobactérias, MRS para lactobacilos, M17 para estreptococos; *Análise de Variância (ANOVA). Proporções com letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas na respectiva linha (teste Tukey, P < 0,05). F = teste ANOVA; gl = graus de liberdade; P = nível de significância.

Tabela 6. Contagem de *Lactobacillus* spp. e *Streptococcus thermophilus* nos leites fermentados artificialmente produzidos.

Leite fermentado	Contagem (\log_{10})	
	MRS	M17
LF01	8.96	9.29
LF02	6.35	9.22
LF03	6.83	9.30
LF04	8.27	8.92

Tabela 7. Médias (\pm desvio padrão) de contagens de bifidobactérias inoculadas em leites fermentados e obtidas por diferentes meios de cultura e tempos de incubação.

Leite fermentado	n	TOS-MUP	RP-MUP	Petrifilm™ AC associado a RP-MUP			ANOVA*
				24 h	48 h	72 h	
LF01	9	8.37 \pm 0.07 ^a	8.43 \pm 0.11 ^a	8.39 \pm 0.09 ^a	8.38 \pm 0.08 ^a	8.34 \pm 0.08 ^a	F _(4,37) = 0.543, p = 0.705
LF02	9	8.55 \pm 0.08 ^a	8.54 \pm 0.09 ^a	8.61 \pm 0.03 ^a	8.53 \pm 0.09 ^a	8.55 \pm 0.11 ^a	F _(4,37) = 0.844, p = 0.507
LF03	9	8.59 \pm 0.08 ^a	8.58 \pm 0.07 ^a	8.58 \pm 0.09 ^a	8.49 \pm 0.10 ^a	8.51 \pm 0.08 ^a	F _(4,32) = 2.407, p = 0.070
LF04	9	5.98 \pm 0.07 ^a	5.98 \pm 0.05 ^a	5.78 \pm 0.05 ^b	6.00 \pm 0.08 ^a	5.97 \pm 0.07 ^a	F _(4,37) = 12.39, p < 0.001
Total	36	7.85 \pm 1.12 ^a	7.84 \pm 1.12 ^a	7.81 \pm 1.24 ^a	7.83 \pm 1.09 ^a	7.82 \pm 1.11 ^a	F _(4,158) = 0.006, p = 1.0

* Análise de Variância (ANOVA). Médias seguidas de letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas na respectiva linha (teste Tukey, p < 0,05). F = teste ANOVA; gl = graus de liberdade; p = nível de significância.

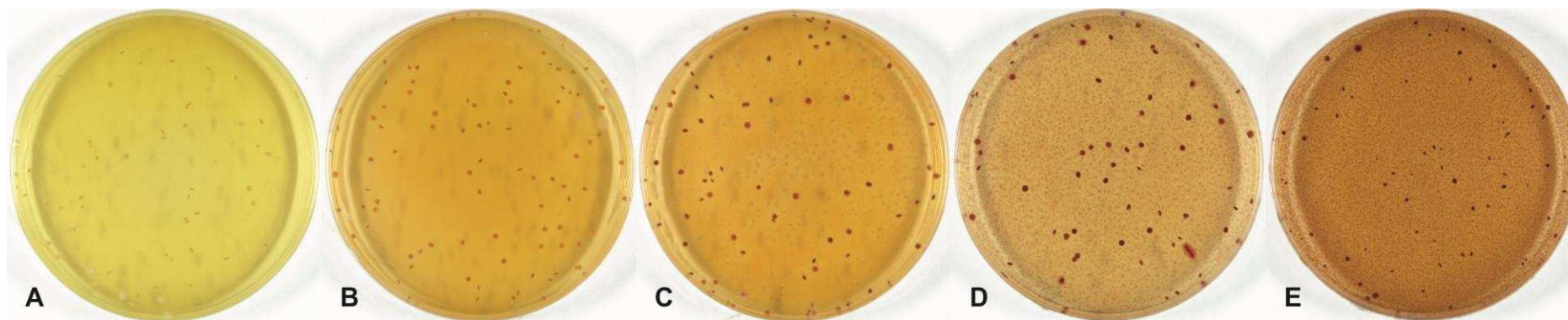


Figura 1. Aspectos dos meios de cultura MRS-cisteína adicionados com diferentes concentrações de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) (A: controle, sem TTC; B: 25 mg/L; C: 50 mg/L; D: 100 mg/L; E: 200 mg/L), semeados com Bb12 (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, Chr. Hansen) e incubados a 37 °C por 72 h em anaerobiose (GasPak, BD).

