

**MONIQUE COLOMBO**

**DESENVOLVIMENTO DE UM MEIO DE CULTURA  
ALTERNATIVO PARA ENUMERAÇÃO SELETIVA DE  
*Lactobacillus casei* EM LEITES FERMENTADOS**

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

C718d  
2013

Colombo, Monique, 1988-

Desenvolvimento de um meio de cultura alternativo para  
enumeração seletiva de *Lactobacillus casei* em leites  
fermentados / Monique Colombo. – Viçosa, MG, 2013.  
xi, 58 f. : il. ; 29 cm.

Inclui anexo.

Texto em português e inglês.

Orientador: Luís Augusto Nero.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Leite - Microbiologia. 2. *Lactobacillus casei*. 3. Alimentos  
- Microbiologia. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em  
Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 637.1277

MONIQUE COLOMBO

**DESENVOLVIMENTO DE UM MEIO DE CULTURA ALTERNATIVO PARA  
ENUMERAÇÃO SELETIVA DE *Lactobacillus casei* EM LEITES  
FERMENTADOS**

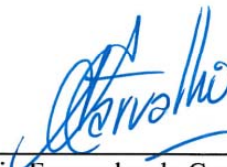
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 25 de julho de 2013.



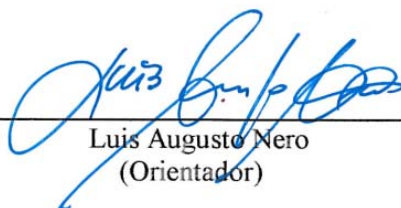
---

Vanerli Beloti



---

Antonio Fernandes de Carvalho  
Coorientador



---

Luis Augusto Nero  
(Orientador)

Dedico esta dissertação aos maiores motivos do brilho no meu sorriso:  
meus pais, Graça e Augustinho, e meu irmão Henrique.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar, por ter me guiado por este lindo caminho no qual me sinto tão feliz e realizada. Por sempre cuidar de mim com todo amor e carinho.

Aos meus pais, que me ensinaram a viver a vida com dignidade. Por todo amor e dedicação sem medidas. Que se doaram por inteiros e renunciaram seus sonhos para que muitas vezes eu pudesse realizar os meus.

Ao meu irmão por toda amizade, incentivo e apoio. Por ser o melhor irmão e amigo que uma pessoa pode ter.

À toda minha família pelo amor incondicional.

Ao meu orientador, professor Luis Augusto Nero, pela oportunidade de orientação e pela confiança depositada em mim desde o primeiro dia. Por todo apoio, atenção, compreensão, dedicação e ensinamentos. Por ser meu grande exemplo de inteligência e profissionalismo.

Ao meu coorientador, professor Antônio Fernandes de Carvalho, por todo carinho, paciência e ajuda na realização do meu projeto.

À professora Vanerli Beloti, pela disposição e boa vontade em participar da minha banca de defesa do mestrado.

À querida secretária Rosi, pelo exemplo de humildade e perseverança. Por cada conselho, ajuda e incentivo para a realização desse mestrado. Por ser mais que uma amiga carinhosa e atenciosa, por ser uma mãe que eu tanto amo e me orgulho de ter por perto.

A todos os professores do Departamento de Veterinária, em especial a professora Maria Aparecida, o professor Abelardo e o professor Paulo Sérgio Arruda Pinto pelos conselhos valiosos e pela amizade cheia de carinho.

À querida amiga Sanely, por toda disposição em me ajudar e apoiar desde o primeiro dia em que cheguei na UFV. Por sempre me dar valiosos conselhos e confiar em mim até quando eu mesma já não confiava mais.

A todos os colegas e companheiros de laboratório, em especial aqueles que se tornaram grandes e fiéis amigos: Letícia, Camilla, Valéria, Raquel, Mariane, Thalita e Japa. Obrigada pelos felizes momentos que passamos juntos.

À bolsista do meu projeto, Aline, que antes de qualquer coisa se tornou uma grande amiga e companheira de projeto até mesmo nos finais de semana.

Aos amigos dos laboratórios de virologia, bacteriologia, reprodução animal, clínica de grandes e pequenos animais. Por cada sorriso encontrado nos corredores do

departamento, por cada palavra de carinho e demonstração de afeto. Vocês não fazem ideia de como meus dias sempre foram mais iluminados por esses sorrisos.

Aos técnicos e funcionários do Departamento de Veterinária, por todo apoio e ajuda na execução do meu projeto. Em especial a secretária Beth e os técnicos Dagoberto, Luís e Ademir: sem vocês não conseguiria ter chegado tão longe, não só pela ajuda no meu projeto, mas principalmente por todo carinho e atenção.

Aos amigos do laboratório de Bacteriologia: Vitor, Cristian, Fábio e professora Maria Aparecida. Pela ajuda e apoio desde o início do meu mestrado. Por acreditarem e confiarem em mim e pela disposição em me ajudar.

Aos professores Carlos Henrique, Isis Lustosa, Paulo Henrique Fonseca da Silva e Ana Paula por toda confiança, apoio e incentivo depositados em mim.

Aos professores e amigos Ana Clarissa e Maximiliano, pela amizade, atenção e carinho sempre.

Às amigas de Juiz de Fora: Cássia, Willane, Isabela e Cíntia. Por mesmo longe sempre estarem tão perto. Por jamais desistirem da nossa amizade.

Ao meu namorado, Alberto, por todo carinho, apoio e compreensão neste último ano do meu mestrado.

Aos órgãos de fomento CNPq, FAPEMIG e CAPES pelo financiamento do projeto e pela bolsa de mestrado.

A todos que, direta ou indiretamente, fizeram ou fazem parte da realização desse lindo sonho. Meu muito obrigada!

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	VII
LISTA DE TABELAS .....	VIII
RESUMO .....	X
ABSTRACT .....	XI
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
1. Micro-organismos probióticos.....	2
2. Produtos probióticos.....	3
3. Monitoramento de populações microbianas em produtos probióticos.....	4
4. Meios de cultura seletivos e meios alternativos.....	5
4.1. <i>Petrifilm™ Aerobic Count (3M Microbiology, St. Paul, MN, EUA)</i> .....	8
Referências .....	10
OBJETIVOS.....	19
1. Objetivo geral .....	19
2. Objetivos específicos.....	19
ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO. DEVELOPMENT OF AN ALTERNATIVE CULTURE MEDIUM FOR SELECTIVE ENUMERATION OF <i>LACTOBACILLUS</i> <i>CASEI</i> IN FERMENTED MILKS .....	20
Title Page.....	21
ABSTRACT .....	22
1. Introduction.....	23
2. Materials and Methods .....	24
2.1. <i>Bacterial strains</i> .....	24
2.2. <i>Evaluation of chemicals for the selective enumeration of starter cultures</i> .....	25
2.3. <i>Evaluation of the inhibitory potential of TTC on starter cultures</i> .....	25
2.4. <i>Evaluation of the incubation condition for starter culture growth</i> .....	26
2.5. <i>Production of probiotic fermented milks and evaluation of MRS-V and MRTL broths with Petrifilm™ AC for Lb. casei enumeration</i> .....	26
2.6. <i>Statistical analysis</i> .....	28
3. Results and Discussion.....	28
3.2. <i>Evaluation of chemical substances for selective enumeration of starter cultures</i> .....	28
3.2. <i>Evaluation of the inhibitory potential of TTC on starter cultures</i> .....	31

3.3. Evaluation of incubation conditions for starter culture growth .....	32
3.4. Production of probiotic fermented milk and evaluation of MRS-V and MRTLV broths in association with Petrifilm™ AC for <i>Lb. casei</i> enumeration.....	33
4. Conclusion .....	35
Acknowledgments.....	36
Tables .....	40
Figures .....	45
CONCLUSÕES .....	49
ANEXOS.....	50

## LISTA DE FIGURAS

### ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

- Figure 1. Mean values of microbial counts obtained from distinct starter cultures strains plated on de Man Rogosa and Sharpe agar (Oxoid) added to distinct chemical substances at distinct concentrations: (A) lithium chloride; (B) sodium propionate; (C) bile; (D) nalidixic acid; (E) metronidazole; (F) vancomycin. In each graph, mean counts with distinct small case letters are significantly different by ANOVA and Tukey test ( $p < 0.05$ ). ..... 45
- Figure 2. Mean counts of microbial groups plated on MRS agar added with vancomycin at 10 mg/L, and MRS agar. Mean counts with distinct small case letters are significantly different by ANOVA and Tukey test ( $p < 0.05$ ). ..... 46
- Figure 3. Mean counts of microbial groups plated on MRS agar added with distinct concentrations of TTC. Mean counts with distinct small case letters are significantly different by ANOVA and Tukey test ( $p < 0.05$ ). ..... 47
- Figure 4. Relationship between counts of *Lb. casei* in acidophilus milk (A and B) and yogurt (C and D) obtained by conventional methodology and alternative system Petrifilm™ AC with MRS-V and MRTLV. .... 48

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

Table 1. Starter cultures strains considered in the present study.....	40
Table 2. Selective and/or differential substances used in the present study, with their respective concentrations evaluated. ....	41
Table 3. Mean values for enumeration of the strains belonging to “other <i>lactobacilli</i> ” and “ <i>S. thermophilus</i> ” groups after inoculation in MRS agar and MRS agar added to vancomycin at 10 mg/L. ....	42
Table 4. Counts of starter cultures strains obtained in Petrifilm™ AC plates added to MRS, MRS-V, and MRTLV broths, after incubation at 37 °C for 48 h, under aerobiosis and anaerobiosis conditions (GasPak™ EZ Anaerobe Sachets, BD). ....	43
Table 5. Mean values ( $\pm$ standard deviation) of scores obtained for <i>Lb. casei</i> in acidophilus milk and yogurt in conventional methodology and alternative system Petrifilm™ AC with MRS-V and MRTLV. ....	44

### ANEXOS

Tabela 1. Comparações individuais, por cepa bacteriana testada, das contagens obtidos em ágar MRS adicionado de cloreto de lítio em diferentes concentrações. Valores com letras minúsculas diferentes são estatisticamente diferentes por ANOVA ( $p < 0.05$ ). ....	51
Tabela 2. Comparações individuais, por cepa bacteriana testada, das contagens obtidos em ágar MRS adicionado de propionato de sódio em diferentes concentrações. Valores com letras minúsculas diferentes são estatisticamente diferentes por ANOVA ( $p < 0.05$ ). ....	52
Tabela 3. Comparações individuais, por cepa bacteriana testada, das contagens obtidos em ágar MRS adicionado de bile em diferentes concentrações. Valores com letras minúsculas diferentes são estatisticamente diferentes por ANOVA ( $p < 0.05$ ). ....	53
Tabela 4. Comparações individuais, por cepa bacteriana testada, das contagens obtidos em ágar MRS adicionado de ácido nalidíxico em diferentes concentrações. Valores	

com letras minúsculas diferentes são estatisticamente diferentes por ANOVA ( $p < 0.05$ ).....	54
Tabela 5. Comparações individuais, por cepa bacteriana testada, das contagens obtidos em ágar MRS adicionado de vancomicina (teste 1) em diferentes concentrações. Valores com letras minúsculas diferentes são estatisticamente diferentes por ANOVA ( $p < 0.05$ ).....	55
Tabela 6. Comparações individuais, por cepa bacteriana testada, das contagens obtidos em ágar MRS adicionado de metronidazol em diferentes concentrações. Valores com letras minúsculas diferentes são estatisticamente diferentes por ANOVA ( $p < 0.05$ ). .....	56
Tabela 7. Comparações individuais, por cepa bacteriana testada, das contagens obtidos em ágar MRS adicionado de vancomicina (teste 2) em diferentes concentrações. Valores com letras minúsculas diferentes são estatisticamente diferentes por ANOVA ( $p < 0.05$ ).....	57
Tabela 8. Comparações individuais, por cepa bacteriana testada, das contagens obtidos em ágar MRS adicionado de cloreto de 2,3,5,-trifeniltetrazólio em diferentes concentrações. Valores com letras minúsculas diferentes são estatisticamente diferentes por ANOVA ( $p < 0.05$ ). .....	58

## RESUMO

COLOMBO, Monique, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2013. **Desenvolvimento de um meio de cultura alternativo para enumeração seletiva de *Lactobacillus casei* em leites fermentados.** Orientador: Luís Augusto Nero. Coorientador: Antonio Fernandes de Carvalho.

Micro-organismos da espécie *Lactobacillus casei* são os probióticos mais estudados, uma vez que são capazes de promover efeitos benéficos para a saúde humana. Além disso, os micro-organismos dessa espécie são ácido-tolerantes, sendo capazes de sobreviver ao ambiente gastrointestinal sem serem inativados. Quando adicionados em alimentos, devem se apresentar numa concentração mínima (maior que  $10^6$  UFC/mL ou g) para exercerem efetivamente a atividade probiótica. Por essas características, é necessário o monitoramento das populações dessas culturas quando adicionadas em alimentos, apesar da ausência de um protocolo oficial com esta finalidade. O sistema Petrifilm™ AC pode representar uma alternativa para enumeração de culturas *starter* e probióticas, desde que associado com meios de cultura seletivos. O presente estudo teve como objetivo a avaliação de substâncias químicas como agentes seletivos para *Lb. casei*, a fim de propor um meio de cultura seletivo para ser associado a placas Petrifilm™ AC, a ser avaliado como um protocolo alternativo de enumeração deste probiótico em leites fermentados. Vinte e seis culturas probióticas e *starter* (incluindo 6 cepas de *Lb. casei*) foram plaqueadas em ágar MRS com diferentes concentrações de ácido nalidíxico, bile, cloreto de lítio, metronidazol, propionato de sódio e vancomicina; somente vancomicina (10 mg/L) apresentou atividade seletiva para *Lb. casei*. Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio foi identificado como não inibitório para *Lb. casei* e placas de Petrifilm™ AC associadas a MRS adicionado de vancomicina a 10 mg/L (MRS-V) apresentaram contagens mais elevadas quando incubadas sob anaerobiose que em aerobiose. Leites fermentados acidificados e iogurtes foram preparados, adicionados de cepas de *Lb. casei*, estocados a 4 °C e as populações de *Lb. casei* foram monitoradas usando MRS-V e MRTLV por plaqueamento convencional e pelo sistema Petrifilm™ AC. Todos os índices de correlação entre as contagens obtidas por plaqueamento convencional e pelo sistema Petrifilm™ AC foram significativos ( $p < 0.05$ ), mas o melhor desempenho foi observado para MRS-V. Os dados obtidos indicaram a adequação do uso do MRS-V associado às placas Petrifilm™ AC para enumeração de *Lb. casei* em leites fermentados.

## ABSTRACT

COLOMBO, Monique, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2013. **Development of a culture medium for alternate selective enumeration of *Lactobacillus casei* in fermented milks.** Advisor: Luís Augusto Nero. Co-advisor: Antonio Fernandes de Carvalho.

Monitoring the populations of probiotic organisms such as *Lactobacillus casei* in food is required by food industries in order to assure that a minimum concentration of these organisms will be ingested by consumers. In this context, Petrifilm™ AC plates can be used along with selective culture media to allow the enumeration of specific groups of lactic acid bacteria. The present study aimed to assess chemical substances as selective agents for *Lb. casei* in order to propose a selective culture medium to be used with Petrifilm™ AC plates as an alternative protocol for the enumeration of this probiotic organism in fermented milk. Twenty-six probiotic and starter cultures (including 6 strains of *Lb. casei*) were plated on de Man Rogosa and Sharpe (MRS) agar with distinct concentrations of nalidixic acid, bile, lithium chloride, metronidazole, sodium propionate, and vancomycin. Vancomycin at 10 mg/L demonstrated selective activity for *Lb. casei*. In addition, 2,3,5-triphenyltetrazolium chlorine was identified as a compound that did not inhibit *Lb. casei*, and Petrifilm™ AC plates used with MRS and vancomycin at 10 mg/L (MRS-V) demonstrated more colonies of this organism when incubated under anaerobic conditions than aerobic conditions. Acidophilus milk and yoghurt were prepared, added to *Lb. casei* strains, and stored at 4 °C. *Lb. casei* populations were monitored using MRS-V and MRTLV by conventional plating and associated with Petrifilm™ AC plates. All correlation indices between counts obtained by conventional plating and Petrifilm™ AC were significant ( $p < 0.05$ ), but the best performance was observed for growth on MRS-V. The obtained data indicate the efficiency of using MRS-V associated with Petrifilm™ AC plates for the enumeration of *Lb. casei* strains in fermented milk.

## INTRODUÇÃO GERAL

Micro-organismos vivos têm sido cada vez mais utilizados em alimentos com o objetivo de promover melhoria na saúde dos consumidores. Estes micro-organismos são chamados de probióticos, e as espécies mais conhecidas são *Lactobacillus casei*, *Lb. paracasei* e *Bifidobacterium* spp. Vários estudos visam a caracterização da atividade probiótica desses micro-organismos, assim como suas aplicações na produção de alimentos fermentados tradicionais e comerciais.

Uma vez adicionados nos alimentos, o monitoramento das populações dessas culturas é fundamental: esses micro-organismos são capazes de promover benefícios à saúde apenas quando presentes em concentrações mínimas nos alimentos fermentados (em torno de  $10^6$  UFC/mL ou g). Ainda não existe qualquer metodologia padrão para enumeração seletiva de micro-organismos probióticos em culturas *starter* mistas, que permita o desenvolvimento de colônias diferenciadas da cultura de interesse.

A enumeração diferencial de micro-organismos probióticos e culturas *starter* em um mesmo produto é relativamente difícil, pois esses micro-organismos são geneticamente relacionados, e assim possuem várias características fenotípicas e bioquímicas em comum. Essa limitação dificulta o desenvolvimento de um meio de cultura com seletividade suficiente para *Lb. casei* em alimentos fermentados, impedindo o desenvolvimento de um método oficial de enumeração. Vários pesquisadores propuseram meios de culturas seletivos para enumeração de *Lb. casei*. Entretanto, nenhum deles apresentou atividade adequada para diferenciação de outras culturas adicionadas em um mesmo alimento.

O sistema Petrifilm™ tem sido descrito como uma metodologia prática, simples e viável para o monitoramento de micro-organismos indicadores de higiene em indústrias de alimentos. Considerando essa aplicabilidade, as placas Petrifilm™ AC (*Aerobic Count*) podem ser associadas a meios de cultura específicos para enumeração de bactérias lácticas. Gêneros específicos de bactérias lácticas, ou mesmo determinadas espécies ou cepas, podem ser adequadamente enumeradas dependendo de quais agentes seletivos são adicionados. Assim, o objetivo desse projeto de pesquisa foi avaliar a seletividade de algumas substâncias para enumeração de culturas probióticas de *Lb. casei*, visando à elaboração de um meio de cultura base para associação ao Petrifilm™ AC e enumeração seletiva dessa espécie.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1. Micro-organismos probióticos

Probióticos são definidos como organismos vivos que quando ingeridos em concentrações adequadas beneficiam a saúde do consumidor (ANVISA, 2002; Aryana & McGrew, 2007; Ashraf & Shah, 2011; Bertazzoni Minelli et al., 2004; Buriti & Saad, 2007; Fric, 2007; Lima et al., 2009; Nanno et al., 2011; WGO, 2009). Dentre as espécies de probióticos mais conhecidas, podem ser mencionados *Lactobacillus casei*, *Lb. paracasei* e *Bifidobacterium* spp. Vários estudos visam a caracterização da atividade probiótica desses micro-organismos, bem como suas aplicações na produção de alimentos fermentados tradicionais e comerciais. Bactérias ácido lácticas (BAL) são ferramentas tecnológicas importantes na produção de leites fermentados, queijos e uma variedade de outros produtos lácteos. BAL são usadas como culturas *starter* e, além disso, contribuem para a inocuidade microbiológica do produto oferecendo ainda uma ou várias vantagens organolépticas, tecnológicas, nutricionais ou de saúde (Leroy & De Vuyst, 2004).