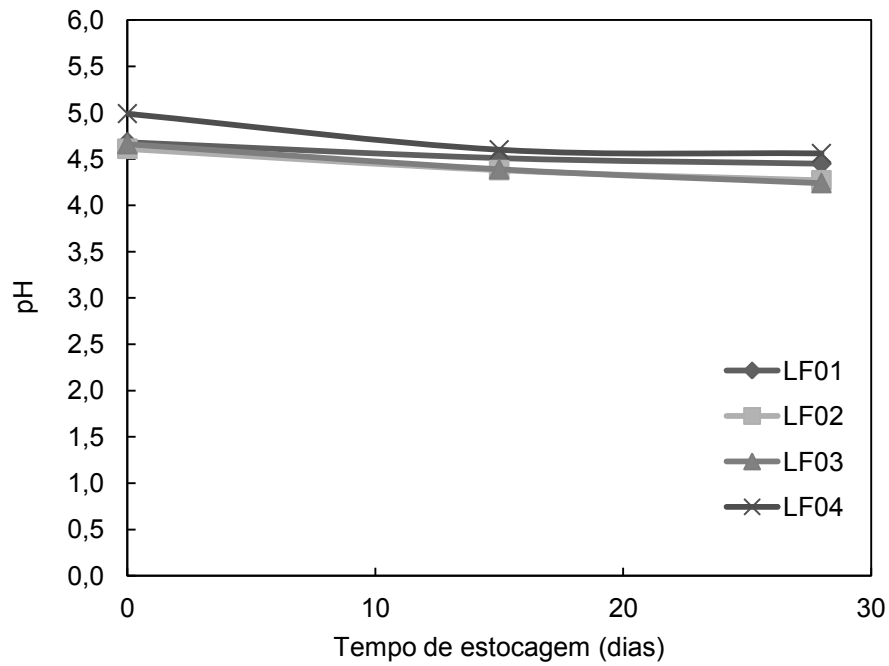


Figura 2. Variação dos valores de pH de leites fermentados produzidos com diferentes culturas starter (LF01: YoMix, Du Pont, e Bb12, Ch. Hansen; LF02: *L. casei* CCT 1465, *S. thermophilus* ST066, Ch. Hansen, e Bb12; LF03: *L. rhamnosus* ATCC 7469, *S. thermophilus* ST066, Ch. Hansen, e Bb12; e LF04: SAB 440A, Clerici Sacco) e estocados a 4 °C por até 28 dias.

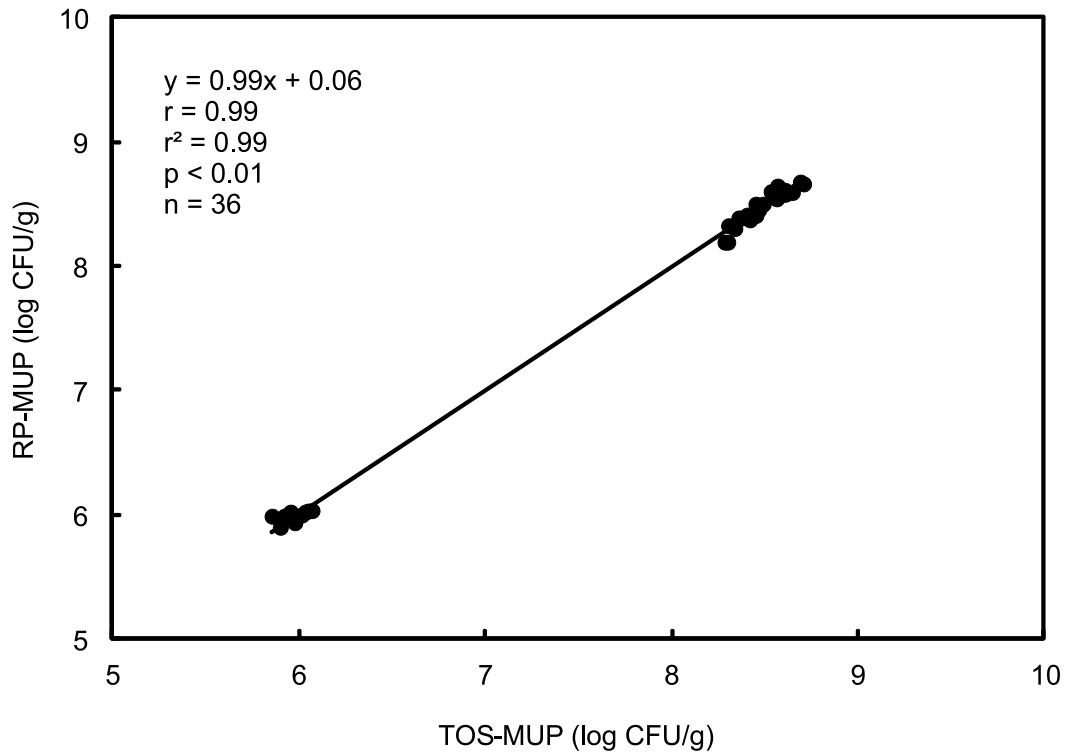


Figura 3. Dispersão de contagens de bifidobactérias inoculadas em leites fermentados e obtidas por sementeira em meios de cultura seletivos (TOS-MUP, Merck, e RP-MUP), incubados a 37 °C por 72 h em condições de anaerobiose (GasPak, BD).