O público alvo dos alimentos que veiculam esses micro-organismos, inicialmente formado por idosos, crianças e adultos com saúde debilitada, hoje abrange indivíduos saudáveis de todas as idades e até animais de produção e de companhia. Nos últimos 20 anos, as pesquisas nesta área progrediram consideravelmente. Significativos avanços na seleção e caracterização de culturas probióticas proporcionam fundamentos para os efeitos benéficos à saúde dos consumidores (Aguirre-Ezkauriatza et al., 2010; FAO, 2001; Maragkoudakis et al., 2006).

Apesar dos mecanismos de ação destes micro-organismos ainda não serem totalmente elucidados, vários estudos já demonstraram cientificamente os efeitos benéficos da ingestão de probióticos por seres humanos e animais, além de sua inocuidade (Aguirre-Ezkauriatza et al., 2010; Holzapfel et al., 2001; Maragkoudakis et al., 2006). Vários benefícios são determinados por estes micro-organismos, como: propriedades antimutagênicas (Le Leu et al., 2005; LeBlanc et al., 2005), anticarcinogênicas (Wollowski et al., 2001), antidiarreicas (Clancy, 2003; Rowland, 1999; Van Niel et al., 2002), estimulação do sistema imunológico (Baken et al., 2006; Galdeano & Perdigon, 2006; Hai et al., 2009; Hsieh & Chou, 2006; Maragkoudakis et al., 2006; Marzotto et al., 2006; Matsuzaki, 1998; Paineau et al., 2008; Prescott et al., 2008), prevenção de eczema e atopia (Isolauri, 2004; Isolauri et al., 2000; Wickens et

al., 2008), redução da pressão arterial (Hlivak et al., 2005), redução na concentração de colesterol (Hlivak et al., 2005), maior resistência a doenças infecciosas (Li et al., 2008; Rautava, 2007), estimulação do crescimento (Ohashi & Ushida, 2009), melhoria nas doenças gastrointestinais inflamatórias (Jones & Foxx-Orenstein, 2007; Myllyluoma et al., 2005; Ryan et al., 2009; Vandenplas et al., 2007), manutenção da microbiota equilibrada e melhora no metabolismo de lactose (Bertazzoni Minelli et al., 2004; de Vrese et al., 2001; Gill, 2003; Gismondo et al., 1999; Marzotto et al., 2006; Rowland, 1999; Shah, 2007; Shieh et al., 2011).

## **2. Produtos probióticos**

Segundo Ashraf & Shah (2011), mais de 500 produtos probióticos foram introduzidos mundialmente no mercado entre 2000 e 2010. Desde então, vários estudos tem demonstrado cientificamente os benefícios à saúde e a inocuidade de micro-organismos probióticos (Aguirre-Ezkauriatza et al., 2010; Maragkoudakis et al., 2006). Dessa forma, existe um grande interesse comercial em desenvolver novos produtos alimentares probióticos.

Desde a década de 1990, os produtos lácteos fermentados receberam atenção significativa pela presença desses micro-organismos probióticos em sua composição, sendo considerados os principais veículos para administração em concentrações ideais para os consumidores (Karimi et al., 2012; Van de Castele et al., 2006). Estes produtos são comercializados como alimentos funcionais principalmente na Europa, Japão, EUA e na Austrália (Phillips et al., 2006).

Os alimentos funcionais são alimentos ou componentes alimentares que promovem efeitos benéficos além dos componentes nutricionais básicos, como é o caso dos alimentos probióticos (Heasman & Mellentin, 2001). O governo do Japão foi um dos responsáveis pela divulgação de produtos probióticos, introduzindo o termo *foshu* (*foods for specified health use*) e com o propósito de reduzir gastos na saúde pública, desvinculando os alimentos funcionais dos produtos farmacêuticos (Sanders, 1998). Neste mesmo contexto, o cientista Minoru Shirota, por meio da venda dos leites fermentados da Yakult, colocou em prática o conceito de que prevenir doenças é melhor do que tratá-las, e de que um intestino saudável leva a uma vida longa. Dessa forma, destaca-se o *Lb. casei* Shirota, um dos primeiros micro-organismos probióticos apresentados comercialmente e que possui um forte apelo probiótico.

Com a busca do consumidor por uma vida mais saudável, as indústrias de alimentos vêm utilizando várias cepas probióticas associadas em um mesmo produto, além das culturas *starter* que são inoculadas para a produção efetiva do alimento fermentado (Antunes et al., 2007; Champagne et al., 1997; Vinderola & Reinheimer, 2000). O iogurte e os leites fermentados são considerados os principais veículos para os micro-organismos probióticos (Ranadheera et al., 2010). Estes produtos sempre foram reconhecidos pelos muitos efeitos desejáveis para o consumidor (Lourens-Hattingh & Viljoen, 2001). Além disso, são destacados por possuírem mais benefícios nutricionais que o próprio leite, pois são nutricionalmente ricos em proteína, cálcio, riboflavina, vitaminas B6 e B12 (Ashraf & Shah, 2011; Buttriss, 1997; Phillips et al., 2006). Como as culturas *starter* responsáveis pela fermentação do iogurte podem não ser capazes de sobreviver à passagem gástrica ou colonizar o intestino, conseqüentemente não executam suas possíveis funções probióticas. Há uma tendência crescente em adicionar outras culturas probióticas associadas em um mesmo produto, como *Lb. casei* (Ashraf & Shah, 2011).

*Lb. casei* é uma espécie de BAL que coloniza diversos nichos ecológicos, entre eles, o trato gastrointestinal do homem. Esses micro-organismos possuem grande variabilidade fenotípica e genotípica, e são frequentemente utilizados na fabricação de alimentos fermentados (Aguirre-Ezkauriatza et al., 2010; Marzotto et al., 2006). São micro-organismos Gram-positivos, não esporulados, catalase-negativos, anaeróbios, ácido-tolerantes e estritamente fermentativos (Buriti & Saad, 2007). Por serem resistentes a condições ácidas, são capazes de sobreviver durante a passagem pelo ambiente gástrico, o que permite a colonização intestinal. Essa característica demonstra o potencial de utilização dessas espécies como culturas probióticas em alimentos, o que aumenta o interesse das indústrias do setor (Aguirre-Ezkauriatza et al., 2010; Bertazzoni Minelli et al., 2004; Maragkoudakis et al., 2006; Marzotto et al., 2006). Além disso, essa espécie possui alta capacidade em produzir ácido láctico, o que tem sido também foco de diversos estudos (Aguirre-Ezkauriatza et al., 2010).

### **3. Monitoramento de populações microbianas em produtos probióticos**

Os micro-organismos probióticos, depois de ingeridos, devem resistir às condições adversas do trato gastrointestinal (suco gástrico, ação da bile, sucos pancreáticos e entéricos) (Cotter et al., 2005; Sakai et al., 2010; Servin, 2004). Além disso, as culturas selecionadas devem possuir propriedades tecnológicas favoráveis para

serem utilizadas nos alimentos, como: fácil manipulação, rápido crescimento *in vitro*, ser altamente viável e estável durante a estocagem e, ainda, não produzir compostos que irão interferir na qualidade sensorial do produto (sobrevivendo no produto final e conservando sua função) (Salminen et al., 1998). Dessa forma, é importante que o desenvolvimento das culturas probióticas seja monitorado para garantir o consumo de células viáveis e em quantidades desejáveis, o que resultaria em sua efetiva ação no intestino delgado ou grosso do consumidor (Sanders, 1998).

A dose terapêutica diária proposta é de  $10^8$  a  $10^9$  unidades formadoras de colônias (UFC), o que corresponde à ingestão diária de 100 g de um produto alimentício contendo de  $10^6$  até  $10^7$  UFC/g (Ashraf & Shah, 2011; Buriti et al., 2005; Lahtinen et al., 2005; Lee & Salminen, 1995; Lourens-Hattingh & Viljoen, 2001; Vinderola & Reinheimer, 2000). Uma vez adicionados nos alimentos, o monitoramento das populações dessas culturas é fundamental, já que esses micro-organismos apresentam sua atividade probiótica apenas quando presentes em concentrações mínimas nos alimentos.

Alguns estudos mostram a pouca viabilidade dos probióticos encontrados no comércio, o que demanda o monitoramento através de meios de cultura seletivos (Barer et al., 2000; Bloomfield et al., 1998; Colwell, 2000; Kell et al., 1998; Nystrom, 2001; Shah, 2000; Shah et al., 1995; Yamamoto, 2000). Esta pouca viabilidade ocorre por alguns fatores, como características próprias das cepas utilizadas, interação com outras culturas *starter*, condições da cultura, produção de peróxido de hidrogênio devido o metabolismo bacteriano, acidez final do produto e a concentração de ácidos acético e láctico, sendo os principais fatores atribuídos ao decréscimo do pH do produto e o acúmulo de ácidos orgânicos provenientes do desenvolvimento bacteriano durante a fermentação do leite (Saccaro et al., 2012; Sanders & Huis in't Veld, 1999). Além disso, Lahtinen et al. (2005) encontraram resultados que indicam que bactérias probióticas no produto fermentado podem ficar inativas durante um armazenamento prolongado.

#### **4. Meios de cultura seletivos e meios alternativos**

Ainda não existe qualquer técnica padrão para enumerar bactérias probióticas de forma seletiva. A enumeração diferencial de micro-organismos probióticos e culturas *starter* se torna difícil já que em um mesmo produto existe a presença de múltiplas espécies de bactérias ácido lácticas, que são geneticamente relacionadas e compartilham características bioquímicas e fenotípicas (Van de Castele et al., 2006). A diferenciação

entre as espécies ocorre usualmente pela morfologia apresentada pelas colônias; entretanto, essas características usualmente não são compartilhadas por diferentes cepas de uma mesma espécie, além de serem variáveis considerando as condições de cultura (Van de Castele et al., 2006).

Essas limitações impedem o desenvolvimento de um meio de cultura com seletividade suficiente para *Lb. casei* em alimentos fermentados, dificultando o desenvolvimento de um método oficial de enumeração. Vários pesquisadores propuseram meios de culturas seletivos para enumeração de *Lb. casei*, com resultados variáveis em seus desempenhos (Buriti & Saad, 2007; Champagne et al., 1997; Lima et al., 2009; Ong & Shah, 2009; Phillips et al., 2006; Ravula & Shah, 1998; Sakai et al., 2010; Sharp et al., 2008; Tharmaraj & Shah, 2003; Van de Castele et al., 2006; Vinderola & Reinheimer, 2000; Wang et al., 2010).

Os meios de cultura consistem da associação de substâncias que fornecem os nutrientes necessários ao cultivo de micro-organismos quando estes estiverem fora do seu ambiente natural, assim como fornecer o ambiente favorável ao seu desenvolvimento (pH, pressão osmótica, umidade, temperatura, atmosfera). Porém, para que este meio de cultura seja seletivo para enumeração e diferenciação de uma determinada espécie, é necessário que ele contenha agentes seletivos que sejam capazes de promover a multiplicação da espécie alvo e, ao mesmo tempo, inibir o desenvolvimento das demais que possam estar presentes.

Alguns estudos sugerem meios de cultura para enumeração diferencial de bactérias probióticas puras ou em combinação com culturas em produtos comerciais; porém, é frequente a observação de a enumeração de *Lb. casei* em culturas mistas apresentam maior dificuldade, pela falta de recuperação de uma ou mais espécies, ou pela dificuldade de diferenciação de colônias de diferentes espécies (Darukaradhyia et al., 2006; Karimi et al., 2012; Lahtinen et al., 2006; Talwalkar & Kailasapathy, 2004; Vinderola & Reinheimer, 2000). Além disso, contagem em placas requer longo tempo de incubação e possui dificuldades técnicas como aglutinação de colônias formadas e inibição por células vizinhas; assim, a escolha do meio de enumeração e as condições de incubação para espécies específicas ainda são um desafio e, para muitas espécies, o meio de cultura adequado ainda não é conhecido (Lahtinen et al., 2006).

Em 1993, Valdez & Giori (1993) tentaram substituir a glicose do ágar MRS pela melezitose a fim de promover a enumeração seletiva de *Lb. casei* de produtos fermentados adicionados de *Lb. acidophilus* e *S. thermophilus*. Com o mesmo objetivo, Nighswonger et al. (1996) substituíram a celobiose por glicose no ágar LBS. Entretanto,

a necessidade de preparo muito elaborado do meio de cultura e a potencial variabilidade dos padrões de assimilação de hidratos de carbono pelas cepas das espécies alvo são consideradas limitações dessas metodologias (Champagne et al., 1997). Champagne et al. (1997) verificaram a habilidade do *Lb. casei* em se multiplicar a 15 °C em meio de cultura HHD (McDonald et al., 1987) e ágar LBS acidificado, com inibição simultânea de *Lb. acidophilus*, *S. thermophilus* e *Lb. bulgaricus*: ambos os protocolos apresentaram seletividade para *Lb. casei*, porém, estes necessitam de 14 dias de incubação, o que torna inviável para as indústrias. O ágar LC foi desenvolvido por Ravula & Shah (1998) e possui como agente seletivo a ribose (1% m/v), que inibe a multiplicação de *S. thermophilus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. acidophilus* e bifidobactérias, podendo ser usado como seletivo para *Lb. casei*; a incubação também é realizada por 14 dias assim como proposto por Champagne et al. (1997), o que é inviável para as indústrias. Vinderola & Reinheimer (2000) propuseram os ágares LP-MRS e B-MRS; o primeiro possui cloreto de lítio e propionato de sódio como agentes seletivos e, o segundo, bile. Ambos são incubados a 37°C por 72h com a finalidade de inibir bifidobactérias e os dois foram capazes de inibir o crescimento de colônias de culturas *starter* (*S. thermophilus* e *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*). Além disso, foi possível diferenciar morfologicamente colônias de *Lb. casei* e *Lb. acidophilus* em ágar B-MRS e de *Lb. casei* e bifidobactérias em ágar LP-MRS. O ágar MRS-V proposto por Tharmaraj & Shah (2003) possui a vancomicina em sua composição, que associada a diferentes temperaturas permite a enumeração diferencial de *Lb. casei* e *Lb. paracasei*. Lima et al. (2009) avaliaram o desempenho de vários agentes seletivos para enumeração de *Lb. casei*, e obtiveram resultados adequados utilizando dicloxacilina, cloreto de lítio e cisteína, em aerobiose (Buriti & Saad, 2007; Buriti et al., 2005; Ong & Shah, 2009; Phillips et al., 2006; Sharp et al., 2008; Van de Castele et al., 2006; Wang et al., 2010).

Embora vários estudos sobre a seletividade de meios de cultura a diferentes culturas probióticas e *starter* sejam encontradas na literatura, nenhum dos meios de cultura descritos apresentou atividade adequada para diferenciação de outras culturas adicionadas no mesmo alimento. Além disso, muitos desses métodos são baseados em culturas puras dos micro-organismos probióticos, dificultando sua utilização quando há mais de uma cultura associada em um mesmo produto, tanto pela similaridade nos requerimentos para se multiplicarem quanto na sobreposição de características bioquímicas (Ashraf & Shah, 2011). Devido o fato de que ferramentas moleculares de diferenciação e quantificação de culturas probióticas em produtos comerciais serem recentemente desenvolvidas, a maioria dos fabricantes ainda depende dos métodos

convencionais para enumeração desses micro-organismos (Van de Castele et al., 2006).

O ágar MRTLV (ágar ramnose cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio LBS-vancomicina modificado) desenvolvido por Sakai et al. (2010) é o único descrito na literatura capaz de diferenciar estas espécies probióticas através de características morfológicas de suas colônias. Este meio possui em sua composição ramnose, cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) e vancomicina. Essa diferenciação ocorre pelos compostos L-ramnose e TTC: o primeiro não é fermentado por *Lb. casei* e o segundo é um sal incolor que quando reduzido forma um precipitado vermelho intenso. Com isso, ao fermentarem o açúcar e produzirem ácido láctico, ocorre inibição da redução do TTC tornando as colônias brancas ou vermelhas muito claras (como é o caso do *Lb. rhamnosus*). Porém, as bactérias que não utilizarem o açúcar e não produzirem ácido láctico ocorrerá redução do TTC, formando colônias vermelhas intensas e de fácil visualização e identificação (Sakai et al., 2010).

#### 4.1. Petrifilm™ Aerobic Count (3M Microbiology, St. Paul, MN, EUA)

As metodologias para análise de alimentos devem ser capazes de dar respostas rápidas para que seja possível tomar decisões no sentido de modificar o processo, prevenindo a produção de forma errada. Os métodos rápidos e alternativos possuem objetivos de melhorar e desenvolver testes de isolamento, detecção precoce, caracterização e enumeração de micro-organismos nos alimentos (Champagne et al., 1994). Os benefícios dos métodos rápidos passam pela simplificação da execução da análise com redução do trabalho laboratorial, redução no tempo de resposta e processamento de maior número de amostras em menor período de tempo (Champagne et al., 1994).

Como alternativa para enumeração de micro-organismos indicadores de higiene, o sistema Petrifilm™ possui uma grande vantagem em relação aos métodos convencionais: sua conveniência. Elas são prontas para uso, eliminando as etapas de preparação dos meios de cultura e vidrarias necessários, ocupam menos espaço em incubadoras, geladeiras, armários, autoclaves, têm descarte mais fácil, não quebram, não derramam, podem ser congeladas para contagem posterior ou reanálise (Fung, 2002).

Para as indústrias de alimentos, essas vantagens justificam a utilização desse sistema no controle de qualidade microbiológico de seus produtos. Nero et al. (2008) e Gonçalves et al. (2009) verificaram a aplicação desta metodologia alternativa para

enumeração de bactérias lácticas fermentadoras, associando as placas Petrifilm™ Aerobic Count (AC) meios de cultura específicos e agentes seletivos para esses micro-organismos. Estes sistemas possuem diferentes tipos de nutrientes, géis hidrossolúveis a frio, corantes e indicadores adequados à recuperação de cada tipo de micro-organismos pesquisados. A análise microbiológica fica reduzida a três etapas simples e rápidas, que fornecem resultados consistentes e de fácil leitura, reduzindo as chances de erros, comuns nos métodos convencionais de plaqueamento (Gonçalves et al., 2009; Nero et al., 2008; Nero et al., 2006; Ortolani et al., 2007).

O Petrifilm™ AC utiliza o TTC como indicador para permitir a visualização adequada das colônias formadas. O TTC é um sal incolor que, quando reduzido, forma um precipitado vermelho intenso, sendo amplamente utilizado para enumeração de colônias microbianas em meios de cultura sólidos (Beloti et al., 1999; Sakai et al., 2010). Quando o micro-organismo é capaz de reduzir o TTC, através de reação enzimática, formazanos são produzidos e mantidos no interior de grânulos nas células e as colônias formadas apresentam coloração vermelha intensa, se tornando de fácil visualização e identificação (Kenner et al., 1961; Mustakallio et al., 1955; Sakai et al., 2010). Além disso, esta coloração permite a diferenciação entre as colônias formadas e partículas de alimentos, que podem causar confusão com outros métodos de plaqueamento (Gonçalves et al., 2009; Nero et al., 2008; Nero et al., 2006; Ortolani et al., 2007).

A variação na redução deste composto por bactérias lácticas, ou mesmo a não redução pode ser um fator limitante para aplicação dessa metodologia para certos gêneros ou espécies (Beloti et al., 1999). Alguns fatores como pH, temperatura e luz podem interferir na redução deste composto, bem como a concentração do sal, pois altos níveis deste composto podem causar efeitos deletérios aos micro-organismos (Beloti et al., 1999; Senyk et al., 1987). Considerando essas características, e necessário encontrar uma concentração de TTC a ser utilizada em meio de cultura que seja mínima o suficiente para não inibir o desenvolvimento do micro-organismo e alta o suficiente para fazer com que o mesmo seja capaz de reduzir o composto (Hurwitz & McCarthy, 1986; Mustakallio et al., 1955). Bactérias ácido lácticas homo e heterofermentativas podem ser enumeradas pelo sistema Petrifilm™, utilizando-se placas Petrifilm™ AC semeadas com as amostras diluídas em caldo MRS e com incubação em anaerobiose (Nero et al., 2006).