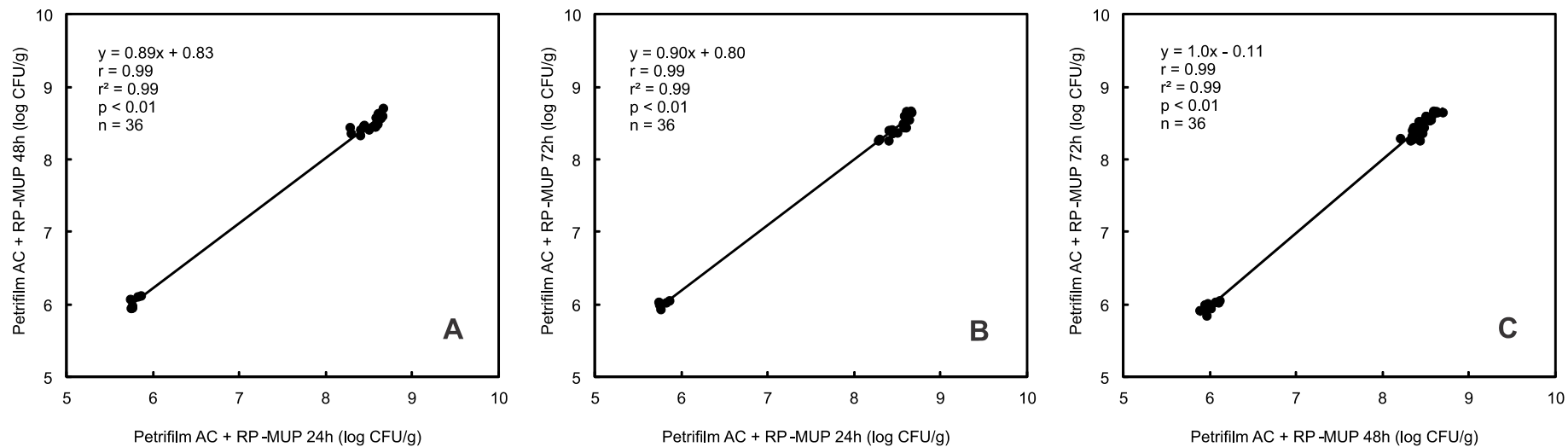


Figura 4. Dispersão de contagens de bifidobactérias inoculadas em leites fermentados e obtidas por semeadura em Petrifilm™ AC (3M Microbiology) associado à RP-MUP, incubados a 37 °C por 24, 48 e 72 h em condições de anaerobiose (GasPak, BD). A: comparação entre as contagens obtidas em 24 e 48 h; B: 24 e 72 h; C: 48 e 72 h.