## Referências

- Aguirre-Ezkauriatza, E.J., Aguilar-Yanez, J.M., Ramirez-Medrano, A., & Alvarez, M.M., 2010. Production of probiotic biomass (*Lactobacillus casei*) in goat milk whey: comparison of batch, continuous and fed-batch cultures. *Bioresource Technology* 101:2837-2844.
- Antunes, A.E.C., Graell, E.T., Moreno, I., Rodrigues, L.G., Dourado, F.M., Saccaro, D.M., & Lerayer, A.L.S., 2007. Selective enumeration and viability of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* in a new fermented milk product. *Brazilian Journal of Microbiology* 38:173-177.
- ANVISA, 2002. Resolução RDC nº2, de 07 de janeiro de 2002.
- Aryana, K.J. & McGrew, P., 2007. Quality attributes of yogurt with *Lactobacillus casei* and various prebiotics. *LWT - Food Science and Technology* 40:1808-1814.
- Ashraf, R. & Shah, N.P., 2011. Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium* spp. in yoghurt--a review. *International Journal of Food Microbiology* 149:194-208.
- Baken, K.A., Ezendam, J., Gremmer, E.R., de Klerk, A., Pennings, J.L., Matthee, B., Peijnenburg, A.A., & van Loveren, H., 2006. Evaluation of immunomodulation by *Lactobacillus casei* Shirota: immune function, autoimmunity and gene expression. *International Journal of Food Microbiology* 112:8-18.
- Barer, M.R., Smith, R.J., Cooney, R.P., & Kimmitt, P.T., 2000. Relationships between culturability, activity and virulence in pathogenic bacteria. *Journal of Infection and Chemotherapy* 6:108-111.
- Beloti, V., Barros, M.A.F., Freitas, J.C., Nero, L.A., Souza, J.A., Santana, E.H.W., & Franco, B.D.G.M., 1999. Frequency of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) non-reducing bacteria in pasteurized milk. *Revista de Microbiologia* 30:137-140.
- Bertazzoni Minelli, E., Benini, A., Marzotto, M., Sbarbati, A., Ruzzenente, O., Ferrario, R., Hendriks, H., & Dellaglio, F., 2004. Assessment of novel probiotic *Lactobacillus casei* strains for the production of functional dairy foods. *International Dairy Journal* 14:723-736.
- Bloomfield, S.F., Stewart, G.S., Dodd, C.E., Booth, I.R., & Power, E.G., 1998. The

- viable but non-culturable phenomenon explained? *Microbiology* 144 ( Pt 1):1-3.
- Buriti, F.C. & Saad, S.M., 2007. Bacteria of *Lactobacillus casei* group: characterization, viability as probiotic in food products and their importance for human health. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion* 57:373-380.
- Buriti, F.C.A., Rocha, J.S., Assis, E.G., & Saad, S.M.I., 2005. Probiotic potential of Minas fresh cheese prepared with the addition of *Lactobacillus paracasei*. *LWT - Food Science and Technology* 38:173-180.
- Buttriss, J., 1997. Nutritional properties of fermented milk products. *International Journal of Dairy Technology* 50:21-27.
- Champagne, C.P., Gardner, N., Piette, M., & St-Gelais, D., 1994. The use of Petrifilm™ for the enumeration of Lactococci. *International Dairy Journal* 4:789-795.
- Champagne, C.P., Roy, D., & Lafond, A., 1997. Selective enumeration of *Lactobacillus casei* in yoghurt-type fermented milks based on a 15°C incubation temperature. *Biotechnology Techniques* 11:567-569.
- Clancy, R., 2003. Immunobiotics and the probiotic evolution. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 38:9-12.
- Colwell, R.R., 2000. Viable but nonculturable bacteria: a survival strategy. *Journal of Infection and Chemotherapy* 6:121-125.
- Cotter, P.D., Hill, C., & Ross, R.P., 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology* 3:777-788.
- 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.
- 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.
- FAO, 2001. WHO Expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria, p. 1-4, Córdoba, Argentina.
- Fric, P., 2007. Probiotics and prebiotics — renaissance of a therapeutic principle. *Central European Journal of Medicine* 2:237-270.

- Fung, D.Y., 2002. Rapid methods and automation in microbiology. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 1:3-22.
- Galdeano, C.M. & Perdigon, G., 2006. The probiotic bacterium *Lactobacillus casei* induces activation of the gut mucosal immune system through innate immunity. *Clinical and Vaccine Immunology* 13:219-226.
- Gill, H.S., 2003. Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 17:755-773.
- Gismondo, M.R., Drago, L., & Lombardi, A., 1999. Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. *International Journal of Antimicrobial Agents* 12:287-292.
- 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.
- Hai, N.V., Buller, N., & Fotedar, R., 2009. Effects of probiotics (*Pseudomonas synxantha* and *Pseudomonas aeruginosa*) on the growth, survival and immune parameters of juvenile western king prawns (*Penaeus latisulcatus* Kishinouye, 1896). *Aquaculture Research* 40:590-602.
- Heasman, M. & Mellentin, J., 2001. *The functional foods revolution: healthy people, healthy profits?* Earthscan Publications Ltd, London and Sterling.
- Hlivak, P., Odraska, J., Ferencik, M., Ebringer, L., Jahnova, E., & Mikes, Z., 2005. One-year application of probiotic strain *Enterococcus faecium* M-74 decreases serum cholesterol levels. *Bratislava Medical Journal* 106:67-72.
- Holzappel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., & Schillinger, U., 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition* 73:365s-373s.
- Hsieh, M.L. & Chou, C.C., 2006. Mutagenicity and antimutagenic effect of soymilk fermented with lactic acid bacteria and bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology* 111:43-47.
- Hurwitz, S.J. & McCarthy, T.J., 1986. 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride as a novel tool in germicide dynamics. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 75:912-916.
- Isolauri, E., 2004. Probiotics—Immunomodulatory Potential Against Allergic Disease. *Journal of Food Science* 69:M135-M137.

- Isolauri, E., Arvola, T., Sutas, Y., Moilanen, E., & Salminen, S., 2000. Probiotics in the management of atopic eczema. *Clinical & Experimental Allergy* 30:1604-1610.
- Jones, J.L. & Foxx-Orenstein, A.E., 2007. The role of probiotics in inflammatory bowel disease. *Digestive Diseases and Sciences* 52:607-611.
- Karimi, R., Mortazavian, A.M., & Amiri-Rigi, A., 2012. Selective enumeration of probiotic microorganisms in cheese. *Food Microbiology* 29:1-9.
- Kell, D.B., Kaprelyants, A.S., Weichart, D.H., Harwood, C.R., & Barer, M.R., 1998. Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73:169-187.
- Kenner, B.A., Clark, H.F., & Kabler, P.W., 1961. Fecal Streptococci. I. Cultivation and enumeration of Streptococci in surface waters. *Journal of Applied Microbiology* 9:15-20.
- Lahtinen, S.J., Gueimonde, M., Ouwehand, A.C., Reinikainen, J.P., & Salminen, S.J., 2005. Probiotic bacteria may become dormant during storage. *Applied and Environmental Microbiology* 71:1662-1663.
- Lahtinen, S.J., Gueimonde, M., Ouwehand, A.C., Reinikainen, J.P., & Salminen, S.J., 2006. Comparison of four methods to enumerate probiotic bifidobacteria in a fermented food product. *Food Microbiology* 23:571-577.
- Le Leu, R.K., Brown, I.L., Hu, Y., Bird, A.R., Jackson, M., Esterman, A., & Young, G.P., 2005. A synbiotic combination of resistant starch and *Bifidobacterium lactis* facilitates apoptotic deletion of carcinogen-damaged cells in rat colon. *Journal of Nutrition* 135:996-1001.
- LeBlanc, A.M., Matar, C., LeBlanc, N., & Perdigon, G., 2005. Effects of milk fermented by *Lactobacillus helveticus* R389 on a murine breast cancer model. *Breast Cancer Research* 7:R477-R486.
- Lee, Y.-K. & Salminen, S., 1995. The coming of age of probiotics. *Trends in Food Science & Technology* 6:241-245.
- Leroy, F. & De Vuyst, L., 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology* 15:67-78.
- Li, J., Tan, B., Mai, K., Ai, Q., Zhang, W., Liufu, Z., & Xu, W., 2008. Immune responses and resistance against *Vibrio parahaemolyticus* induced by probiotic bacterium *Arthrobacter* XE-7 in Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*.

- Journal of the World Aquaculture Society* 39:477-489.
- Lima, K.G.C., Kruger, M.F., Behrens, J., Destro, M.T., Landgraf, M., & Franco, B.D.G.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.
- Maragkoudakis, P.A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B., & Tsakalidou, E., 2006. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal* 16:189-199.
- Marzotto, M., Maffeis, C., Paternoster, T., Ferrario, R., Rizzotti, L., Pellegrino, M., Dellaglio, F., & Torriani, S., 2006. *Lactobacillus paracasei* A survives gastrointestinal passage and affects the fecal microbiota of healthy infants. *Research in Microbiology* 157:857-866.
- Matsuzaki, T., 1998. Immunomodulation by treatment with *Lactobacillus casei* strain *Shirota*. *International Journal of Food Microbiology* 41:133-140.
- McDonald, L.C., McFeeters, R.F., Daeschel, M.A., & Fleming, H.P., 1987. A differential medium for the enumeration of homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 53:1382-1384.
- Mustakallio, K.K., Aho, E.O., & Autio, E.O., 1955. Tetrazolium-reduction test for milk. *Science* 122:971-972.
- Myllyluoma, E., Veijola, L., Ahlroos, T., Tynkkynen, S., Kankuri, E., Vapaatalo, H., Rautelin, H., & Korpela, R., 2005. Probiotic supplementation improves tolerance to *Helicobacter pylori* eradication therapy - a placebo-controlled, double-blind randomized pilot study. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 21:1263-1272.
- Nanno, M., Kato, I., Kobayashi, T., & Shida, K., 2011. Biological effects of probiotics: what impact does *Lactobacillus casei* *Shirota* have on us? *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 24:45S-50S.
- Nero, L.A., Andrade Rodrigues, L., 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 & Automation in Microbiology* 16:132-139.
- Nero, L.A., Beloti, V., Aguiar Ferreira Barros, M., 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 & Automation in Microbiology* 14:249-257.
- Nighswonger, B.D., Brashears, M.M., & Gilliland, S.E., 1996. Viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in fermented milk products during refrigerated storage. *Journal of Dairy Science* 79:212-219.
- Nystrom, T., 2001. Not quite dead enough: on bacterial life, culturability, senescence, and death. *Archives of Microbiology* 176:159-164.
- Ohashi, Y. & Ushida, K., 2009. Health-beneficial effects of probiotics: Its mode of action. *Animal Science Journal* 80:361-371.
- Ong, L. & Shah, N.P., 2009. Probiotic cheddar cheese: influence of ripening temperatures on proteolysis and sensory characteristics of cheddar cheeses. *Journal of Food Science* 74:S182-191.
- 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.
- Paineau, D., Carcano, D., Leyer, G., Darquy, S., Alyanakian, M.A., Simoneau, G., Bergmann, J.F., Brassart, D., Bornet, F., & Ouwehand, A.C., 2008. Effects of seven potential probiotic strains on specific immune responses in healthy adults: a double-blind, randomized, controlled trial. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 53:107-113.
- Phillips, M., Kailasapathy, K., & Tran, L., 2006. Viability of commercial probiotic cultures (*L. acidophilus*, *Bifidobacterium* sp., *L. casei*, *L. paracasei* and *L. rhamnosus*) in cheddar cheese. *International Journal of Food Microbiology* 108:276-280.
- Prescott, S.L., Wickens, K., Westcott, L., Jung, W., Currie, H., Black, P.N., Stanley, T.V., Mitchell, E.A., Fitzharris, P., Siebers, R., Wu, L., & Crane, J., 2008. Supplementation with *Lactobacillus rhamnosus* or *Bifidobacterium lactis* probiotics

- in pregnancy increases cord blood interferon-gamma and breast milk transforming growth factor-beta and immunoglobulin A detection. *Clinical & Experimental Allergy* 38:1606-1614.
- Ranadheera, R., Baines, S., & Adams, M., 2010. Importance of food in probiotic efficacy. *Food Research International* 43:1-7.
- Rautava, S., 2007. Potential uses of probiotics in the neonate, p. 45-53, *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*. Elsevier.
- Ravula, R.R. & Shah, N.P., 1998. Selective enumeration of *Lactobacillus casei* from yogurts and fermented milk drinks. *Biotechnology Techniques* 12:819-822.
- Rowland, I., 1999. Probiotics and benefits to human health--the evidence in favour. *Environmental Microbiology* 1:375-376.
- Ryan, K.A., O'Hara, A.M., van Pijkeren, J.-P., Douillard, F.P., & O'Toole, P.W., 2009. *Lactobacillus salivarius* modulates cytokine induction and virulence factor gene expression in *Helicobacter pylori*. *Journal of Medical Microbiology* 58:996-1005.
- Saccaro, D.M., Hirota, C.Y., Tamime, A.Y., & de Oliveira, M.N., 2012. Evaluation of different selective media for enumeration of probiotic micro-organisms in combination with yogurt starter cultures in fermented milk. *African Journal of Microbiology Research* 5:3901-3906.
- 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.
- Salminen, S., von Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., de Vos, W.M., Fondén, R., Saxelin, M., Collins, K., & Mogensen, G., 1998. Demonstration of safety of probiotics—a review. *International Journal of Food Microbiology* 44:93-106.
- Sanders, M.E., 1998. Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. *International Dairy Journal* 8:341-347.
- Sanders, M.E. & Huis in't Veld, J., 1999. Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labeling issues. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76:293-315.
- Senyk, G.F., Kozlowski, S.M., Noar, P.S., Shipe, W.F., & Bandler, D.K., 1987. Comparison of dry culture medium and conventional plating techniques for

- enumeration of bacteria in pasteurized fluid milk. *Journal of Dairy Science* 70:1152-1158.
- Servin, A.L., 2004. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews* 28:405-440.
- Shah, N.P., 2000. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Science* 83:894-907.
- Shah, N.P., 2007. Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal* 17:1262-1277.
- Shah, N.P., Lankaputhra, W.E., Britz, M.L., & Kyle, W.S., 1995. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial yoghurt during refrigerated storage. *International Dairy Journal* 5:515-521.
- Sharp, M.D., McMahon, D.J., & Broadbent, J.R., 2008. Comparative evaluation of yogurt and low-fat cheddar cheese as delivery media for probiotic *Lactobacillus casei*. *Journal of Food Science* 73:M375-377.
- Shieh, M.-J., Shang, H.-f., Liao, F.-H., Zhu, J.-S., & Chien, Y.-W., 2011. *Lactobacillus fermentum* improved intestinal bacteria flora by reducing *Clostridium perfringens*. *e-SPEN, the European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism* 6:e59-e63.
- Talwalkar, A. & Kailasapathy, K., 2004. Comparison of selective and differential media for the accurate enumeration of strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus casei* complex from commercial yoghurts. *International Dairy Journal* 14:143-149.
- Tharmaraj, N. & Shah, N.P., 2003. Selective enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, bifidobacteria, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and propionibacteria. *Journal of Dairy Science* 86:2288-2296.
- Valdez, G.d. & Giori, G.d., 1993. Effectiveness of soy milk as food carrier for *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Food Protection* 56.
- Van de Castele, S., Vanheuverzwijn, T., Ruysen, T., Van Assche, P., Swings, J., & Huys, G., 2006. Evaluation of culture media for selective enumeration of probiotic strains of lactobacilli and bifidobacteria in combination with yoghurt or cheese starters. *International Dairy Journal* 16:1470-1476.
- Van Niel, C.W., Feudtner, C., Garrison, M.M., & Christakis, D.A., 2002. *Lactobacillus*

- therapy for acute infectious diarrhea in children: a meta-analysis. *Pediatrics* 109:678-684.
- Vandenplas, Y., Salvatore, S., Viera, M., Devreker, T., & Hauser, B., 2007. Probiotics in infectious diarrhoea in children: are they indicated? *European Journal of Pediatrics* 166:1211-1218.
- Vinderola, C. & Reinheimer, J., 2000. Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. *International Dairy Journal* 10:271-275.
- Wang, H.K., Dong, C., Chen, Y.F., Cui, L.M., & Zhang, H.P., 2010. A new probiotic cheddar cheese with high ACE-inhibitory activity and  $\gamma$ -Aminobutyric acid content produced with koumiss-derived *Lactobacillus casei* Zhang. *Food Technology and Biotechnology* 48:62-70.
- WGO, 2009. World Gastroenterology Organisation practice guidelines: Probiotics and prebiotics. *Arab Journal of Gastroenterology* 10:33-42.
- Wickens, K., Black, P.N., Stanley, T.V., Mitchell, E., Fitzharris, P., Tannock, G.W., Purdie, G., & Crane, J., 2008. A differential effect of 2 probiotics in the prevention of eczema and atopy: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 122:788-794.
- Wolowski, 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.
- Yamamoto, H., 2000. Viable but nonculturable state as a general phenomenon of non-spore-forming bacteria, and its modeling. *Journal of Infection and Chemotherapy* 6:112-114.

## OBJETIVOS

### 1. Objetivo geral

Desenvolver um meio de cultura seletivo para enumeração de *Lb. casei* em leites fermentados, associado ao sistema Petrifilm™ AC.

### 2. Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a seletividade de diferentes substâncias (ácido nalidíxico, bile, cloreto de lítio, propionato de sódio, metronidazol e vancomicina) sobre culturas *starter* utilizadas na produção de leites fermentados, visando identificar compostos com capacidade seletiva para *Lb casei*;
- ✓ Verificar o potencial inibitório do TTC sobre culturas *starter* utilizadas pela indústria de alimentos, visando a identificação do efeito inibitório sobre *Lb. casei*;
- ✓ Propor um meio de cultura seletivo para *Lb. casei* e avaliar o seu desempenho por metodologia convencional e associado a placas Petrifilm™ AC para enumeração desse micro-organismo em leites fermentados

**ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO.** Development of an alternative culture medium for selective enumeration of *Lactobacillus casei* in fermented milks

Artigo a ser submetido ao *Food Microbiology*

Title Page

Development of an alternative culture medium for the selective enumeration of  
*Lactobacillus casei* in fermented milk

Running title: enumeration of *Lb. casei*

Monique Colombo<sup>1</sup>, Aline Evelyn Zimmermann de Oliveira<sup>1</sup>, Antonio Fernandes de  
Carvalho<sup>2</sup>, Luís Augusto Nero<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Campus UFV, 36570  
000, Viçosa, MG, Brazil

<sup>2</sup> Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Campus  
UFV, 36570 000, Viçosa, MG, Brazil

\* Corresponding author. L. A. Nero, nero@ufv.br, tel. + 55 31 3899 1463, fax: + 55 31  
3899 1457

## ABSTRACT

Monitoring the populations of probiotic organisms such as *Lactobacillus casei* in food is required by food industries in order to assure that a minimum concentration of these organisms will be ingested by consumers. In this context, Petrifilm™ AC plates can be used along with selective culture media to allow the enumeration of specific groups of lactic acid bacteria. The present study aimed to assess chemical substances as selective agents for *Lb. casei* in order to propose a selective culture medium to be used with Petrifilm™ AC plates as an alternative protocol for the enumeration of this probiotic organism in fermented milk. Twenty-six probiotic and starter cultures (including 6 strains of *Lb. casei*) were plated on de Man Rogosa and Sharpe (MRS) agar with distinct concentrations of nalidixic acid, bile, lithium chloride, metronidazole, sodium propionate, and vancomycin. Vancomycin at 10 mg/L demonstrated selective activity for *Lb. casei*. In addition, 2,3,5-triphenyltetrazolium chlorine was identified as a compound that did not inhibit *Lb. casei*, and Petrifilm™ AC plates used with MRS and vancomycin at 10 mg/L (MRS-V) demonstrated more colonies of this organism when incubated under anaerobic conditions than aerobic conditions. Acidophilus milk and yoghurt were prepared, added to *Lb. casei* strains, and stored at 4 °C. *Lb. casei* populations were monitored using MRS-V and MRTLV by conventional plating and associated with Petrifilm™ AC plates. All correlation indices between counts obtained by conventional plating and Petrifilm™ AC were significant ( $p < 0.05$ ), but the best performance was observed for growth on MRS-V. The obtained data indicate the efficiency of using MRS-V associated with Petrifilm™ AC plates for the enumeration of *Lb. casei* strains in fermented milk.