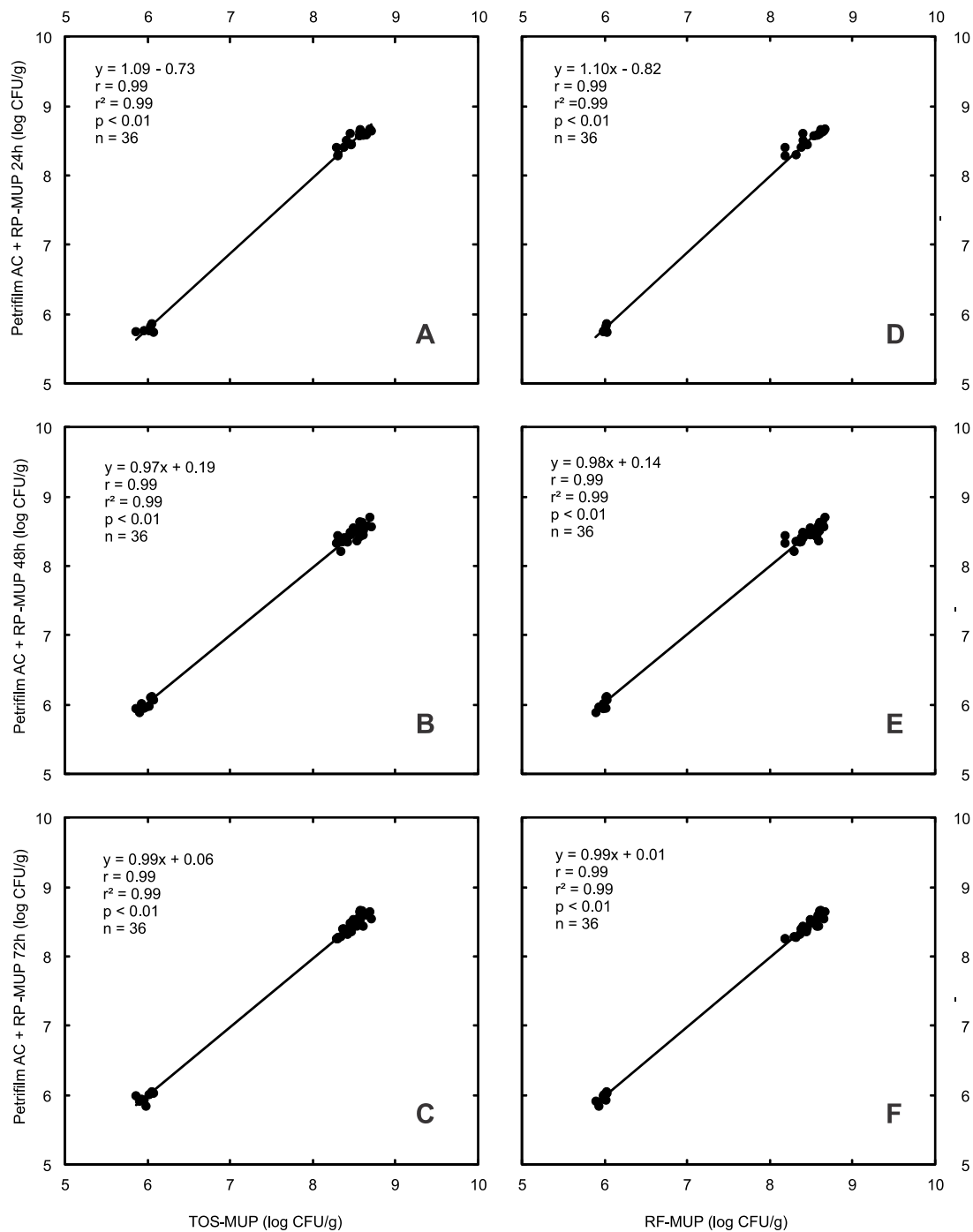


Figura 5. Dispersão de contagens de bifidobactérias inoculadas em leites fermentados e obtidas por sementeira em TOS-MUP (Merck), RP-MUP, e Petrifilm™ AC (3M Microbiology) associado à RP-MUP, incubados a 37 °C por 24, 48 e 72 h em condições de anaerobiose (GasPak, BD). Gráficos do lado esquerdo: contagens obtidas por TOS-MUP e Petrifilm™ AC associado a RP-MUP após 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C). Gráficos do lado direito: contagens obtidas por RP-MUP e Petrifilm™ AC associado a RP-MUP após 24 h (D), 48 h (E) e 72 h (F).

CONCLUSÕES FINAIS

- ✓ A utilização de caldo Rafinose-Propionato-MUP em associação com metodologia de plaqueamento Petrifilm™ AC foi eficaz na enumeração de bifidobactérias em produtos lácteos fermentados, sendo indicada incubação em anaerobiose por 48 h.
- ✓ A rafinose foi o carboidrato com aplicação potencial em meios seletivos para bifidobactérias, considerando os resultados dos testes de fermentação. Esse carboidrato foi utilizado para modificar o ágar TOS-MUP, dando origem ao meio Rafinose-Propionato-MUP (RP-MUP).
- ✓ Todas as cepas de bifidobactérias foram capazes de reduzir o composto cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio e apenas a concentração de 200 mg/L foi inibitória para esse gênero.
- ✓ Os ágaros TOS-MUP e RP-MUP foram os meios seletivos que apresentaram melhor enumeração e seletividade de bifidobactérias em relação às culturas lácticas testadas.
- ✓ A avaliação das metodologias de enumeração seletiva (TOS-MUP e RP-MUP) de bifidobactérias em leites fermentados artificialmente produzidos não apresentaram diferenças significativas. O caldo RP-MUP associado à metodologia de plaqueamento Petrifilm™ AC obteve resultados similares à enumeração convencional de ágar em profundidade, inclusive com tempo de incubação de 24 e 48 h.

RESULTADOS DETALHADOS

Tabela 1. Perfil de fermentação de cepas de *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp. e *Streptococcus thermophilus* em caldo púrpura de bromocresol suplementado com diversos carboidratos. Incubação a 37 °C em anaerobiose por 72 h.

Cepa	Carboidrato										
	Fru	Gli	Lac	Mal	Man	Mel	Raf	Ram	Sac	Sor	Xil
<i>Bifidobacterium</i> sp. CIRMBIA 1387	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-
<i>Bifidobacterium</i> sp. CIRMBIA 1394	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-
<i>B. animalis</i> CIRMBIA 1388	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
<i>B. animalis</i> CIRMBIA 1389	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
<i>B. animalis</i> CIRMBIA 1390	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. animalis</i> CIRMBIA 1392	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i> CIRMBIA 1335	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb 12	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> CIRMBIA 1340	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
<i>B. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> BI-07	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
<i>B. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> SAB	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
<i>B. longum</i> CIRMBIA 1391	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. longum</i> CIRMBIA 1395	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> LGM P-17500	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-
<i>L. acidophilus</i> La-5	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
<i>L. acidophilus</i> SAB	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-
<i>L. brevis</i> ATCC 367	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>L. casei</i> CIRMBIA 667	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-
<i>L. casei</i> CIRMBIA 767	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
<i>L. casei</i> CIRMBIA 769	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>L. casei</i> CIRMBIA 771	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>L. casei</i> subsp. <i>alactosus</i> CCT 1376	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> CCT 1465	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-
<i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> CCT 0842	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
<i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> CCT 5835	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> CCT 6645	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
<i>L. paracasei</i> CCT 0556	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
<i>L. paracasei</i> CCT 7501	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> YM	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