Keywords: selective culture medium, *Lactobacillus casei*, fermented milk, Petrifilm™ AC.

## 1. Introduction

Probiotics are microorganisms that promote benefits when ingested at adequate concentrations (Aryana & McGrew, 2007; Ashraf & Shah, 2011; Bertazzoni Minelli et al., 2004; Buriti & Saad, 2007; Fric, 2007; Lima et al., 2009; Nanno et al., 2011; WGO, 2009). Once probiotics are added to foods, monitoring of the populations of these organisms is essential. These probiotic microorganisms demonstrate their activities only when present at minimum concentrations in fermented foods. The suggested minimum daily therapeutic dose of probiotics is  $10^6$  to  $10^7$  colony forming units (CFU) (Ashraf & Shah, 2011; Buriti et al., 2005; Lee & Salminen, 1995; Vinderola & Reinheimer, 2000). Some studies have shown low viability of probiotics present in foods for retail sale, demonstrating a requirement for proper monitoring to verify the viability and concentrations of these organisms (Shah, 2000; Shah et al., 1995). There are no official protocols to enumerate probiotic cultures in foods other than the ISO 29981:2010 protocol for bifidobacteria (ISO, 2010). There is no adequate protocol for the selective enumeration of *Lactobacillus casei*, despite this organism being the most studied probiotic.

The close genetic relationship between *Lb. casei* and other starter cultures hinders the development of an adequate selective culture medium. Distinct studies have been performed in order to propose an alternative culture medium for the probiotic *Lb. casei* (Buriti & Saad, 2007; Buriti et al., 2005; Champagne et al., 1997; Dave & Shah, 1996; Lima et al., 2009; Ong & Shah, 2009; Phillips et al., 2006; Ravula & Shah, 1998; Sakai et al., 2010; Sharp et al., 2008; Tharmaraj & Shah, 2003; Van de Castele et al., 2006; Vinderola & Reinheimer, 2000; Wang et al., 2010). However, the majority of these culture media have been evaluated with isolated cultures, jeopardising their

performance in the selective enumeration of *Lb. casei* in mixed cultures of the type usually found in fermented products (Ashraf & Shah, 2011).

Alternative protocols to enumerate microorganisms are required by the food industry to facilitate and optimise laboratory work and also to provide reliable results. Petrifilm™ plates (3M Microbiology, St. Paul., MN, USA) is a ready-to-use double film system that is often used in the food industry for monitoring contamination by mesophilic aerobes, coliforms, *Escherichia coli*, and a variety of other microbial groups. Some studies have demonstrated the applicability of Petrifilm™ Aerobic Count (AC) plates along with specific culture media or selective agents to enumerate starter cultures and probiotic bacteria (Champagne et al., 1994; Miranda et al., 2011; Nero et al., 2008; Nero et al., 2006; Ortolani et al., 2007). A key point for the performance of such selection protocols is the sensitivity of the target culture to 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC), a dye that is added to Petrifilm™ plates to enhance colony visualisation (Beloti et al., 1999; Nero et al., 2008; Nero et al., 2006).

The present study aimed to identify the inhibitory potential of selective agents with regard to distinct starter and probiotic cultures as well as the sensitivity of these cultures to distinct concentrations of TTC in order to propose a selective culture medium to be used with to Petrifilm™ AC plates for the enumeration of *Lb. casei* in fermented milk.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Bacterial strains

The bacterial strains examined in the present study are detailed in Table 1. All strains were stored at -20 °C in MRS broth supplemented with 20% glycerol (v/v). For use, aliquots of these cultures were reactivated in de Man, Rogosa and Sharpe (MRS)

broth (Oxoid, Basingstoke, England), incubated at 37 °C for 24 h, streaked on MRS agar (Oxoid), and incubated at 37 °C for 48 h. Then, isolated colonies were transferred to MRS broth (Oxoid) and incubated at 37 °C until they achieved a turbidity similar to tube 1 on the MacFarland scale, which corresponds to approximately  $3 \times 10^8$  CFU/mL. Thereafter, ten-fold dilutions were made in NaCl 0.85% (w/v) to obtain cultures with distinct concentrations that were used in the experiments described below.

## 2.2. Evaluation of chemicals for the selective enumeration of starter cultures

Table 2 shows the selective agents considered in the present study and their tested concentrations. The substances were prepared as aqueous solutions and filtered through sterile membranes with a 0.22  $\mu\text{m}$  pore size. The tested strains (Table 1) were diluted to an approximate concentration of  $10^2$  CFU/mL and plated on pour plates in duplicate in MRS agar (Oxoid) with individual chemical substances added at defined concentrations (Table 2). As control, each set of tested cultures was also plated on MRS agar without any of the chemical substances. Plates were incubated at 37 °C for 48 h, following which the colonies were enumerated. The results are expressed as CFU/mL. All strains and chemical substances were evaluated in three independent trials.

## 2.3. Evaluation of the inhibitory potential of TTC on starter cultures

Tested strains (Table 1) were diluted until an approximate concentration of  $10^2$  CFU/mL and plated on pour plates in duplicates in MRS agar (Oxoid) with TTC added at three distinct concentrations (15, 30, and 45 mg/mL) or without TTC (control). The plates were incubated at 37 °C for 48 h and then the colonies were when enumerated and the results expressed as CFU/mL. The morphological characteristics of the colonies from each tested strain were also evaluated. This analysis was conducted in three independent trials.

#### 2.4. Evaluation of the incubation condition for starter culture growth

*Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. rhamnosus*, *S. thermophilus*, *Lb. acidophilus* and *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains (Table 1) were individually diluted in MRS broth (Oxoid) supplemented with vancomycin (10 mg/L) (MRS-V), MRS broth (Oxoid) alone and modified-rhamnose-2,3,5-triphenyltetrazolium-chloride-LBS-vancomycin broth (MRTLTV, prepared according Sakai et al., 2010) and plated in duplicate on Petrifilm™ AC plates. One replicate set was incubated aerobically at 37 °C for 48 h, and the other was incubated under anaerobic conditions (GasPak™ EZ Anaerobe Sachets, BD - Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) at 37 °C for 48 h. After incubation, colonies were enumerated and the results were expressed as CFU/mL. The morphological characteristics of the colonies were also recorded.

#### 2.5. Production of probiotic fermented milks and evaluation of MRS-V and MRTLTV broths with Petrifilm™ AC for *Lb. casei* enumeration

Based on the data obtained in this study, *Lb. acidophilus* LA-5 (Chr. Hansen, Hørsholm, Denmark) was selected for the production of acidophilus milk, and cultures of *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* from YoMix (DuPont®/Danisco®, Madison, WI, USA) were selected for the production of yoghurt. *Lb. casei* strains (Table 1) were inoculated into both products to obtain probiotic fermented milks.

For acidophilus milk production, six sets of 1,000 mL of skim milk were prepared by reconstituting skim milk powder (Molico®, Nestlé, São Paulo, SP, Brazil) in sterile water at 10% (w/v), heating at 90 °C for 5 min, and cooling to 37 °C. Next, a *Lb. acidophilus* LA-5 (Chr. Hansen) culture was added to obtain a final concentration of 10<sup>6</sup> CFU/mL; simultaneously, a culture of one of the *Lb. casei* strains was also added to obtain a final concentration of 10<sup>6</sup> CFU/mL. The inoculated milk sets were then incubated at 37 °C for 24 h, following which the pH and viscosity were recorded to

verify that production was complete (pH of 4.6 and coagulation). The obtained fermented milks were distributed into sterile plastic flasks (100 mL) and incubated at 4 °C.

For yoghurt production, six sets of 1,000 mL of skim milk were prepared as previously described. YoMix starter culture (DuPont®/Danisco®) was added according to the manufacturer's instructions, and the inoculated sets were incubated at 42 °C for 4.5 h. Then, the fermented products were cooled to 37 °C and cultures of *Lb. casei* strains were individually inoculated to obtain a final concentration of 10<sup>6</sup> CFU/g. The inoculated sets were incubated at 37 °C for 24 h, at which time the pH and viscosity were recorded to verify that production was complete (pH of 4.6 and coagulation). The obtained fermented milks were distributed into sterile plastic flasks (100 mL) and incubated at 4 °C.

Samples of the prepared fermented milks were collected during storage at the following times: 0 h (just after the preparation of fermented milks), 15 days and 30 days. Each sample was ten-fold diluted using MRS-V and MRTLV broths. Selected dilutions of MRS-V were plated on Petrifilm™ AC (3M) plates and MRS-V agar (in duplicates in pour plates); the same selected dilutions of MRTLV broth were plated on Petrifilm™ AC (3M) plates and MRTLV agar (in duplicate in pour plates). Petrifilm™ AC plates were incubated at 37 °C under anaerobic conditions (GasPak, BD), and MRS-V and MRTLV agar plates were incubated at 37 °C under aerobic conditions based on the previously obtained data. After incubation, the colonies were enumerated and the results were expressed as CFU/g.

Fermented milk production and microbiological analyses were conducted in three independent trials.

## 2.6. Statistical analysis

To verify the inhibitory potential of the tested chemical substances and TTC, the counts of each analysed strain were converted to  $\log_{10}$  and grouped according to their microbial species (groups: *Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. rhamnosus*, “other *lactobacilli*”, streptococci) and compared using analysis of variance (ANOVA) and Tukey tests ( $p < 0.05$ ) in reference to the counts obtained on control plates (MRS without any chemical substance). The differences between the counts of the tested organisms incubated under anaerobic and aerobic conditions were determined by comparing the obtained mean values. The counts of *Lb. casei* in fermented milks that grew in each culture medium and with each protocol were compared by ANOVA and Tukey tests ( $p < 0.05$ ) to verify significant differences. Comparisons were also performed by linear regression ( $p < 0.05$ ) to establish correlation indices between the proposed protocols.

## 3. Results and Discussion

### 3.2. Evaluation of chemical substances for selective enumeration of starter cultures

Figure 1 shows the mean counts of the microbial groups plated on MRS agar with the tested substances at different concentrations, except for the additional test for vancomycin.

Based on the obtained data, none of the tested chemical substances were able to properly inhibit any of the tested strains ( $p > 0.05$ ) (Figure 1). The performance of the selective agents at the tested concentrations did not show standard behaviour and the inhibition profile was similar between the groups. From the obtained results, it can be concluded that the tested substances at their respective concentrations can be used for enumeration of *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Lb. rhamnosus* strains and show similar inhibition profiles among treatments. However, the group “other *lactobacilli*” and group

*S. thermophilus* organisms were also able to grow without any sign of inhibition (Figure 1).

Lithium chloride and sodium propionate had no selective effect to distinguish *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Lb. rhamnosus* strains. In addition, sodium propionate enhanced the growth of *S. thermophilus* strains when tested at the highest concentration ( $p < 0.0001$ ) (Figure 1B). Vinderola & Reinheimer (2000) showed that the combination of lithium chloride and sodium propionate (LP-MRS) allowed the enumeration of *Lb. casei* in the presence of bifidobacteria and was able to inhibit the growth of lactic acid starter bacteria (Vinderola & Reinheimer, 2000). Lima et al. (2009) proposed the use of the same culture medium at 42 °C under aerobic conditions to enumerate *Lb. casei* in a mixed culture. However, these substances were considered in the present study in isolation and they were not able to inhibit the growth of other starter cultures (Figure 1A, 1B).

Vinderola & Reinheimer (2000) also tested the behavior of the same strains when inoculated in a culture medium containing bile (B-MRS) and found that this substance allowed the growth of *Lb. casei* and inhibited some starter cultures (*S. thermophilus* and *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*). Furthermore, this culture medium allowed the differentiation of *Lb. casei* and *Lb. acidophilus* colonies. However, the data in this study indicated that bile, like lithium chloride and sodium propionate, was not a selective agent at the tested concentrations (Figure 1C). Divergent results for *Lb. casei* counts obtained using this culture media with the addition of bile, lithium chloride and sodium propionate were also observed by Tharmaraj & Shah (2003).

Nalidixic acid and vancomycin concentrations were defined based on the data obtained by Tharmaraj & Shah (2003), and metronidazole concentrations were based on data from Sakai et al. (2010). Tharmaraj & Shah (2003) observed that *Lb. casei* was able to grow in a culture medium containing nalidixic acid when the incubation

temperature was lower than 37 °C. Moreover, this culture medium was able to inhibit *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *S. thermophilus*, *Lb. acidophilus*, *Bifidobacterium* and *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* strains. The obtained data (Figure 1D) indicated that MRS with nalidixic acid was not able to inhibit lactic acid bacteria. Only two of three *S. thermophilus* strains were partially inhibited by this medium; *S. thermophilus* TH-4® was inhibited at the highest concentration ( $p = 0.033$ ) and *S. thermophilus* ST 066 was inhibited at the lowest concentration ( $p = 0.045$ ). Moreover, nalidixic acid inhibited the growth of four *Lb. casei* strains, showing that this substance cannot be considered to be a selective agent for *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Lb. rhamnosus*. Similar results were obtained by Talwalkar & Kailasapathy (2004).

Metronidazole and vancomycin were not selective to allow the enumeration of *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Lb. rhamnosus* (Figure 1E, 1F). Metronidazole showed a similar behavior to sodium propionate for the growth of *S. thermophilus*: this substance enhanced the growth of some organisms of group “other *lactobacilli*” when compared to the controls ( $p = 0.001$ ). Tharmaraj & Shah (2003) showed that MRS added to vancomycin and incubated at anaerobic conditions at 37 °C for 72 h was able to select *Lb. casei*, but only when *Lb. rhamnosus* was not present in the mixture. These data can be compared with the results obtained in the present study as *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Lb. rhamnosus* were able to grow and form visible colonies at the same tested concentrations (Figure 1F) and under aerobic incubation conditions.

Sakai et al. (2010) verified that the presence of metronidazole and vancomycin in MRTLV did not inhibit the growth of *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Lb. rhamnosus* strains. However, *Lb. fermentum*, *Lb. plantarum*, *Lb. reuteri* and *Lb. sakei* strains were able to grow in this selective media. The MRS-V medium proposed by Tharmaraj & Shah (2003) and used at different temperatures allowed differentiation between *Lb. casei* and *Lb. rhamnosus*. In these experiments, only some strains were properly

inhibited by the highest tested vancomycin concentration: *Lb. paracasei* ATCC 335, *Lb. acidophilus* LA-5®, and *Lb. acidophilus* 74-2. Based on these specific data and the data from Sakai et al. (2010), an additional test using vancomycin at a higher concentration (10 mg/L) was conducted, and the obtained results are presented in Figure 2.

Figure 2 demonstrates that even at 10 mg/mL, vancomycin was not able to inhibit the growth of *Lb. casei*, *Lb. paracasei* or *Lb. rhamnosus* and that this compound led to a slight inhibition of “other *lactobacilli*” group ( $p > 0.05$ ). However, vancomycin at 10 mg/L was able to inhibit the growth of *S. thermophilus* ( $p < 0.05$ ). Table 3 demonstrates the inhibitory effect of vancomycin at 10 mg/L for each strain. Based on these data, *Lb. acidophilus* LA-5®, *Lb. acidophilus* 74-2, *Lb. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* CCT 3744, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 4797, *Lb. helveticus* ATCC 12046 and *Lb. leishmanii* ATCC 7830 were inhibited properly ( $p < 0.05$ ). Saccaro et al. (2012) tested the same concentration of vancomycin to lead to selective enumeration of *Lb. rhamnosus* in the presence of starter cultures (*Lb. delbrueckii* and *S. thermophilus*) at 37 °C for 72 h under anaerobic conditions.

### 3.2. Evaluation of the inhibitory potential of TTC on starter cultures

Considering the potential use of Petrifilm™ AC (3M) plates combined with selective culture media to enumerate starter cultures, we needed to assess the sensitivity of the target starter cultures to TTC, a dye that is added to this system to allow proper colony visualisation. However, TTC can inhibit the growth of some specific bacterial strains, specifically lactic acid bacteria (Beloti et al., 1999; Nero et al., 2008). Figure 3 demonstrates the mean counts of the microbial groups tested in the present study after plating them on MRS agar with TTC added at distinct concentrations.

*Lb. casei* was inhibited when plated on MRS with to 45 mg/L of TTC added. Sakai et al. (2010) described the ability of *Lb. casei* to grow after plating on culture

media containing TTC at 30 mg/L, although this organism formed small, brownish-red colonies as observed in the present study. *Lb. paracasei* and *Lb. rhamnosus* were not inhibited by TTC at the tested concentrations; however, the morphological appearance of these colonies varied by strain: some strains reduced the dye and formed red colonies and some strains did not reduce the dye and formed white colonies. Strain *Lb. paracasei* ATCC 335 was completely inhibited by all treatments. The strains grouped as “other *lactobacilli*” were not inhibited by the tested TTC concentrations. However, as observed for *Lb. paracasei* and *Lb. rhamnosus*, some strains were not able to reduce the dye and formed red colonies or slightly pink colonies as previously described by Nero et al. (2006). Among these strains, *Lb. plantarum*, *Lb. helveticus* and *Lb. acidophilus* did not reduce TTC, and *Lb. delbrueckii*, *Lb. leishmanii* and *Lb. fermentum* partially reduced TTC, forming pink colonies. *S. thermophilus* strains were also inhibited by TTC at 30 and 45 mg/L (Figure 3).

Based on these data, methodologies and protocols that employ TTC as dye to optimise the visualisation of *Lb. casei* colonies can be considered as adequate as a selective medium, as concentrations higher than 30 mg/L of this dye presented inhibitory activity against the tested strains. With regard to the use of Petrifilm™ AC plates to enumerate starter cultures, adding this system to a selective culture medium would be reliable for *Lb. casei* enumeration (Beloti et al., 1999; Champagne et al., 1994; Miranda et al., 2011; Nero et al., 2008; Nero et al., 2006).

### 3.3. Evaluation of incubation conditions for starter culture growth

Table 4 presents the counts obtained for selected starter cultures plated on Petrifilm™ AC plates in addition to MRS broth, MRS-V broth and MRTLV broth after incubation under aerobic and anaerobic conditions. This test was performed to identify

the best incubation protocol for Petrifilm™ AC plates that would allow the enumeration of reliable counts of the tested starter strains.

Considering the obtained counts using MRS, a culture medium without any selective agent, we can observe that the microbial counts obtained under anaerobic incubation were higher when compared to the aerobic incubation. The same behaviour was observed when selective agents were added to MRS (in MRS-V and MRTLV) and also the inhibitory effects previously observed for these substances were again observed.

Based on the obtained data, Petrifilm™ AC plates associated with MRS-V or MRTLV were incubated at anaerobic conditions for *Lb. casei* enumeration as performed in previous studies with other starter cultures (Beloti et al., 1999; Champagne et al., 1994; Miranda et al., 2011; Nero et al., 2008; Nero et al., 2006).