Continuação da Tabela 1

Cepa	Carboidrato										
	Fru	Gli	Lac	Mal	Man	Mel	Raf	Ram	Sac	Sor	Xil
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> CCT 3744	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 4797	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-
<i>L. fermentum</i> ATCC 23271	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
<i>L. fermentum</i> ATCC 9338	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+
<i>L. helveticus</i> ATCC 12046	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. leichmanii</i> ATCC 7830	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> ATCC 335	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
<i>L. plantarum</i> ATCC 10012	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-
<i>L. plantarum</i> ATCC 8014	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-
<i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
<i>L. rhamnosus</i> ATCC 9595	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
<i>Streptococcus thermophilus</i> 066	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. thermophilus</i> SAB	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. thermophilus</i> YM	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-

Fru = frutose; Gli = glicose; Lac = lactose; Mal = maltose; Man = manose; Mel = melibiose; Raf = rafinose; Ram = ramnose; Sac = sacarose; Sor = sorbitol; Xil = xilose; + = positivo para fermentação; - = negativo para fermentação.

Tabela 2. Média das contagens de cepas de *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp. e *Streptococcus thermophilus* em meios de cultura adicionados de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC). Incubação a 37 °C em aerobiose por 48 h para lactobacilos e estreptococos e em anaerobiose por 72 h para bifidobactérias.

Grupo	Espécie / Cepa	Controle	TTC 25	TTC 50	TTC 100	TTC 200
Bifidobactérias	<i>Bifidobacterium</i> sp. CIRMBIA 1387	277,5	271	274,5	251,5	246
	<i>Bifidobacterium</i> sp. CIRMBIA 1394	127,5	114,5	111,5	105,5	78
	<i>B. animalis</i> CIRMBIA 1388	254,5	255,5	249,5	254	1
	<i>B. animalis</i> CIRMBIA 1389	58,5	48,5	57	49	0
	<i>B. animalis</i> CIRMBIA 1390	185	152	177	96,5	0
	<i>B. animalis</i> CIRMBIA 1392	108,5	64,5	83,5	84,5	23
	<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i> CIRMBIA 1335	37	45,5	43	33	0
	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb 12	84	89,5	86	75	76,5
	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> CIRMBIA 1340	41,5	47,5	40,5	0	0
	<i>B. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> BI-07	229,5	218	218	207,5	36,5
	<i>B. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> SAB	296	320,5	314,5	303,5	270
	<i>B. longum</i> CIRMBIA 1395	60	45,5	62,5	36,5	0
	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> LGM P-17500	238,5	252	251	252,5	64,5
	Lactobacilos	<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	30,5	26,5	25	20,5
<i>L. acidophilus</i> La-5		64	77	85	58	13
<i>L. acidophilus</i> SAB		66	54	46,5	59,5	60
<i>L. brevis</i> ATCC 367		55,5	52	58,5	37,5	36,5
<i>L. casei</i> CIRMBIA 667		182,5	0	0	0	0,5
<i>L. casei</i> CIRMBIA 767		92,5	60,5	0	0	0
<i>L. casei</i> CIRMBIA 769		149,5	128	0,5	0	0
<i>L. casei</i> CIRMBIA 771		93	0	0	0	0,5
<i>L. casei</i> subsp. <i>alactosus</i> CCT 1376		109	109,5	0	0	0
<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> CCT 1465		138	0	0	0	0
<i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> CCT 0842	69,5	50	0	0	0	

Continuação da Tabela 2

Grupo	Espécie / Cepa	Controle	TTC 25	TTC 50	TTC 100	TTC 200
Lactobacilos	<i>L. casei</i> subsp. <i>ramnosus</i> CCT 5835	229,5	224	218,5	231	217,5
	<i>L. casei</i> subsp. <i>ramnosus</i> CCT 6645	99	108,5	88	78,5	0
	<i>L. paracasei</i> CCT 0556	169,5	0	0	0	0
	<i>L. paracasei</i> CCT 7501	94	78,5	78	65,5	44
	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> YM	162	132,5	104	110,5	12,5
	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> CCT 3744	64,5	82	49,5	70	23,5
	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 4797	49,5	38,5	31,5	32,5	4,5
	<i>L. fermentum</i> ATCC 23271	37,5	1,5	0	0,5	0
	<i>L. fermentum</i> ATCC 9338	104	99,5	97,5	106,5	63
	<i>L. helveticus</i> ATCC 12046	68,5	61	54	58,5	14,5
	<i>L. leichmanii</i> ATCC 7830	45,5	39,5	37	40	32
	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> ATCC 335	52,5	55,5	49,5	53	0
	<i>L. plantarum</i> ATCC 10012	79,5	77	87,5	84	80,5
	<i>L. plantarum</i> ATCC 8014	254	242,5	259	222	237,5
	<i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469	102,5	101,5	95	0	0
	<i>L. rhamnosus</i> ATCC 9595	166,5	159	179	136	0
Estreptococos	<i>Streptococcus thermophilus</i> 066	67,5	78,5	62,5	65	0
	<i>S. thermophilus</i> SAB	177,5	166,5	178	152,5	0
	<i>S. thermophilus</i> YM	60	54	34,5	33,5	0

Controle = MRS-cisteína para bifidobactérias, MRS para lactobacilos, M17 para estreptococos sem adição de TTC; TTC 25, TTC 50, TT 100, TTC 200 = concentrações de TTC adicionado ao meio de cultura eletivo de 25, 50, 100 e 200 mg/L respectivamente.