#### 3.4. Production of probiotic fermented milk and evaluation of MRS-V and MRTLV broths in association with Petrifilm™ AC for *Lb. casei* enumeration

Table 5 presents the mean counts obtained using the individual culture media and protocols evaluated in the present study to determine their selectivity for *Lb. casei* as observed in the previous results. We observed that the obtained counts on MRS-V, either in conventional plating or associated with Petrifilm™ AC plates, were higher when compared to the counts obtained on MRTLV. These differences were significant only for yoghurt ( $p < 0.05$ ). The obtained results indicate that both selective culture media can be associated with Petrifilm™ AC plates to enumerate *Lb. casei* in mixed cultures found in yoghurt and acidified milk, as observed in similar studies with other probiotic and starter cultures (Beloti et al., 1999; Champagne et al., 1994; Miranda et al., 2011; Nero et al., 2008; Nero et al., 2006).

The performance of the tested culture media and protocols were also evaluated by linear regression in order to establish correlation indices between them. Figure 4 demonstrates the obtained counts, comparing only the data obtained by conventional plating and Petrifilm™ AC. Based on the obtained data (Figure 4), all correlation indices were significant ( $p < 0.01$ ). MRS-V had better correlation indices between the counts obtained by conventional plating and those associated with Petrifilm™ AC (Figure 4A, 4C) compared to MRTLV (Figure 4B, 4D). The observed differences in counts on MRTLV obtained by conventional plating and Petrifilm™ AC (Table 5) can explain the poor correlations observed when using this culture medium in association with Petrifilm™ AC plates.

Nero et al. (2006) assessed the performance of Petrifilm™ AC plates and MRS broth, comparing this system with MRS agar for the enumeration of distinct starter cultures usually employed for fermented milk production. Despite the absence of significant differences between the counts obtained by the individual protocols, *Lb. casei* CRL 706 strain formed small colonies on Petrifilm™ AC plates, hindering proper visualisation and recording. In contrast, *Lb. casei* strains considered in the present study did not present such limitations when inoculated with MRS-V or MRTLV broth along with Petrifilm™ AC. In such systems, the colonies had a dark red colour, enhancing their visualisation and facilitating their recording. Based on these data and the observations of Nero et al. (2006), it can be concluded that the behaviour of the Petrifilm™ AC system along with a selective culture media when using *Lb. casei* is strain dependent.

Nero et al. (2008) described good performance of Petrifilm™ AC when used with MRS broth in enumerating *Lb. casei*, but focused on fermented milks produced with single strains. The data obtained in the present study demonstrate the reliability of using

MRS broth with vancomycin added to enumerate probiotic *Lb. casei* strains in fermented milks produced with mixed cultures.

Some studies have shown low viability of probiotic cultures found in fermented milk available for retail sale, demonstrating the need for proper methodologies for monitoring these cultures (Barer et al., 2000; Bloomfield et al., 1998; Colwell, 2000; Kell et al., 1998; Nystrom, 2001; Shah, 2000; Shah et al., 1995; Yamamoto, 2000). The absence of a standard protocol for this purpose makes adequate control in the food industries difficult (Van de Castele et al., 2006). Thus, Petrifilm™ plates may represent a valuable alternative quality control tool to be employed by the food industry. A number of studies have assessed the viability of combining Petrifilm™ AC plates with selective culture media to adequately enumerate target starter cultures composed of lactic acid bacteria and probiotic bacteria (Beloti et al., 1999; Champagne et al., 1994; Miranda et al., 2011; Nero et al., 2008; Nero et al., 2006). Based on the obtained data, populations of probiotic *Lb. casei* can be included as target cultures that can be monitored in fermented milks produced by mixed cultures by adding vancomycin to MRS broth and using Petrifilm™ AC.

#### 4. Conclusion

*Lb. casei* can be selectively enumerated on specially formulated MRS-V medium from fermented milk produced with *Lb. acidophilus* and *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *S. thermophilus*. The versatility and convenience of Petrifilm™ AC plates for the selective enumeration of *Lb. casei* using anaerobic incubation was demonstrated in this study. This makes these plates particularly useful for enumerating *Lb. casei* strains in foods along with a selective culture medium.

## Acknowledgments

The authors would like to thank CNPq, CAPES, and FAPEMIG.

## References

- Aryana, K.J. & McGrew, P., 2007. Quality attributes of yogurt with *Lactobacillus casei* and various prebiotics. *LWT - Food Science and Technology* 40:1808-1814.
- Ashraf, R. & Shah, N.P., 2011. Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium* spp. in yogurt--a review. *International Journal of Food Microbiology* 149:194-208.
- Barer, M.R., Smith, R.J., Cooney, R.P., & Kimmitt, P.T., 2000. Relationships between culturability, activity and virulence in pathogenic bacteria. *Journal of Infection and Chemotherapy* 6:108-111.
- Beloti, V., Barros, M.A.F., Freitas, J.C., Nero, L.A., Souza, J.A., Santana, E.H.W., & Franco, B.D.G.M., 1999. Frequency of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) non-reducing bacteria in pasteurized milk. *Revista de Microbiologia* 30:137-140.
- Bertazzoni Minelli, E., Benini, A., Marzotto, M., Sbarbati, A., Ruzzenente, O., Ferrario, R., Hendriks, H., & Dellaglio, F., 2004. Assessment of novel probiotic *Lactobacillus casei* strains for the production of functional dairy foods. *International Dairy Journal* 14:723-736.
- Bloomfield, S.F., Stewart, G.S., Dodd, C.E., Booth, I.R., & Power, E.G., 1998. The viable but non-culturable phenomenon explained? *Microbiology* 144 ( Pt 1):1-3.
- Buriti, F.C. & Saad, S.M., 2007. Bacteria of *Lactobacillus casei* group: characterization, viability as probiotic in food products and their importance for human health. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion* 57:373-380.
- Buriti, F.C.A., Rocha, J.S., Assis, E.G., & Saad, S.M.I., 2005. Probiotic potential of Minas fresh cheese prepared with the addition of *Lactobacillus paracasei*. *LWT - Food Science and Technology* 38:173-180.
- Champagne, C.P., Gardner, N., Piette, M., & St-Gelais, D., 1994. The use of Petrifilm™ for the enumeration of Lactococci. *International Dairy Journal* 4:789-795.

- Champagne, C.P., Roy, D., & Lafond, A., 1997. Selective enumeration of *Lactobacillus casei* in yoghurt-type fermented milks based on a 15°C incubation temperature. *Biotechnology Techniques* 11:567-569.
- Colwell, R.R., 2000. Viable but nonculturable bacteria: a survival strategy. *Journal of Infection and Chemotherapy* 6:121-125.
- 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.
- Fric, P., 2007. Probiotics and prebiotics — renaissance of a therapeutic principle. *Central European Journal of Medicine* 2:237-270.
- ISO, 2010. Milk products — enumeration of presumptive bifidobacteria — colony count technique at 37 °C. International Organization for Standardization.
- Kell, D.B., Kaprelyants, A.S., Weichart, D.H., Harwood, C.R., & Barer, M.R., 1998. Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73:169-187.
- Lee, Y.-K. & Salminen, S., 1995. The coming of age of probiotics. *Trends in Food Science & Technology* 6:241-245.
- Lima, K.G.C., Kruger, M.F., Behrens, J., Destro, M.T., Landgraf, M., & Franco, B.D.G.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.
- Nanno, M., Kato, I., Kobayashi, T., & Shida, K., 2011. Biological effects of probiotics: what impact does *Lactobacillus casei* Shirota have on us? *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 24:45S-50S.
- Nero, L.A., Andrade Rodrigues, L., 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 & Automation in Microbiology*

16:132-139.

- Nero, L.A., Beloti, V., Aguiar Ferreira Barros, M., 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 & Automation in Microbiology* 14:249-257.
- Nystrom, T., 2001. Not quite dead enough: on bacterial life, culturability, senescence, and death. *Archives of Microbiology* 176:159-164.
- Ong, L. & Shah, N.P., 2009. Probiotic cheddar cheese: influence of ripening temperatures on proteolysis and sensory characteristics of cheddar cheeses. *Journal of Food Science* 74:S182-191.
- 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.
- Phillips, M., Kailasapathy, K., & Tran, L., 2006. Viability of commercial probiotic cultures (*L. acidophilus*, *Bifidobacterium* sp., *L. casei*, *L. paracasei* and *L. rhamnosus*) in cheddar cheese. *International Journal of Food Microbiology* 108:276-280.
- Ravula, R.R. & Shah, N.P., 1998. Selective enumeration of *Lactobacillus casei* from yogurts and fermented milk drinks. *Biotechnology Techniques* 12:819-822.
- Saccaro, D.M., Hirota, C.Y., Tamime, A.Y., & de Oliveira, M.N., 2012. Evaluation of different selective media for enumeration of probiotic micro-organisms in combination with yogurt starter cultures in fermented milk. *African Journal of Microbiology Research* 5:3901-3906.
- 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.
- Shah, N.P., 2000. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Science* 83:894-907.
- Shah, N.P., Lankaputhra, W.E., Britz, M.L., & Kyle, W.S., 1995. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial yoghurt

- during refrigerated storage. *International Dairy Journal* 5:515-521.
- Sharp, M.D., McMahon, D.J., & Broadbent, J.R., 2008. Comparative evaluation of yogurt and low-fat cheddar cheese as delivery media for probiotic *Lactobacillus casei*. *Journal of Food Science* 73:M375-377.
- Talwalkar, A. & Kailasapathy, K., 2004. Comparison of selective and differential media for the accurate enumeration of strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus casei* complex from commercial yoghurts. *International Dairy Journal* 14:143-149.
- Tharmaraj, N. & Shah, N.P., 2003. Selective enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, bifidobacteria, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and propionibacteria. *Journal of Dairy Science* 86:2288-2296.
- Van de Castele, S., Vanheuverzwijn, T., Ruysen, T., Van Assche, P., Swings, J., & Huys, G., 2006. Evaluation of culture media for selective enumeration of probiotic strains of lactobacilli and bifidobacteria in combination with yoghurt or cheese starters. *International Dairy Journal* 16:1470-1476.
- Vinderola, C. & Reinheimer, J., 2000. Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. *International Dairy Journal* 10:271-275.
- Wang, H.K., Dong, C., Chen, Y.F., Cui, L.M., & Zhang, H.P., 2010. A new probiotic cheddar cheese with high ACE-inhibitory activity and  $\gamma$ -Aminobutyric acid content produced with koumiss-derived *Lactobacillus casei* Zhang. *Food Technology and Biotechnology* 48:62-70.
- WGO, 2009. World Gastroenterology Organisation practice guidelines: Probiotics and prebiotics. *Arab Journal of Gastroenterology* 10:33-42.
- Yamamoto, H., 2000. Viable but nonculturable state as a general phenomenon of non-spore-forming bacteria, and its modeling. *Journal of Infection and Chemotherapy* 6:112-114.

## Tables

Table 1. Starter cultures strains considered in the present study.

Species	Identification	Origin
<i>Lb. casei</i>	CIRM-BIA 667 <sup>T</sup> CNRZ 313 <sup>T</sup>	INRA
<i>Lb. casei</i>	CIRM-BIA 767 CNRZ 1244	INRA
<i>Lb. casei</i>	CIRM-BIA 769 CNRZ 1874	INRA
<i>Lb. casei</i>	CIRM-BIA 771 CNRZ 1393	INRA
<i>Lb. casei</i> subsp. <i>casei</i>	CCT 1465 ATCC 393	CCT/FAT
<i>Lb. casei</i> subsp. <i>alactosus</i>	CCT 1376 NCDO 2713	CCT/FAT
<i>Lb. rhamnosus</i>	ATCC 7469	FIOCRUZ
<i>Lb. rhamnosus</i>	ATCC 9595	FIOCRUZ
<i>Lb. rhamnosus</i>	CCT 0842	CCT /FAT
<i>Lb. rhamnosus</i>	CCT 5835	CCT /FAT
<i>Lb. paracasei</i>	CCT 0566 ATCC 10746	CCT /FAT
<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	ATCC 335	ATCC
<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	CCT 7501	CCT /FAT
<i>Lb. acidophilus</i>	LA-5®   Probio-Tec®	Chr. Hansen
<i>Lb. acidophilus</i>	74-2	DuPont/Danisco
<i>Lb. fermentum</i>	ATCC 23271	FIOCRUZ
<i>Lb. fermentum</i>	ATCC 9338	FIOCRUZ
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	CCT 3744	DuPont/Danisco
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	ATCC 4797	FIOCRUZ
<i>Lb. helveticus</i>	ATCC 12046	FIOCRUZ
<i>Lb. leishmannii</i>	ATCC 7830	FIOCRUZ
<i>Lb. plantarum</i>	ATCC 8014	FIOCRUZ
<i>Lb. plantarum</i>	ATCC 10012	FIOCRUZ
<i>S. thermophilus</i>	Lyofast ST 066	Clerici-Sacco
<i>S. thermophilus</i>	TH-4®   Probio-Tec®	Chr. Hansen
<i>S. thermophilus</i>	Yo-Mix™ Yogurt Cultures	DuPont/Danisco

INRA: Institut National de la Recherche Agronomique, Versailles, France

ATCC: American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA

CCT/FAT: Coleção de Culturas Tropical – Fundação André Tosello, Campinas, SP, Brazil.

CIRM-BIA: Microbial Biological Resource Centre, Chaoyang District, Beijing, China

CNRZ: Centre National de Recherche Zootechnique, Sotuba, Bamako, Mali

DuPont® Danisco®, Madison, WI, USA

Clerici-Sacco, Cadorago, Italy.

Chr. Hansen, Hørsholm, Denmark

Table 2. Selective and/or differential substances used in the present study, with their respective concentrations evaluated.

Substance	Concentration*	Reference
Nalidixic acid <sup>a</sup>	10, 15, 20 (mg/L)	Tharmaraj and Shah (2003)
Bile <sup>a</sup>	1.0, 1.5, 2.0 (mg/L)	Vinderola and Reinheimer (2000)
Lithium chloride <sup>b</sup>	1, 2, 3 (g/L)	Vinderola and Reinheimer (2000)
Metronidazole <sup>a</sup>	7.5, 10, 12.5 (mg/L)	Sakai et al. (2010)
Sodium propionate <sup>a</sup>	2, 3, 4 (g/L)	Vinderola and Reinheimer (2000)
Vancomycin <sup>a</sup>	0.5, 1.0, 1.5 (mg/L)	Tharmaraj and Shah (2003)
Vancomycin <sup>a</sup>	10 (mg/L)	Sakai et al. (2010)

\* final concentration in the prepared culture medium.

<sup>a</sup>Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), <sup>b</sup>Synth (Diadema, SP, Brazil).

Table 3. Mean values for enumeration of the strains belonging to “other *lactobacilli*” and “*S. thermophilus*” groups after inoculation in MRS agar and MRS agar added to vancomycin at 10 mg/L.

Species	Strain	Vancomycin		ANOVA
		Control	[10 mg/L]	
<i>Lb. acidophilus</i>	La-5	1.91 ± 0.09	NG	-
	SAB	2.29 ± 0.13	NG	-
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	CCT 3744	2.45 ± 0.11 <sup>a</sup>	NG	-
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	ATCC 4797	1.82 ± 0.06	NG	-
<i>Lb. fermentum</i>	ATCC 23271	2.09 ± 0.22 <sup>a</sup>	1.74 ± 0.05 <sup>b</sup>	F <sub>(1,6)</sub> = 9.648; p = 0.021
	ATCC 9228	2.74 ± 0.17 <sup>a</sup>	2.68 ± 0.11 <sup>a</sup>	F <sub>(1,6)</sub> = 0.319; p = 0.593
<i>Lb. helveticus</i>	ATCC 12046	1.63 ± 0.06	NG	-
<i>Lb. leishmanii</i>	ATCC 7830	3.06 ± 0.20	NG	-
<i>Lb. plantarum</i>	ATCC 10012	1.91 ± 0.03 <sup>a</sup>	1.85 ± 0.05 <sup>a</sup>	F <sub>(1,6)</sub> = 3.578; p = 0.107
	ATCC 8014	2.52 ± 0.08 <sup>a</sup>	2.51 ± 0.13 <sup>a</sup>	F <sub>(1,6)</sub> = 0.029; p = 0.871
<i>S. thermophilus</i>	SAB	1.73 ± 0.06	NG	-
	ST066	2.32 ± 0.28	NG	-
	YoMix	3.05 ± 0.12 <sup>a</sup>	1.37 ± 0.13 <sup>b</sup>	F <sub>(1,6)</sub> = 367.610; p < 0.0001

NG: no growth

Table 4. Counts of starter cultures strains obtained in Petrifilm™ AC plates added to MRS, MRS-V, and MRTLV broths, after incubation at 37 °C for 48 h, under aerobiosis and anaerobiosis conditions (GasPak™ EZ Anaerobe Sachets, BD).

Species	MRS		MRS-V		MRTLTV	
	Aerobiosis	Anaerobiosis	Aerobiosis	Anaerobiosis	Aerobiosis	Anaerobiosis
<i>Lb. casei</i>	1.53	1.65	1.48	2.00	1.64	2.02
<i>Lb. paracasei</i>	1.23	1.99	0.90	1.62	0.60	1.93
<i>Lb. rhamnosus</i>	2.33	1.95	2.16	2.07	2.10	2.37
<i>Lb. acidophilus</i>	-	2.31	-	-	-	-
<i>Lb. delbrueckii</i>	-	1.92	-	-	-	-
<i>S. thermophilus</i>	0.90	2.15	-	-	-	-

Table 5. Mean values ( $\pm$  standard deviation) of scores obtained for *Lb. casei* in acidophilus milk and yogurt in conventional methodology and alternative system Petrifilm™ AC with MRS-V and MRTLV.

Culture media	Plating	Yoghurt	Acidified milk
MRS-V	Conventional	4.63 $\pm$ 0.39 <sup>a</sup>	4.38 $\pm$ 0.86
	Petrifilm™ AC	4.64 $\pm$ 0.45 <sup>a</sup>	4.34 $\pm$ 0.79
MRTLTV	Conventional	4.18 $\pm$ 0.80 <sup>b</sup>	4.17 $\pm$ 0.64
	Petrifilm™ AC	4.39 $\pm$ 0.83 <sup>a,b</sup>	4.51 $\pm$ 0.63
ANOVA		F <sub>(3,212)</sub> =6.29, p=0.000	F <sub>(3,209)</sub> =1.89, p=0.133

## Figures

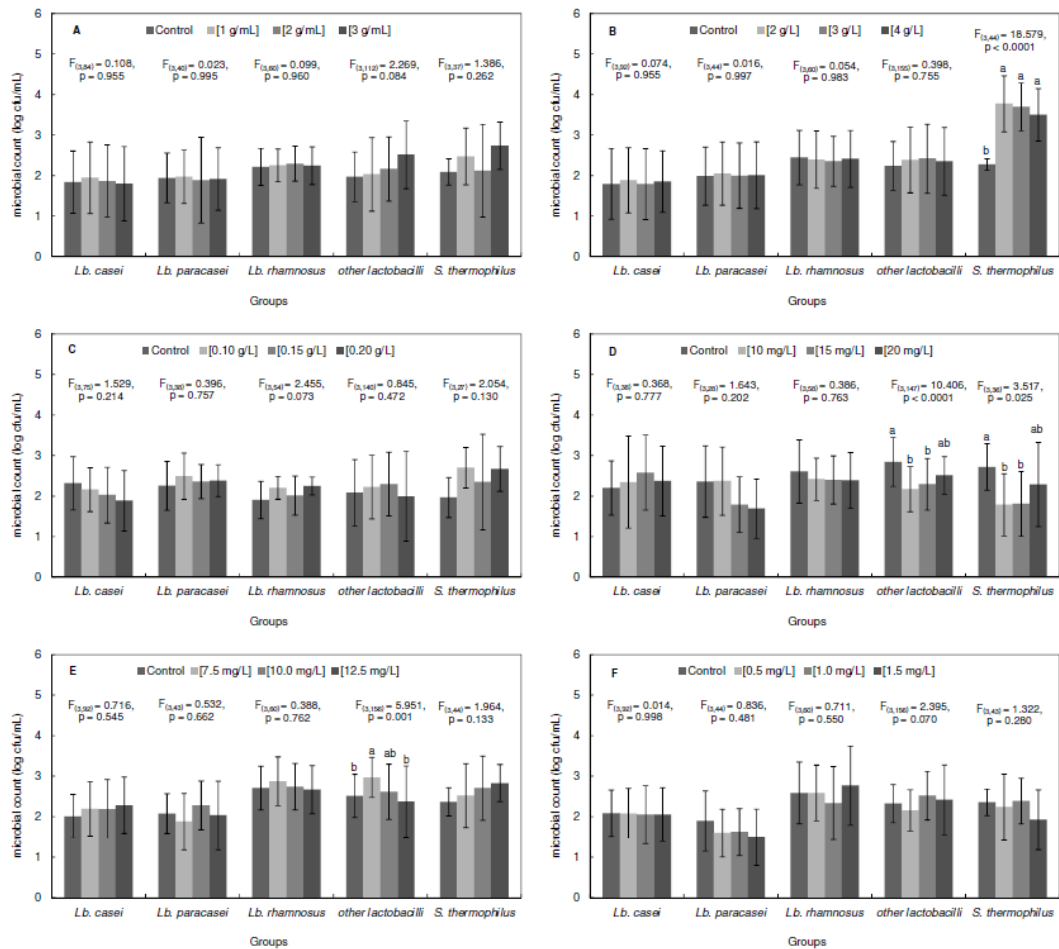


Figure 1. Mean values of microbial counts obtained from distinct starter cultures strains plated on de Man Rogosa and Sharpe agar (Oxoid) added to distinct chemical substances at distinct concentrations: (A) lithium chloride; (B) sodium propionate; (C) bile; (D) nalidixic acid; (E) metronidazole; (F) vancomycin. In each graph, mean counts with distinct small case letters are significantly different by ANOVA and Tukey test ( $p < 0.05$ ).