Tabela 3. Valores proporcionais da média de contagem de cepas de *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp. e *Streptococcus thermophilus* em meios de cultura eletivos adicionados de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC). Incubação a 37 °C em aerobiose por 48 h para lactobacilos e estreptococos e em anaerobiose por 72 h para bifidobactérias.

Grupo	Espécie / Cepa	Controle	TTC 25	TTC 50	TTC 100	TTC 200
Bifidobactérias	<i>Bifidobacterium</i> sp. CIRMBIA 1387	100	97,7	98,9	90,6	88,6
	<i>Bifidobacterium</i> sp. CIRMBIA 1394	100	89,8	87,5	82,7	61,2
	<i>B. animalis</i> CIRMBIA 1388	100	100,4	98,0	99,8	0,4
	<i>B. animalis</i> CIRMBIA 1389	100	82,9	97,4	83,8	0,0
	<i>B. animalis</i> CIRMBIA 1390	100	82,2	95,7	52,2	0,0
	<i>B. animalis</i> CIRMBIA 1392	100	59,4	77,0	77,9	21,2
	<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i> CIRMBIA 1335	100	123,0	116,2	89,2	0,0
	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb 12	100	106,5	102,4	89,3	91,1
	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> CIRMBIA 1340	100	114,5	97,6	0,0	0,0
	<i>B. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> BI-07	100	95,0	95,0	90,4	15,9
	<i>B. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> SAB	100	108,3	106,3	102,5	91,2
	<i>B. longum</i> CIRMBIA 1395	100	75,8	104,2	60,8	0,0
	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> LGM P-17500	100	105,7	105,2	105,9	27,0
	Lactobacilos	<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	100	86,9	82,0	67,2
<i>L. acidophilus</i> La-5		100	120,3	132,8	90,6	20,3
<i>L. acidophilus</i> SAB		100	81,8	70,5	90,2	90,9
<i>L. brevis</i> ATCC 367		100	93,7	105,4	67,6	65,8
<i>L. casei</i> CIRMBIA 667		100	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>L. casei</i> CIRMBIA 767		100	65,4	0,0	0,0	0,0
<i>L. casei</i> CIRMBIA 769		100	85,6	0,3	0,0	0,0
<i>L. casei</i> CIRMBIA 771		100	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>L. casei</i> subsp. <i>alactosus</i> CCT 1376		100	100,5	0,0	0,0	0,0
<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> CCT 1465		100	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> CCT 0842		100	71,9	0,0	0,0	0,0

Continuação da Tabela 3

Grupo	Espécie / Cepa	Controle	TTC 25	TTC 50	TTC 100	TTC 200
Lactobacilos	<i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> CCT 5835	100	97,6	95,2	100,7	94,8
	<i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> CCT 6645	100	109,6	88,9	79,3	0,0
	<i>L. paracasei</i> CCT 0556	100	0,0	0,0	0,0	0,0
	<i>L. paracasei</i> CCT 7501	100	83,5	83,0	69,7	46,8
	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> YM	100	81,8	64,2	68,2	7,7
	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> CCT 3744	100	127,1	76,7	108,5	36,4
	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 4797	100	77,8	63,6	65,7	9,1
	<i>L. fermentum</i> ATCC 23271	100	4,0	0,0	0,0	0,0
	<i>L. fermentum</i> ATCC 9338	100	95,7	93,8	102,4	60,6
	<i>L. helveticus</i> ATCC 12046	100	89,1	78,8	85,4	21,2
	<i>L. leichmanii</i> ATCC 7830	100	86,8	81,3	87,9	70,3
	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> ATCC 335	100	105,7	94,3	101,0	0,0
	<i>L. plantarum</i> ATCC 10012	100	96,9	110,1	105,7	101,3
	<i>L. plantarum</i> ATCC 8014	100	95,5	102,0	87,4	93,5
	<i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469	100	99,0	92,7	0,0	0,0
<i>L. rhamnosus</i> ATCC 9595	100	95,5	107,5	81,7	0,0	
Estreptococos	<i>Streptococcus thermophilus</i> 066	100	116,3	92,6	96,3	0,0
	<i>S. thermophilus</i> SAB	100	93,8	100,3	85,9	0,0
	<i>S. thermophilus</i> YM	100	90,0	57,5	55,8	0,0

Controle = MRS-cisteína para bifidobactérias, MRS para lactobacilos, M17 para estreptococos sem adição de TTC; TTC 25, TTC 50, TT 100, TTC 200 = concentrações de TTC adicionado ao meio de cultura eletivo de 25, 50, 100 e 200 mg/L respectivamente.