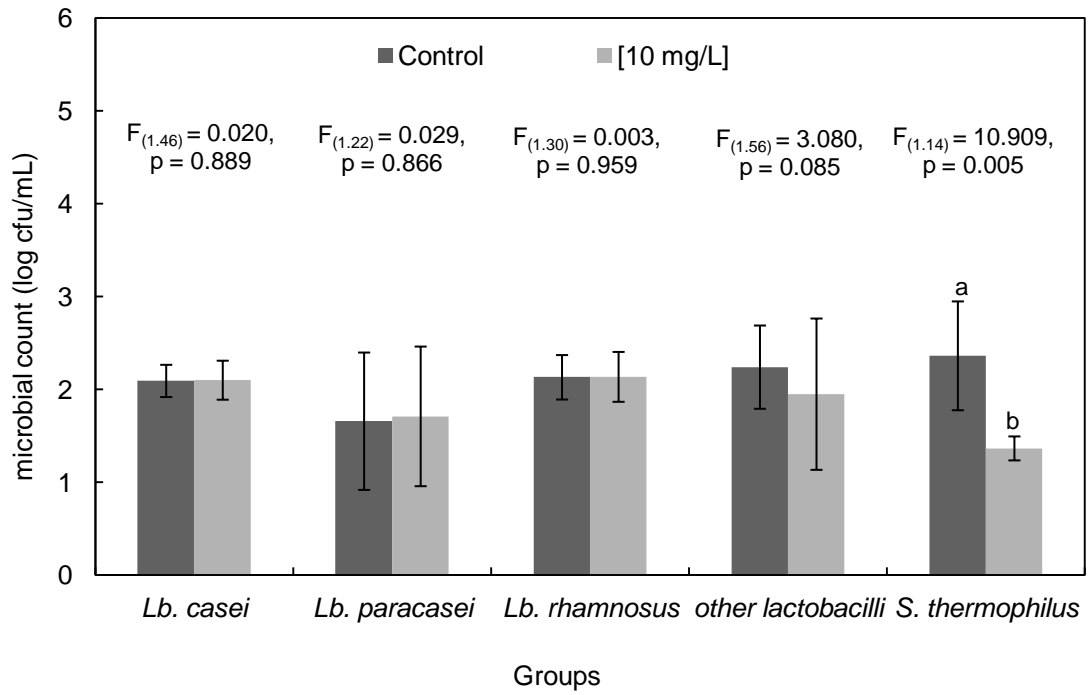


Figure 2. Mean counts of microbial groups plated on MRS agar added with vancomycin at 10 mg/L, and MRS agar. Mean counts with distinct small case letters are significantly different by ANOVA and Tukey test ( $p < 0.05$ ).

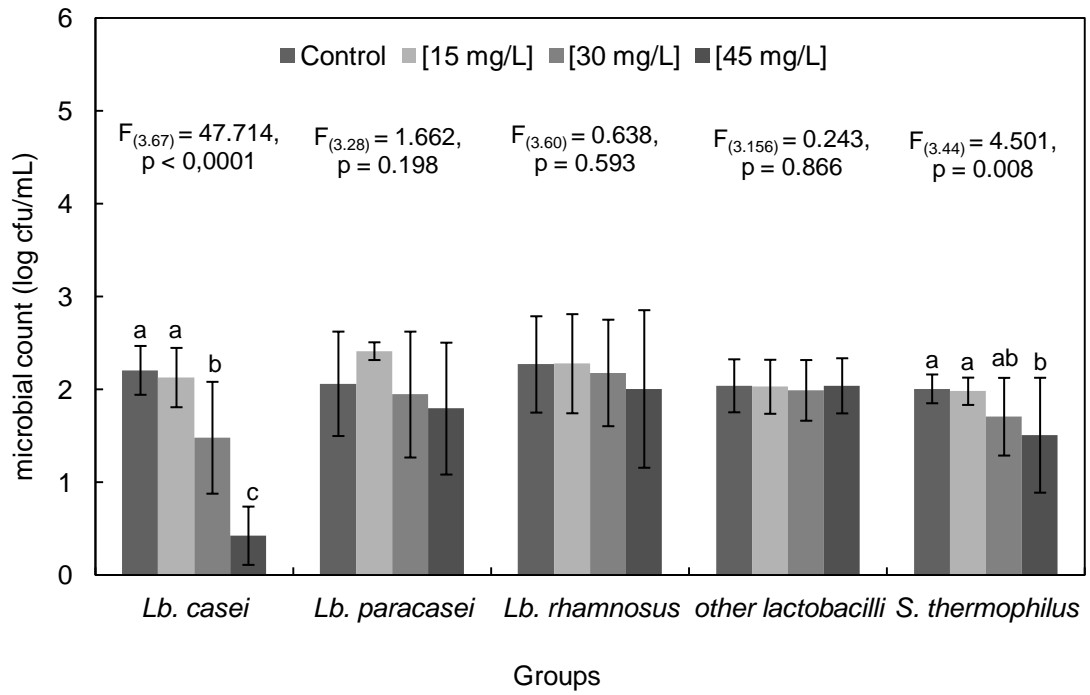


Figure 3. Mean counts of microbial groups plated on MRS agar added with distinct concentrations of TTC. Mean counts with distinct small case letters are significantly different by ANOVA and Tukey test ( $p < 0.05$ ).

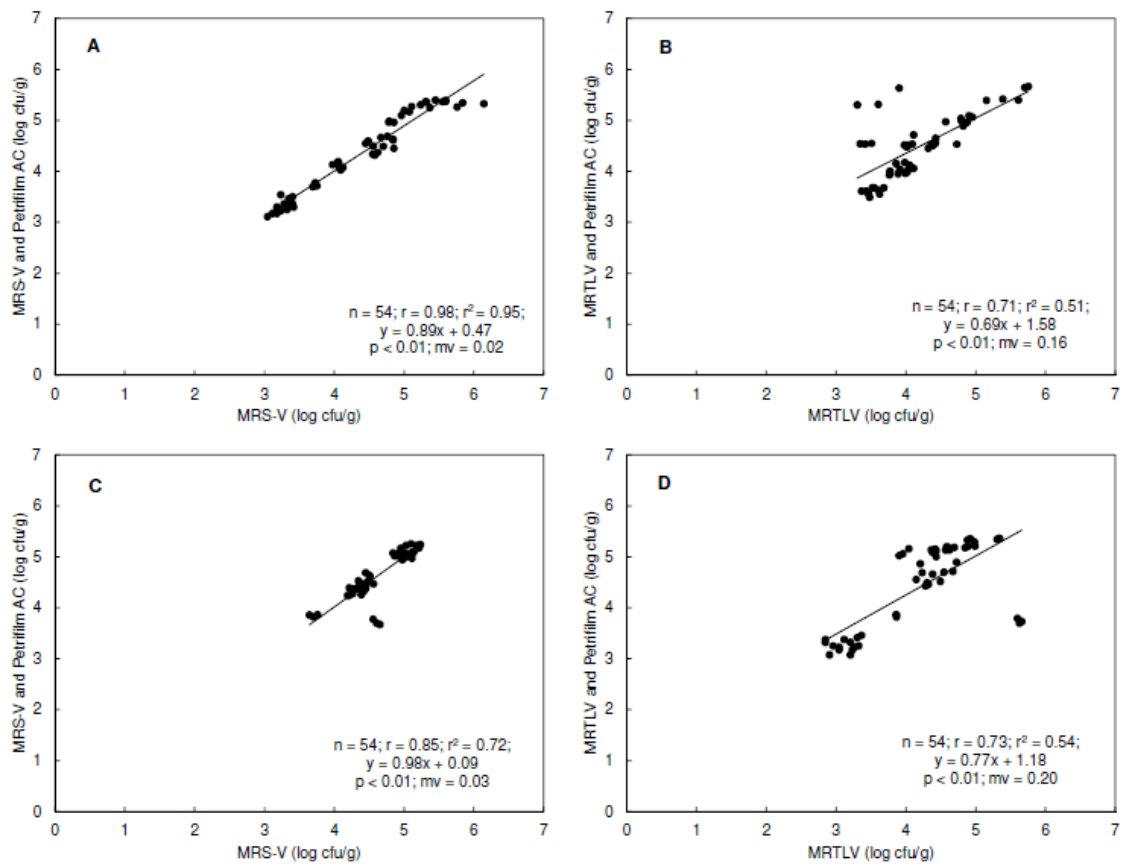


Figure 4. Relationship between counts of *Lb. casei* in acidophilus milk (A and B) and yogurt (C and D) obtained by conventional methodology and alternative system Petrifilm™ AC with MRS-V and MRTLV.

## CONCLUSÕES

- ✓ As substâncias químicas avaliadas não apresentaram atividade seletiva adequada para *Lb. casei*, *Lb. paracasei* e *Lb. rhamnosus* nas concentrações inicialmente avaliadas. Apenas vancomicina, quando adicionada na concentração de 10 mg/L apresentou potencial seletivo para essas espécies;
- ✓ De maneira geral, TTC não apresentou atividade inibitória sobre *Lb. casei*, *Lb. paracasei* e *Lb. rhamnosus*. Entretanto, apenas *Lb. casei* apresentou um comportamento padronizado em MRS adicionado de TTC, sendo que todas as cepas avaliadas conseguiram reduzir adequadamente o composto formando colônias vermelhas e visíveis;
- ✓ Quando semeadas em Petrifilm™ AC associadas a meios de cultura seletivos (MRTLTV e MRS-V), as culturas avaliadas apresentaram melhor crescimento quando incubadas em anaerobiose, com formação de maiores números de colônias, e com características morfológicas mais definidas (colônias vermelhas, facilmente visualizadas);
- ✓ As metodologias utilizadas para monitoramento das populações de *Lb. casei* adicionadas em leites fermentados (leite acidófilo e iogurte) apresentaram desempenho adequado, sendo que o meio de cultura MRS-V apresentou melhores contagens, quando comparado aos resultados obtidos por MRTLTV;
- ✓ Nos leites fermentados preparados, as contagens de *Lb. casei* obtidas por plaqueamento convencional e Petrifilm™ AC, utilizando-se MRS-V e MRTLTV, apresentaram bons e significativos índices de correlação. Entretanto, a avaliação de outros parâmetros de correlação indicou um melhor desempenho do MRS-V;
- ✓ As placas Petrifilm™ AC representam uma alternativa a indústria de alimentos para monitoramento de culturas starter e probióticos, e pode ser associada ao caldo MRS adicionado de vancomicina, na concentração de 10 mg/L, com incubação em anaerobiose, para enumeração seletiva de *Lb. casei* em leites fermentados.

## **ANEXOS**

Resultados detalhados obtidos no estudo.

Tabela 1. Comparações individuais, por cepa bacteriana testada, das contagens obtidos em ágar MRS adicionado de cloreto de lítio em diferentes concentrações. Valores com letras minúsculas diferentes são estatisticamente diferentes por ANOVA ( $p < 0.05$ ).

Isolado	Espécie	Controle	1 g/L	2 g/L	3 g/L	ANOVA
667	<i>Lb. casei</i> CIRM-BIA 667 <sup>T</sup> CNRZ 313 <sup>T</sup>	2,11 ± 1,00 <sup>a</sup>	2,04 ± 1,11 <sup>a</sup>	1,85 ± 1,28 <sup>a</sup>	1,55 ± 1,41 <sup>a</sup>	F <sub>(3,11)</sub> = 0,148; p = 0,929
767	<i>Lb. casei</i> CIRM-BIA 767 CNRZ 1244	1,38 ± 0,57 <sup>a</sup>	1,51 ± 0,56 <sup>a</sup>	1,26 ± 0,79 <sup>a</sup>	0,67 ± 0,58 <sup>a</sup>	F <sub>(3,11)</sub> = 1,111; p = 0,386
769	<i>Lb. casei</i> CIRM-BIA 769 CNRZ 1874	2,06 ± 1,10 <sup>a</sup>	1,97 ± 1,28 <sup>a</sup>	1,97 ± 1,25 <sup>a</sup>	2,84 ± 0,49 <sup>a</sup>	F <sub>(3,10)</sub> = 0,304; p = 0,822
771	<i>Lb. casei</i> CIRM-BIA 771 CNRZ 1393	1,82 ± 0,87 <sup>a</sup>	1,98 ± 0,92 <sup>a</sup>	1,84 ± 0,92 <sup>a</sup>	2,32 ± 0,06 <sup>a</sup>	F <sub>(3,10)</sub> = 0,178; p = 0,909
1465	<i>Lb. casei</i> subsp. <i>casei</i> CCT 1465 ATCC 393	1,94 ± 0,75 <sup>a</sup>	2,42 ± 1,13 <sup>a</sup>	2,00 ± 0,81 <sup>a</sup>	2,41 ± 0,10 <sup>a</sup>	F <sub>(3,10)</sub> = 0,313; p = 0,816
1376	<i>Lb. casei</i> subsp. <i>alactosus</i> CCT 1376 NCDO 2713	1,71 ± 0,39 <sup>a</sup>	1,75 ± 0,23 <sup>a</sup>	2,24 ± 0,29 <sup>a</sup>	1,74 ± 0,25 <sup>a</sup>	F <sub>(3,12)</sub> = 2,955; p = 0,075
566	<i>Lb. paracasei</i> CCT 0566 ATCC 10746	1,72 ± 0,66 <sup>a</sup>	1,78 ± 0,62 <sup>a</sup>	1,80 ± 0,69 <sup>a</sup>	1,69 ± 0,58 <sup>a</sup>	F <sub>(3,12)</sub> = 0,025; p = 0,994
7501	<i>Lb. paracasei</i> CCT 7501	2,57 ± 0,32 <sup>a</sup>	2,63 ± 0,51 <sup>a</sup>	2,77 ± 0,39 <sup>a</sup>	2,62 ± 0,33 <sup>a</sup>	F <sub>(3,12)</sub> = 0,186; p = 0,904
335	<i>Lb. paracasei</i> ATCC 335	1,54 ± 0,18 <sup>a</sup>	1,50 ± 0,12 <sup>a</sup>	0,30 ± 0,00 <sup>c</sup>	0,95 ± 0,00 <sup>b</sup>	F <sub>(3,8)</sub> = 47,506; p < 0,0001
6	<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 7469	2,06 ± 0,43 <sup>a</sup>	2,03 ± 0,37 <sup>a</sup>	2,09 ± 0,49 <sup>a</sup>	1,90 ± 0,26 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 0,185; p = 0,904
95	<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 9595	2,12 ± 0,10 <sup>a</sup>	2,12 ± 0,25 <sup>a</sup>	2,24 ± 0,12 <sup>a</sup>	2,19 ± 0,37 <sup>a</sup>	F <sub>(3,12)</sub> = 0,232; p = 0,872
842	<i>Lb. rhamnosus</i> CCT 0842	2,00 ± 0,61 <sup>a</sup>	2,11 ± 0,38 <sup>a</sup>	2,08 ± 0,44 <sup>a</sup>	2,08 ± 0,50 <sup>a</sup>	F <sub>(3,12)</sub> = 0,036; p = 0,990
5835	<i>Lb. rhamnosus</i> CCT 5835	2,65 ± 0,33 <sup>a</sup>	2,74 ± 0,21 <sup>a</sup>	2,76 ± 0,27 <sup>a</sup>	2,79 ± 0,20 <sup>a</sup>	F <sub>(3,12)</sub> = 0,206; p = 0,890
12	<i>Lb. plantarum</i> ATCC 10012	2,10 ± 0,14 <sup>a</sup>	2,29 ± 0,19 <sup>a</sup>	2,28 ± 0,25 <sup>a</sup>	2,02 ± 0,16 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 2,067; p = 0,158
14	<i>Lb. plantarum</i> ATCC 8014	2,56 ± 0,37 <sup>a</sup>	2,79 ± 0,61 <sup>a</sup>	2,51 ± 0,85 <sup>a</sup>	2,05 ± 1,78 <sup>a</sup>	F <sub>(3,11)</sub> = 0,351; p = 0,789
30	<i>Lb. leishmanii</i> ATCC 7830	1,58 ± 0,35 <sup>a</sup>	1,00 ± 0,00 <sup>b</sup>	1,00 ± <sup>b</sup>	-	F <sub>(2,6)</sub> = 6,092; p = 0,036
38	<i>Lb. fermentum</i> ATCC 9338	2,49 ± 0,23 <sup>a</sup>	2,31 ± 0,54 <sup>a</sup>	2,32 ± 0,43 <sup>a</sup>	2,40 ± 0,49 <sup>a</sup>	F <sub>(3,12)</sub> = 0,141; p = 0,934
71	<i>Lb. fermentum</i> ATCC 23271	2,19 ± 0,53 <sup>a</sup>	2,65 ± 0,42 <sup>a</sup>	2,62 ± 0,44 <sup>a</sup>	2,63 ± 0,42 <sup>a</sup>	F <sub>(3,12)</sub> = 0,953; p = 0,446
46	<i>Lb. helveticus</i> ATCC 12046	2,23 ± 0,23 <sup>a</sup>	0,50 ± 0,71 <sup>b</sup>	-	-	F <sub>(1,4)</sub> = 24,132; p = 0,008
L5	<i>Lb. acidophilus</i> LA-5® (comercial)	2,32 ± 0,39 <sup>b</sup>	3,14 ± 0,03 <sup>ab</sup>	2,56 ± 0,14 <sup>b</sup>	3,71 ± 0,00 <sup>a</sup>	F <sub>(3,6)</sub> = 12,460; p = 0,005
SB	<i>Lb. acidophilus</i> 74-2 (comercial)	1,45 ± 0,39 <sup>b</sup>	2,72 ± 0,03 <sup>a</sup>	2,70 ± 0,16 <sup>b</sup>	2,95 ± 0,05 <sup>a</sup>	F <sub>(3,6)</sub> =18,275; p = 0,002
97	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 4797	1,64 ± 0,42 <sup>a</sup>	1,35 ± 0,04 <sup>ab</sup>	0,00 ± <sup>b</sup>	-	F <sub>(2,4)</sub> = 8,170; p = 0,039
44	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> CCT 3744	1,11 ± 0,97 <sup>a</sup>	1,33 ± 0,96 <sup>a</sup>	1,21 ± 0,46 <sup>a</sup>	-	F <sub>(2,8)</sub> = 0,063; p = 0,939
66	<i>Streptococcus thermophilus</i> ST 066 (comercial)	1,86 ± 0,39 <sup>a</sup>	1,96 ± 0,76 <sup>a</sup>	1,62 ± 1,16 <sup>a</sup>	2,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	F <sub>(3,10)</sub> = 0,160; p = 0,921
ST	<i>Streptococcus thermophilus</i> Yo-Mix™ (comercial)	2,04 ± 0,20 <sup>a</sup>	2,54 ± 0,67 <sup>a</sup>	1,55 ± 1,09 <sup>a</sup>	2,95 ± 0,01 <sup>a</sup>	F <sub>(3,9)</sub> = 2,295; p = 0,147
AS	<i>Streptococcus thermophilus</i> TH-4® (comercial)	2,36 ± 0,14 <sup>a</sup>	2,92 ± 0,38 <sup>a</sup>	3,03 ± 0,67 <sup>a</sup>	3,25 ± 0,00 <sup>a</sup>	F <sub>(3,10)</sub> = 2,546; p = 0,115

Tabela 2. Comparações individuais, por cepa bacteriana testada, das contagens obtidos em ágar MRS adicionado de propionato de sódio em diferentes concentrações. Valores com letras minúsculas diferentes são estatisticamente diferentes por ANOVA ( $p < 0.05$ ).