Tabela 4. Média das contagens de cepas de *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp. e *Streptococcus thermophilus* em meios de cultura eletivos, MRS-ABC, MRS-NNLP, TOS-MUP e RP-MUP. Incubação a 37 °C em anaerobiose por 72 h.

Grupo	Espécie / Cepa	Controle	MRS-ABC	MRS-NNLP	TOS-MUP	RP-MUP
Bifidobactérias	<i>B. animalis</i> CIRMBIA 1388	133,5	129	49	116	192
	<i>B. animalis</i> CIRMBIA 1389	167,5	167,5	115	144	134,5
	<i>B. animalis</i> CIRMBIA 1390	217	227	166	198,5	185
	<i>B. animalis</i> CIRMBIA 1392	187	138,5	86	191,5	199
	<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i> CIRMBIA 1335	80,5	64,5	39,5	0	0
	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb 12	137,5	126,5	79,5	124	106,5
	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> CIRMBIA 1340	180	166	120,5	176	148
	<i>B. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> BI-07	173,5	192	124	206	182,5
	<i>B. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> SAB	288,5	286	217,5	275,5	240
	<i>B. longum</i> CIRMBIA 1395	139,5	127	75	125,5	144,5
	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> LGM P-17500	249,5	252	193,5	238	210
Lactobacilos	<i>L. acidophilus</i> La-5	57,5	0	0	0	0
	<i>L. acidophilus</i> SAB	49	0	0	0	0
	<i>L. brevis</i> ATCC 367	150,5	137,5	0	0	0
	<i>L. casei</i> CIRMBIA 667	187	181	0	0	0
	<i>L. casei</i> CIRMBIA 767	138,5	149	0	0	0
	<i>L. casei</i> CIRMBIA 769	144	162	0	0	0
	<i>L. casei</i> CIRMBIA 771	138,5	135,5	0	0	0
	<i>L. paracasei</i> CCT 0556	197	176	201	0	0
	<i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> CCT 0842	84,5	57,5	3,5	0	0
	<i>L. casei</i> subsp. <i>alactosus</i> CCT 1376	94,5	119	93	0	0
	<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> CCT 1465	106,5	110	0	0	0
	<i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> CCT 5835	135	135	0	0	0
	<i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> CCT 6645	111	27,5	0	0	0
	<i>L. paracasei</i> 7501	60,5	34	44	0	0

Continuação da Tabela 4

Grupo	Espécie / Cepa	Controle	MRS-ABC	MRS-NNLP	TOSMUP	RPMUP
Lactobacilos	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> YM	61	0	0	0	0
	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> CCT 3744	52	0	0	0	0
	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 4797	124	0	0	0	0
	<i>L. fermentum</i> ATCC 23271	76	48,5	0	0	0
	<i>L. fermentum</i> ATCC 9338	33,5	29	0	0	0
	<i>L. helveticus</i> ATCC 12046	88,5	0	0	0	0
	<i>L. leichmanii</i> ATCC 7830	51	0	0	0	0
	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> ATCC 335	63	60,5	0	0	0
	<i>L. plantarum</i> ATCC 10012	66,5	63	0	0	0
	<i>L. plantarum</i> ATCC 8014	84,5	113	0	0	0
	<i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469	117,5	2	0,5	0	0
	<i>L. rhamnosus</i> ATCC 9595	89	8	0	0	0
	Estreptococos	<i>Streptococcus thermophilus</i> 066	61	0	0	0
<i>S. thermophilus</i> SAB		65,5	76,5	0	0	0
<i>S. thermophilus</i> YM		66	5,5	0	0	0

Controle = MRS-cisteína para bifidobactérias, MRS para lactobacilos, M17 para estreptococos.

Tabela 5. Valores proporcionais da média de contagem de cepas de *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp. e *Streptococcus thermophilus* em meios de cultura eletivos, MRS-ABC, MRS-NNLP, TOS-MUP e RP-MUP. Incubação a 37 °C em anaerobiose por 72 h.

Grupo	Espécie / Cepa	Controle	MRS-ABC	MRS-NNLP	TOSMUP	RPMUP
Bifidobactérias	<i>B. animalis</i> CIRMBIA 1388	100	96,6	36,7	86,9	143,8
	<i>B. animalis</i> CIRMBIA 1389	100	100,0	68,7	86,0	80,3
	<i>B. animalis</i> CIRMBIA 1390	100	104,6	76,5	91,5	85,3
	<i>B. animalis</i> CIRMBIA 1392	100	74,1	46,0	102,4	106,4
	<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i> CIRMBIA 1335	100	80,1	49,1	0,0	0,0
	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb 12	100	92,0	57,8	90,2	77,5
	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> CIRMBIA 1340	100	92,2	66,9	97,8	82,2
	<i>B. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> BI-07	100	110,7	71,5	118,7	105,2
	<i>B. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> SAB	100	99,1	75,4	95,5	83,2
	<i>B. longum</i> CIRMBIA 1395	100	91,0	53,8	90,0	103,6
	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> LGM P-17500	100	101,0	77,6	95,4	84,2
Lactobacilos	<i>L. acidophilus</i> La-5	100	0,0	0,0	0,0	0,0
	<i>L. acidophilus</i> SAB	100	0,0	0,0	0,0	0,0
	<i>L. brevis</i> ATCC 367	100	91,4	0,0	0,0	0,0
	<i>L. casei</i> CIRMBIA 667	100	96,8	0,0	0,0	0,0
	<i>L. casei</i> CIRMBIA 767	100	107,6	0,0	0,0	0,0
	<i>L. casei</i> CIRMBIA 769	100	112,5	0,0	0,0	0,0
	<i>L. casei</i> CIRMBIA 771	100	97,8	0,0	0,0	0,0
	<i>L. casei</i> subsp. <i>alactosus</i> CCT 1376	100	125,9	98,4	0,0	0,0
	<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> CCT 1465	100	103,3	0,0	0,0	0,0
	<i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> CCT 0842	100	68,0	4,1	0,0	0,0
	<i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> CCT 5835	100	100,0	0,0	0,0	0,0
	<i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> CCT 6645	100	24,8	0,0	0,0	0,0
	<i>L. paracasei</i> CCT 0556	100	89,3	102,0	0,0	0,0
	<i>L. paracasei</i> 7501	100	56,2	72,7	0,0	0,0

Continuação da Tabela 5

Grupo	Espécie / Cepa	Controle	MRS-ABC	MRS-NNLP	TOS-MUP	RP-MUP
	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> YM	100	0,0	0,0	0,0	0,0
	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> CCT 3744	100	0,0	0,0	0,0	0,0
	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 4797	100	0,0	0,0	0,0	0,0
	<i>L. fermentum</i> ATCC 23271	100	63,8	0,0	0,0	0,0
	<i>L. fermentum</i> ATCC 9338	100	86,6	0,0	0,0	0,0
	<i>L. helveticus</i> ATCC 12046	100	0,0	0,0	0,0	0,0
	<i>L. leichmanii</i> ATCC 7830	100	0,0	0,0	0,0	0,0
	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> ATCC 335	100	96,0	0,0	0,0	0,0
	<i>L. plantarum</i> ATCC 10012	100	94,7	0,0	0,0	0,0
	<i>L. plantarum</i> ATCC 8014	100	133,7	0,0	0,0	0,0
	<i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469	100	1,7	0,4	0,0	0,0
	<i>L. rhamnosus</i> ATCC 9595	100	9,0	0,0	0,0	0,0
Estreptococos	<i>Streptococcus thermophilus</i> 066	100	0,0	0,0	0,0	0,0
	<i>S. thermophilus</i> SAB	100	116,8	0,0	0,0	0,0
	<i>S. thermophilus</i> YM	100	8,3	0,0	0,0	0,0

Controle = MRS-cisteína para bifidobactérias, MRS para lactobacilos, M17 para estreptococos.

Tabela 6. Parâmetros de correlação das médias de contagens de leites fermentados artificialmente produzidos com *Bifidobacterium* spp. utilizando os ágaros TOS-MUP, RP-MUP e Petrifilm™ AC com caldo RP-MUP. A incubação foi realizada em anaerobiose a 37 °C por 72 h para os ágaros e por 24, 48 e 72 h para os Petrifilm™ AC. As comparações foram feitas para os ágaros e entre os ágaros e o Petrifilm™ AC nos diferentes tempos de incubação.

Pares (x:y)	n	r	r ²	Intercepto	Inclinação	p
TOS-MUP:RP-MUP	35	0,999	0,998	0,059	0,991	<0,0001
TOS-MUP:Petrifilm 24h	23	0,998	0,997	-0,732	1,088	<0,0001
TOS-MUP:Petrifilm 48h	35	0,998	0,996	0,185	0,974	<0,0001
TOS-MUP:Petrifilm 72h	35	0,998	0,996	0,064	0,988	<0,0001
RP-MUP:Petrifilm 24h	23	0,998	0,996	-0,824	1,101	<0,0001
RP-MUP:Petrifilm 48h	35	0,997	0,994	0,140	0,981	<0,0001
RP-MUP:Petrifilm 72h	35	0,999	0,998	0,008	0,997	<0,0001

n = número de contagens consideradas para análise; r = índice de correlação; r² = coeficiente de determinação; p = nível de significância.

Tabela 7. Parâmetros de correlação das médias de contagens de leites fermentados artificialmente produzidos com *Bifidobacterium* spp. utilizando Petrifilm™ AC e caldo RP-MUP. A incubação foi realizada em anaerobiose a 37 °C e as comparações foram feitas entre os tempos de contagem 24, 48 e 72 horas.

Pares (x:y)	n	r	r ²	Intercepto	Inclinação	p
24h:48h	23	0,998	0,996	-0,892	1,108	<0,0001
24h:72h	23	0,998	0,997	-0,857	1,107	<0,0001
48h:72h	35	0,998	0,997	0,131	0,984	<0,0001

n = número de contagens consideradas para análise; r = índice de correlação; r² = coeficiente de determinação; p = nível de significância