Isolado	Espécie	Controle	2 g/L	3g/L	4g/L	ANOVA
667	<i>Lb. casei</i> CIRM-BIA 667 <sup>T</sup> CNRZ 313 <sup>T</sup>	1,54 ± 1,24 <sup>a</sup>	1,72 ± 1,04 <sup>a</sup>	1,70 ± 1,04 <sup>a</sup>	1,65 ± 0,98 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 0,022; p = 0,995
767	<i>Lb. casei</i> CIRM-BIA 767 CNRZ 1244	1,87 ± 1,20 <sup>a</sup>	1,80 ± 1,33 <sup>a</sup>	1,52 ± 1,60 <sup>a</sup>	1,82 ± 1,19 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 0,056; p = 0,982
769	<i>Lb. casei</i> CIRM-BIA 769 CNRZ 1874	1,64 ± 1,09 <sup>a</sup>	1,85 ± 0,89 <sup>a</sup>	1,80 ± 0,91 <sup>a</sup>	1,84 ± 0,94 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 0,043; p = 0,988
771	<i>Lb. casei</i> CIRM-BIA 771 CNRZ 1393	1,72 ± 0,86 <sup>a</sup>	1,76 ± 0,80 <sup>a</sup>	1,69 ± 0,79 <sup>a</sup>	1,73 ± 0,71 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 0,006; p = 0,999
1465	<i>Lb. casei</i> subsp. <i>casei</i> CCT 1465 ATCC 393	2,17 ± 0,72 <sup>a</sup>	2,18 ± 0,64 <sup>a</sup>	2,05 ± 0,68 <sup>a</sup>	2,16 ± 0,59 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 0,035; p = 0,991
1376	<i>Lb. casei</i> subsp. <i>alactosus</i> CCT 1376 NCDO 2713	1,82 ± 0,29 <sup>a</sup>	1,99 ± 0,30 <sup>a</sup>	1,98 ± 0,21 <sup>a</sup>	1,91 ± 0,26 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 0,348; p = 0,792
566	<i>Lb. paracasei</i> CCT 0566 ATCC 10746	1,74 ± 0,64 <sup>a</sup>	1,72 ± 0,71 <sup>a</sup>	1,79 ± 0,61 <sup>a</sup>	1,87 ± 0,48 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 0,051; p = 0,984
7501	<i>Lb. paracasei</i> CCT 7501	2,78 ± 0,36 <sup>a</sup>	2,97 ± 0,11 <sup>a</sup>	2,95 ± 0,12 <sup>a</sup>	2,98 ± 0,14 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 0,769; p = 0,533
335	<i>Lb. paracasei</i> ATCC 335	1,43 ± 0,00 <sup>ab</sup>	1,47 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,25 ± 0,06 <sup>bc</sup>	1,17 ± 0,20 <sup>c</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 7,695; p = 0,004
6	<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 7469	2,78 ± 0,12 <sup>a</sup>	2,20 ± 0,76 <sup>a</sup>	2,15 ± 0,72 <sup>a</sup>	2,20 ± 0,75 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 0,854; p = 0,491
95	<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 9595	3,18 ± 0,00	3,26 ± 0,00	3,06 ± 0,00	3,30 ± 0,00	F <sub>(3, 12)</sub> = ; p =
842	<i>Lb. rhamnosus</i> CCT 0842	1,84 ± 0,33 <sup>a</sup>	2,09 ± 0,13 <sup>a</sup>	2,13 ± 0,27 <sup>a</sup>	2,15 ± 0,05 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 1,612; p = 0,238
5835	<i>Lb. rhamnosus</i> CCT 5835	1,97 ± 0,69 <sup>a</sup>	2,01 ± 0,74 <sup>a</sup>	2,05 ± 0,64 <sup>a</sup>	2,00 ± 0,67 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 0,010; p = 0,998
12	<i>Lb. plantarum</i> ATCC 10012	2,32 ± 0,07 <sup>a</sup>	2,39 ± 0,34 <sup>a</sup>	2,38 ± 0,24 <sup>a</sup>	2,52 ± 0,27 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 0,473; p = 0,707
14	<i>Lb. plantarum</i> ATCC 8014	2,60 ± 0,85 <sup>a</sup>	2,70 ± 0,59 <sup>a</sup>	2,62 ± 0,81 <sup>a</sup>	2,52 ± 0,66 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 0,040; p = 0,989
30	<i>Lb. leishmanii</i> ATCC 7830	2,07 ± 0,87 <sup>a</sup>	2,00 ± 0,76 <sup>a</sup>	1,94 ± 1,03 <sup>a</sup>	1,91 ± 0,86 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 0,025; p = 0,994
38	<i>Lb. fermentum</i> ATCC 9338	2,25 ± 0,09 <sup>a</sup>	2,70 ± 0,23 <sup>a</sup>	2,54 ± 0,28 <sup>a</sup>	2,64 ± 0,25 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 3,112; p = 0,067
71	<i>Lb. fermentum</i> ATCC 23271	1,59 ± 0,00 <sup>b</sup>	1,78 ± 0,00 <sup>a</sup>	1,89 ± 0,10 <sup>a</sup>	1,82 ± 0,10 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 12,591; p = 0,001
46	<i>Lb. helveticus</i> ATCC 12046	2,13 ± 0,50 <sup>a</sup>	2,37 ± 0,43 <sup>a</sup>	2,43 ± 0,51 <sup>a</sup>	2,31 ± 0,51 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 0,283; p = 0,836
L5	<i>Lb. acidophilus</i> LA-5® (comercial)	1,93 ± 0,16 <sup>a</sup>	2,66 ± 0,91 <sup>a</sup>	2,65 ± 0,93 <sup>a</sup>	2,69 ± 0,88 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 0,881; p = 0,478
SB	<i>Lb. acidophilus</i> 74-2 (comercial)	2,70 ± 0,68 <sup>a</sup>	3,26 ± 0,29 <sup>a</sup>	3,51 ± 0,48 <sup>a</sup>	3,45 ± 0,51 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 2,123; p = 0,151
97	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 4797	1,85 ± 0,17 <sup>a</sup>	1,85 ± 0,34 <sup>a</sup>	1,82 ± 0,42 <sup>a</sup>	1,76 ± 0,39 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 0,059; p = 0,980
44	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> CCT 3744	2,95 ± 0,62 <sup>a</sup>	2,15 ± 1,94 <sup>a</sup>	2,40 ± 2,08 <sup>a</sup>	1,87 ± 1,72 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 11)</sub> = 0,305; p = 0,821
66	<i>Streptococcus thermophilus</i> ST 066 (comercial)	2,19 ± 0,00 <sup>d</sup>	4,13 ± 0,00 <sup>a</sup>	3,97 ± 0,03 <sup>b</sup>	3,91 ± 0,02 <sup>c</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 8545,867; p < 0,0001
ST	<i>Streptococcus thermophilus</i> Yo-Mix™ (comercial)	2,32 ± 0,25 <sup>a</sup>	3,21 ± 1,05 <sup>a</sup>	3,20 ± 0,89 <sup>a</sup>	2,91 ± 0,74 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 1,125; p = 0,378
AS	<i>Streptococcus thermophilus</i> TH-4® (comercial)	2,31 ± 0,00 <sup>a</sup>	3,96 ± 0,02 <sup>a</sup>	3,90 ± 0,04 <sup>a</sup>	3,68 ± 0,51 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 36,887; p < 0,0001

Tabela 3. Comparações individuais, por cepa bacteriana testada, das contagens obtidos em ágar MRS adicionado de bile em diferentes concentrações. Valores com letras minúsculas diferentes são estatisticamente diferentes por ANOVA ( $p < 0.05$ ).

Isolado	Espécie	Controle	1 mg/L	1.5 mg/L	2mg/L	ANOVA
667	<i>Lb. casei</i> CIRM-BIA 667 <sup>T</sup> CNRZ 313 <sup>T</sup>	2,54 ± 0,99 <sup>a</sup>	2,20 ± 0,53 <sup>a</sup>	1,67 ± 0,09 <sup>a</sup>	1,37 ± 0,52 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 8)</sub> = 1,487; p = 0,290
767	<i>Lb. casei</i> CIRM-BIA 767 CNRZ 1244	2,88 ± 0,99 <sup>a</sup>	2,46 ± 0,76 <sup>a</sup>	2,24 ± 0,99 <sup>a</sup>	2,12 ± 0,73 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 11)</sub> = 0,521; p = 0,677
769	<i>Lb. casei</i> CIRM-BIA 769 CNRZ 1874	1,97 ± 0,16 <sup>a</sup>	1,89 ± 0,22 <sup>a</sup>	1,77 ± 0,10 <sup>a</sup>	1,87 ± 0,12 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 6)</sub> = 0,730; p = 0,570
771	<i>Lb. casei</i> CIRM-BIA 771 CNRZ 1393	2,10 ± 0,26 <sup>a</sup>	2,03 ± 0,45 <sup>a</sup>	1,80 ± 0,90 <sup>a</sup>	1,51 ± 1,05 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 11)</sub> = 0,493; p = 0,694
1465	<i>Lb. casei</i> subsp. <i>casei</i> CCT 1465 ATCC 393	1,87 ± 0,24 <sup>a</sup>	1,69 ± 0,27 <sup>ab</sup>	1,60 ± 0,14 <sup>ab</sup>	0,85 ± <sup>b</sup>	F <sub>(3, 7)</sub> = 4,834; p = 0,040
1376	<i>Lb. casei</i> subsp. <i>alactosus</i> CCT 1376 NCDO 2713	2,52 ± 0,43 <sup>a</sup>	2,56 ± 0,42 <sup>a</sup>	2,56 ± 0,36 <sup>a</sup>	2,51 ± 0,41 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 0,014; p = 0,998
566	<i>Lb. paracasei</i> CCT 0566 ATCC 10746	2,66 ± 0,77 <sup>a</sup>	2,77 ± 0,60 <sup>a</sup>	2,32 ± 0,18 <sup>a</sup>	2,13 ± 0,39 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 1,252; p = 0,335
7501	<i>Lb. paracasei</i> CCT 7501	2,33 ± 0,44 <sup>a</sup>	2,24 ± 0,65 <sup>a</sup>	2,39 ± 0,71 <sup>a</sup>	2,75 ± 0,13 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 0,696; p = 0,572
335	<i>Lb. paracasei</i> ATCC 335	1,78 ± 0,13 <sup>b</sup>	2,43 ± 0,03 <sup>a</sup>	2,38 ± 0,00 <sup>a</sup>	2,17 ± 0,13 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 6)</sub> = 23,268; p = 0,001
6	<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 7469	2,16 ± 0,25 <sup>a</sup>	2,44 ± 0,27 <sup>a</sup>	2,42 ± 0,14 <sup>a</sup>	2,44 ± 0,09 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 1,838; p = 0,194
95	<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 9595	1,92 ± 0,40 <sup>a</sup>	2,36 ± 0,15 <sup>a</sup>	2,29 ± 0,15 <sup>a</sup>	2,32 ± 0,09 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 3,221; p = 0,061
842	<i>Lb. rhamnosus</i> CCT 0842	2,06 ± 0,14 <sup>a</sup>	1,91 ± 0,06 <sup>a</sup>	1,83 ± 0,26 <sup>a</sup>	2,00 ± 0,21 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 10)</sub> = 1,134; p = 0,382
5835	<i>Lb. rhamnosus</i> CCT 5835	1,48 ± 0,68 <sup>a</sup>	2,00 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,51 ± 0,59 <sup>a</sup>	1,98 ± 0,03 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 8)</sub> = 0,723; p = 0,566
12	<i>Lb. plantarum</i> ATCC 10012	1,68 ± 1,06 <sup>a</sup>	2,25 ± 0,43 <sup>a</sup>	2,24 ± 0,36 <sup>a</sup>	1,92 ± 0,81 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 0,583; p = 0,637
14	<i>Lb. plantarum</i> ATCC 8014	1,64 ± 1,12 <sup>a</sup>	1,85 ± 0,26 <sup>a</sup>	1,62 ± 0,35 <sup>a</sup>	1,40 ± 0,44 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 0,335; p = 0,800
30	<i>Lb. leishmanii</i> ATCC 7830	1,68 ± 0,81 <sup>a</sup>	1,60 ± 0,69 <sup>a</sup>	2,13 ± 0,20 <sup>a</sup>	1,35 ± 0,89 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 0,854; p = 0,491
38	<i>Lb. fermentum</i> ATCC 9338	1,69 ± 0,69 <sup>a</sup>	1,49 ± 0,57 <sup>a</sup>	1,24 ± 0,40 <sup>a</sup>	0,95 ± 0,57 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 11)</sub> = 1,209; p = 0,352
71	<i>Lb. fermentum</i> ATCC 23271	2,89 ± 0,44 <sup>a</sup>	3,10 ± 0,51 <sup>a</sup>	3,21 ± 0,45 <sup>a</sup>	3,16 ± 0,51 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 0,355; p = 0,787
46	<i>Lb. helveticus</i> ATCC 12046	1,94 ± 1,22 <sup>a</sup>	1,65 ± 0,10 <sup>a</sup>	1,68 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 6)</sub> = 2,375; p = 0,169
L5	<i>Lb. acidophilus</i> LA-5® (comercial)	2,84 ± 0,47 <sup>a</sup>	2,82 ± 0,48 <sup>a</sup>	2,86 ± 0,48 <sup>a</sup>	2,86 ± 0,49 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 0,007; p = 0,999
SB	<i>Lb. acidophilus</i> 74-2 (comercial)	2,40 ± 0,24 <sup>a</sup>	2,92 ± 0,78 <sup>a</sup>	2,75 ± 0,67 <sup>a</sup>	2,87 ± 0,82 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 0,496; p = 0,692
97	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 4797	2,42 ± 0,25 <sup>a</sup>	2,49 ± 0,82 <sup>a</sup>	2,67 ± 1,44 <sup>a</sup>	3,33 ± 0,01 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 9)</sub> = 0,590; p = 0,637
44	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> CCT 3744	1,64 ± 0,34 <sup>a</sup>	1,32 ± 0,03 <sup>a</sup>	1,92 ± 0,24 <sup>a</sup>	1,58 ± 0,46 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 6)</sub> = 1,176; p = 0,394
66	<i>Streptococcus thermophilus</i> ST 066 (comercial)	1,81 ± 0,33 <sup>a</sup>	2,44 ± 0,01 <sup>a</sup>	2,48 ± 0,02 <sup>a</sup>	2,34 ± 0,08 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 6)</sub> = 5,495; p = 0,037
ST	<i>Streptococcus thermophilus</i> Yo-Mix™ (comercial)	1,82 ± 0,43 <sup>a</sup>	2,33 ± 0,01 <sup>a</sup>	2,22 ± 0,03 <sup>a</sup>	2,29 ± 0,01 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 6)</sub> = 1,851; p = 0,239
AS	<i>Streptococcus thermophilus</i> TH-4® (comercial)	2,27 ± 0,64 <sup>a</sup>	3,34 ± 0,01 <sup>a</sup>	2,35 ± 2,03 <sup>a</sup>	3,39 ± 0,00 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 7)</sub> = 0,710; p = 0,576

Tabela 4. Comparações individuais, por cepa bacteriana testada, das contagens obtidos em ágar MRS adicionado de ácido nalidíxico em diferentes concentrações. Valores com letras minúsculas diferentes são estatisticamente diferentes por ANOVA ( $p < 0.05$ ).

Isolado	Espécie	Controle	10 mg/L	15mg/L	20mg/L	ANOVA
667	<i>Lb. casei</i> CIRM-BIA 667 <sup>T</sup> CNRZ 313 <sup>T</sup>	2,10 ± 0,53	-	-	-	-
767	<i>Lb. casei</i> CIRM-BIA 767 CNRZ 1244	2,39 ± 1,29 <sup>a</sup>	3,50 ± 0,41 <sup>a</sup>	3,15 ± 0,83 <sup>a</sup>	-	F <sub>(2,5)</sub> = 0,809; p = 0,496
769	<i>Lb. casei</i> CIRM-BIA 769 CNRZ 1874	2,18 ± 0,47	-	-	-	-
771	<i>Lb. casei</i> CIRM-BIA 771 CNRZ 1393	1,87 ± 0,23 <sup>a</sup>	0,95 ± 0,07 <sup>b</sup>	-	-	F <sub>(1,4)</sub> = 28,594; p = 0,006
1465	<i>Lb. casei</i> subsp. <i>casei</i> CCT 1465 ATCC 393	2,03 ± 0,30	-	-	-	-
1376	<i>Lb. casei</i> subsp. <i>alactosus</i> CCT 1376 NCDO 2713	2,63 ± 0,81 <sup>a</sup>	2,47 ± 0,87 <sup>a</sup>	2,30 ± 0,94 <sup>a</sup>	2,37 ± 0,86 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 0,112; p = 0,952
566	<i>Lb. paracasei</i> CCT 0566 ATCC 10746	2,46 ± 0,83 <sup>a</sup>	2,56 ± 0,74 <sup>a</sup>	2,27 ± 0,45 <sup>a</sup>	2,02 ± 0,63 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 11)</sub> = 0,460; p = 0,716
7501	<i>Lb. paracasei</i> CCT 7501	2,18 ± 0,37 <sup>a</sup>	-	-	1,00 ± <sup>a</sup>	F <sub>(1,3)</sub> = 7,875; p = 0,068
335	<i>Lb. paracasei</i> ATCC 335	2,45 ± 1,40 <sup>a</sup>	2,09 ± 1,22 <sup>a</sup>	1,15 ± 0,15 <sup>a</sup>	1,49 ± 0,87 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 8)</sub> = 1,019; p = 0,434
6	<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 7469	3,00 ± 0,92 <sup>a</sup>	2,46 ± 0,40 <sup>a</sup>	2,47 ± 0,44 <sup>a</sup>	2,51 ± 0,51 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 0,762; p = 0,537
95	<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 9595	3,02 ± 0,54 <sup>a</sup>	2,72 ± 0,19 <sup>a</sup>	2,71 ± 0,20 <sup>a</sup>	2,98 ± 0,37 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 0,856; p = 0,490
842	<i>Lb. rhamnosus</i> CCT 0842	1,86 ± 0,49 <sup>a</sup>	1,83 ± 0,51 <sup>a</sup>	1,80 ± 0,70 <sup>a</sup>	1,72 ± 0,60 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 10)</sub> = 0,041; p = 0,988
5835	<i>Lb. rhamnosus</i> CCT 5835	2,54 ± 0,69 <sup>a</sup>	2,51 ± 0,65 <sup>a</sup>	2,48 ± 0,76 <sup>a</sup>	2,35 ± 0,74 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 0,057; p = 0,981
12	<i>Lb. plantarum</i> ATCC 10012	2,92 ± 0,78 <sup>a</sup>	2,23 ± 0,13 <sup>a</sup>	2,28 ± 0,13 <sup>a</sup>	2,72 ± 0,56 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 1,895; p = 0,184
14	<i>Lb. plantarum</i> ATCC 8014	3,16 ± 0,44 <sup>a</sup>	2,16 ± 0,79 <sup>a</sup>	2,45 ± 0,40 <sup>a</sup>	2,54 ± 0,27 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 2,658; p = 0,096
30	<i>Lb. leishmanii</i> ATCC 7830	3,18 ± 0,45 <sup>a</sup>	2,54 ± 0,52 <sup>a</sup>	3,01 ± 0,41 <sup>a</sup>	2,68 ± 0,32 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 0,904; p = 0,183
38	<i>Lb. fermentum</i> ATCC 9338	2,57 ± 0,68 <sup>a</sup>	1,67 ± 0,52 <sup>a</sup>	1,73 ± 0,28 <sup>a</sup>	2,00 ± 0,28 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 3,038; p = 0,071
71	<i>Lb. fermentum</i> ATCC 23271	3,18 ± 0,11 <sup>a</sup>	2,95 ± 0,30 <sup>a</sup>	2,83 ± 0,30 <sup>a</sup>	2,79 ± 0,34 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 1,616; p = 0,237
46	<i>Lb. helveticus</i> ATCC 12046	2,77 ± 0,79 <sup>a</sup>	1,41 ± 0,37 <sup>a</sup>	1,55 ± 1,16 <sup>a</sup>	2,47 ± 0,40 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 9)</sub> = 2,198; p = 0,158
L5	<i>Lb. acidophilus</i> LA-5® (comercial)	2,32 ± 0,85 <sup>a</sup>	1,82 ± 0,22 <sup>a</sup>	2,15 ± 0,72 <sup>a</sup>	2,11 ± 0,79 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 0,362; p = 0,782
SB	<i>Lb. acidophilus</i> 74-2 (comercial)	2,84 ± 0,37 <sup>a</sup>	2,13 ± 0,30 <sup>b</sup>	2,52 ± 0,29 <sup>ab</sup>	2,52 ± 0,37 <sup>ab</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 3,048; p = 0,070
97	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 4797	2,72 ± 0,50 <sup>a</sup>	2,45 ± 0,15 <sup>a</sup>	2,36 ± 0,21 <sup>a</sup>	2,45 ± 0,21 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 1,117; p = 0,381
44	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> CCT 3744	2,80 ± 0,78 <sup>a</sup>	2,14 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,85 ± 0,08 <sup>a</sup>	3,12 ± 0,05 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 6)</sub> = 2,416; p = 0,165
66	<i>Streptococcus thermophilus</i> ST 066 (comercial)	2,79 ± 0,55 <sup>a</sup>	1,27 ± 0,85 <sup>a</sup>	1,57 ± 1,15 <sup>a</sup>	3,20 ± 0,25 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 10)</sub> = 3,874; p = 0,045
ST	<i>Streptococcus thermophilus</i> Yo-Mix™ (comercial)	2,56 ± 0,71	2,63 ± 0,21	2,47 ± 0,01	3,06 ± 0,06	F <sub>(3, 6)</sub> = 0,555; p = 0,663
AS	<i>Streptococcus thermophilus</i> TH-4® (comercial)	2,81 ± 0,59 <sup>a</sup>	1,88 ± 0,44 <sup>ab</sup>	1,72 ± 0,47 <sup>ab</sup>	1,45 ± 0,78 <sup>b</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 4,082; p = 0,033

Tabela 5. Comparações individuais, por cepa bacteriana testada, das contagens obtidos em ágar MRS adicionado de vancomicina (teste 1) em diferentes concentrações. Valores com letras minúsculas diferentes são estatisticamente diferentes por ANOVA ( $p < 0.05$ ).

Isolado	Espécie	Controle	0.5 mg/L	1mg/L	1.5 mg/L	ANOVA
667	<i>Lb. casei</i> CIRM-BIA 667 <sup>T</sup> CNRZ 313 <sup>T</sup>	2,08 ± 0,26	2,23 ± 0,13	2,24 ± 0,03	2,20 ± 0,13	-
767	<i>Lb. casei</i> CIRM-BIA 767 CNRZ 1244	1,91 ± 0,30 <sup>a</sup>	1,85 ± 0,48 <sup>a</sup>	1,71 ± 0,59 <sup>a</sup>	1,71 ± 0,59 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 0,167; p = 0,917
769	<i>Lb. casei</i> CIRM-BIA 769 CNRZ 1874	1,97 ± 0,57	2,26 ± 0,20	2,45 ± 0,13	2,23 ± 0,30	-
771	<i>Lb. casei</i> CIRM-BIA 771 CNRZ 1393	1,48 ± 0,75 <sup>a</sup>	1,35 ± 0,90 <sup>a</sup>	1,21 ± 1,05 <sup>a</sup>	1,31 ± 0,89 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 0,062; p = 0,979
1465	<i>Lb. casei</i> subsp. <i>casei</i> CCT 1465 ATCC 393	2,61 ± 0,56	2,29 ± 0,84	2,44 ± 0,82	2,45 ± 0,83	-
1376	<i>Lb. casei</i> subsp. <i>alactosus</i> CCT 1376 NCDO 2713	2,47 ± 0,20 <sup>a</sup>	2,48 ± 0,20 <sup>a</sup>	2,28 ± 0,32 <sup>a</sup>	2,45 ± 0,15 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 0,665; p = 0,590
566	<i>Lb. paracasei</i> CCT 0566 ATCC 10746	1,71 ± 0,50 <sup>a</sup>	1,67 ± 0,54 <sup>a</sup>	1,60 ± 0,65 <sup>a</sup>	1,54 ± 0,67 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 0,066; p = 0,977
7501	<i>Lb. paracasei</i> CCT 7501	1,80 ± 0,94 <sup>a</sup>	1,83 ± 0,84 <sup>a</sup>	1,81 ± 0,81 <sup>a</sup>	1,80 ± 0,93 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 0,001; p = 1,000
335	<i>Lb. paracasei</i> ATCC 335	2,19 ± 0,84 <sup>a</sup>	1,29 ± 0,24 <sup>a</sup>	1,46 ± 0,28 <sup>a</sup>	1,15 ± 0,42 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 3,396; p = 0,054
6	<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 7469	3,08 ± 0,15 <sup>a</sup>	2,47 ± 0,79 <sup>a</sup>	2,25 ± 1,15 <sup>a</sup>	3,53 ± 0,30 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 2,628; p = 0,098
95	<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 9595	3,11 ± 0,73 <sup>a</sup>	3,26 ± 0,42 <sup>a</sup>	2,94 ± 0,85 <sup>a</sup>	3,53 ± 0,19 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 0,679; p = 0,581
842	<i>Lb. rhamnosus</i> CCT 0842	2,21 ± 0,80 <sup>a</sup>	2,46 ± 0,74 <sup>a</sup>	2,36 ± 0,72 <sup>a</sup>	2,37 ± 0,71 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 0,080; p = 0,970
5835	<i>Lb. rhamnosus</i> CCT 5835	1,95 ± 0,56 <sup>a</sup>	2,17 ± 0,37 <sup>a</sup>	1,80 ± 0,78 <sup>a</sup>	1,65 ± 0,86 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 0,425; p = 0,738
12	<i>Lb. plantarum</i> ATCC 10012	2,43 ± 0,32 <sup>ab</sup>	2,22 ± 0,49 <sup>b</sup>	2,55 ± 0,24 <sup>ab</sup>	3,09 ± 0,47 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 3,574; p = 0,047
14	<i>Lb. plantarum</i> ATCC 8014	2,80 ± 0,42 <sup>a</sup>	2,33 ± 0,84 <sup>a</sup>	2,35 ± 0,79 <sup>a</sup>	1,83 ± 1,28 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 0,793; p = 0,521
30	<i>Lb. leishmanii</i> ATCC 7830	3,00 ± 0,19 <sup>a</sup>	2,38 ± 0,66 <sup>a</sup>	2,39 ± 0,66 <sup>a</sup>	3,37 ± 0,42 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 3,485; p = 0,050
38	<i>Lb. fermentum</i> ATCC 9338	1,62 ± 0,00 <sup>d</sup>	1,88 ± 0,09 <sup>c</sup>	2,86 ± 0,03 <sup>b</sup>	3,46 ± 0,01 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 1299,384; p < 0,001
71	<i>Lb. fermentum</i> ATCC 23271	2,77 ± 0,22 <sup>ab</sup>	2,10 ± 0,55 <sup>b</sup>	2,69 ± 0,17 <sup>ab</sup>	3,05 ± 0,43 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 4,532; p = 0,024
46	<i>Lb. helveticus</i> ATCC 12046	2,24 ± 0,26 <sup>a</sup>	1,60 ± 0,44 <sup>a</sup>	1,65 ± 0,55 <sup>a</sup>	1,60 ± 0,48 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 1,946; p = 0,176
L5	<i>Lb. acidophilus</i> LA-5® (comercial)	1,85 ± 0,43 <sup>ab</sup>	1,99 ± 0,24 <sup>ab</sup>	2,49 ± 0,72 <sup>a</sup>	1,31 ± 0,14 <sup>b</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 4,823; p = 0,020
SB	<i>Lb. acidophilus</i> 74-2 (comercial)	2,21 ± 0,18 <sup>ab</sup>	2,45 ± 0,27 <sup>ab</sup>	2,84 ± 0,51 <sup>a</sup>	2,10 ± 0,14 <sup>b</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 4,130; p = 0,032
97	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 4797	2,12 ± 0,06 <sup>a</sup>	2,14 ± 0,15 <sup>a</sup>	2,86 ± 0,86 <sup>a</sup>	2,12 ± 0,19 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 2,641; p = 0,097
44	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> CCT 3744	2,20 ± 0,02 <sup>a</sup>	2,51 ± 0,61 <sup>a</sup>	2,71 ± 0,59 <sup>a</sup>	2,24 ± 0,17 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 1,246; p = 0,336
66	<i>Streptococcus thermophilus</i> ST 066 (comercial)	2,13 ± 0,08 <sup>a</sup>	1,42 ± 1,26 <sup>a</sup>	1,76 ± 0,19 <sup>a</sup>	1,33 ± 0,54 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 11)</sub> = 1,348; p = 0,309
ST	<i>Streptococcus thermophilus</i> Yo-Mix™ (comercial)	2,53 ± 0,48 <sup>a</sup>	2,55 ± 0,44 <sup>a</sup>	2,65 ± 0,33 <sup>a</sup>	1,95 ± 0,89 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 1,499; p = 0,265
AS	<i>Streptococcus thermophilus</i> TH-4® (comercial)	2,40 ± 0,20 <sup>a</sup>	2,54 ± 0,20 <sup>a</sup>	2,56 ± 0,18 <sup>a</sup>	2,49 ± 0,15 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 0,654; p = 0,596

Tabela 6. Comparações individuais, por cepa bacteriana testada, das contagens obtidos em ágar MRS adicionado de metronidazol em diferentes concentrações. Valores com letras minúsculas diferentes são estatisticamente diferentes por ANOVA ( $p < 0.05$ ).

Isolado	Espécie	Controle	7.5 mg/L	10mg/L	12.5 mg/L	ANOVA
667	<i>Lb. casei</i> CIRM-BIA 667 <sup>T</sup> CNRZ 313 <sup>T</sup>	1,91 ± 0,41	2,17 ± 0,61	2,10 ± 0,73	2,26 ± 0,61	-
767	<i>Lb. casei</i> CIRM-BIA 767 CNRZ 1244	2,23 ± 0,14 <sup>a</sup>	2,38 ± 0,31 <sup>a</sup>	2,51 ± 0,46 <sup>a</sup>	2,54 ± 0,44 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 0,631; p = 0,609
769	<i>Lb. casei</i> CIRM-BIA 769 CNRZ 1874	2,01 ± 0,64	2,64 ± 0,33	2,47 ± 0,43	2,70 ± 0,32	-
771	<i>Lb. casei</i> CIRM-BIA 771 CNRZ 1393	1,80 ± 0,40 <sup>a</sup>	1,92 ± 0,67 <sup>a</sup>	2,16 ± 0,77 <sup>a</sup>	2,27 ± 0,54 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 0,488; p = 0,697
1465	<i>Lb. casei</i> subsp. <i>casei</i> CCT 1465 ATCC 393	2,12 ± 0,91	2,09 ± 1,12	1,92 ± 1,20	1,92 ± 1,17	-
1376	<i>Lb. casei</i> subsp. <i>alactosus</i> CCT 1376 NCDO 2713	1,99 ± 0,74 <sup>a</sup>	1,99 ± 0,84 <sup>a</sup>	2,00 ± 0,85 <sup>a</sup>	2,01 ± 0,89 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 0,000; p = 1,000
566	<i>Lb. paracasei</i> CCT 0566 ATCC 10746	2,03 ± 0,31 <sup>a</sup>	1,97 ± 0,82 <sup>a</sup>	2,07 ± 0,89 <sup>a</sup>	1,93 ± 0,96 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 0,023; p = 0,995
7501	<i>Lb. paracasei</i> CCT 7501	2,15 ± 0,55 <sup>a</sup>	2,42 ± 0,60 <sup>a</sup>	2,42 ± 0,48 <sup>a</sup>	2,39 ± 0,62 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 0,224; p = 0,872
335	<i>Lb. paracasei</i> ATCC 335	2,06 ± 0,69 <sup>a</sup>	2,65 ± 0,67 <sup>a</sup>	2,35 ± 0,48 <sup>a</sup>	1,78 ± 1,04 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 11)</sub> = 0,865; p = 0,488
6	<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 7469	2,93 ± 0,23 <sup>a</sup>	3,25 ± 0,26 <sup>a</sup>	2,71 ± 0,51 <sup>a</sup>	2,42 ± 0,77 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 1,969; p = 0,173
95	<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 9595	3,12 ± 0,71 <sup>a</sup>	2,97 ± 0,94 <sup>a</sup>	3,02 ± 0,84 <sup>a</sup>	2,95 ± 0,78 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 0,033; p = 0,992
842	<i>Lb. rhamnosus</i> CCT 0842	2,62 ± 0,41 <sup>a</sup>	2,97 ± 0,24 <sup>a</sup>	2,93 ± 0,20 <sup>a</sup>	2,86 ± 0,17 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 1,347; p = 0,305
5835	<i>Lb. rhamnosus</i> CCT 5835	2,16 ± 0,20 <sup>a</sup>	2,32 ± 0,42 <sup>a</sup>	2,31 ± 0,49 <sup>a</sup>	2,45 ± 0,46 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 0,326; p = 0,806
12	<i>Lb. plantarum</i> ATCC 10012	2,59 ± 0,18 <sup>a</sup>	2,84 ± 0,75 <sup>a</sup>	2,31 ± 0,54 <sup>a</sup>	1,68 ± 1,26 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 1,609; p = 0,239
14	<i>Lb. plantarum</i> ATCC 8014	3,09 ± 0,55 <sup>a</sup>	3,11 ± 0,23 <sup>a</sup>	2,51 ± 0,65 <sup>a</sup>	2,43 ± 0,65 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 1,773; p = 0,206
30	<i>Lb. leishmanii</i> ATCC 7830	2,80 ± 0,42 <sup>a</sup>	2,88 ± 0,59 <sup>a</sup>	1,69 ± 0,83 <sup>a</sup>	2,36 ± 1,04 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 2,090; p = 0,155
38	<i>Lb. fermentum</i> ATCC 9338	3,26 ± 0,80 <sup>a</sup>	3,49 ± 0,08 <sup>a</sup>	3,06 ± 0,91 <sup>a</sup>	2,66 ± 1,27 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 0,649; p = 0,599
71	<i>Lb. fermentum</i> ATCC 23271	2,53 ± 0,14 <sup>a</sup>	3,06 ± 0,53 <sup>a</sup>	2,42 ± 0,63 <sup>a</sup>	2,25 ± 0,48 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 2,097; p = 0,154
46	<i>Lb. helveticus</i> ATCC 12046	2,40 ± 0,52 <sup>a</sup>	3,07 ± 0,73 <sup>a</sup>	2,45 ± 0,45 <sup>a</sup>	2,06 ± 0,71 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 1,875; p = 0,188
L5	<i>Lb. acidophilus</i> LA-5® (comercial)	1,99 ± 0,24 <sup>a</sup>	2,62 ± 0,45 <sup>a</sup>	2,77 ± 0,42 <sup>a</sup>	1,68 ± 1,18 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 2,331; p = 0,126
SB	<i>Lb. acidophilus</i> 74-2 (comercial)	2,19 ± 0,10 <sup>a</sup>	2,97 ± 0,39 <sup>a</sup>	2,88 ± 0,47 <sup>a</sup>	2,53 ± 0,54 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 2,998; p = 0,073
97	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 4797	2,14 ± 0,05 <sup>b</sup>	2,70 ± 0,33 <sup>ab</sup>	3,02 ± 0,56 <sup>a</sup>	3,11 ± 0,38 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 5,382; p = 0,014
44	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> CCT 3744	2,15 ± 0,09 <sup>b</sup>	2,98 ± 0,48 <sup>ab</sup>	3,04 ± 0,53 <sup>a</sup>	2,95 ± 0,43 <sup>ab</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 4,026; p = 0,034
66	<i>Streptococcus thermophilus</i> ST 066 (comercial)	2,16 ± 0,21 <sup>a</sup>	3,10 ± 0,63 <sup>a</sup>	3,15 ± 0,69 <sup>a</sup>	2,85 ± 0,38 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 3,190; p = 0,063
ST	<i>Streptococcus thermophilus</i> Yo-Mix™ (comercial)	2,49 ± 0,48 <sup>a</sup>	2,74 ± 1,15 <sup>a</sup>	2,24 ± 1,04 <sup>a</sup>	3,08 ± 0,44 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 0,736; p = 0,551
AS	<i>Streptococcus thermophilus</i> TH-4® (comercial)	2,46 ± 0,27 <sup>a</sup>	3,03 ± 0,69 <sup>a</sup>	2,72 ± 0,44 <sup>a</sup>	2,56 ± 0,50 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 1,022; p = 0,417

Tabela 7. Comparações individuais, por cepa bacteriana testada, das contagens obtidos em ágar MRS adicionado de vancomicina (teste 2) em diferentes concentrações. Valores com letras minúsculas diferentes são estatisticamente diferentes por ANOVA ( $p < 0.05$ ).

Isolado	Espécie	Controle	10 mg/L	ANOVA
667	<i>Lb. casei</i> CIRM-BIA 667 <sup>T</sup> CNRZ 313 <sup>T</sup>	2,08 ± 0,04 <sup>a</sup>	2,13 ± 0,10 <sup>a</sup>	F <sub>(1,6)</sub> = 0,942; p = 0,369
767	<i>Lb. casei</i> CIRM-BIA 767 CNRZ 1244	2,23 ± 0,02 <sup>a</sup>	2,39 ± 0,09 <sup>b</sup>	F <sub>(1,6)</sub> = 13,271; p = 0,011
769	<i>Lb. casei</i> CIRM-BIA 769 CNRZ 1874	2,30 ± 0,04 <sup>a</sup>	2,21 ± 0,12 <sup>a</sup>	F <sub>(1,6)</sub> = 2,071; p = 0,200
771	<i>Lb. casei</i> CIRM-BIA 771 CNRZ 1393	1,81 ± 0,06 <sup>a</sup>	1,77 ± 0,03 <sup>a</sup>	F <sub>(1,6)</sub> = 1,551; p = 0,259
1465	<i>Lb. casei</i> subsp. <i>casei</i> CCT 1465 ATCC 393	1,98 ± 0,08 <sup>a</sup>	1,98 ± 0,04 <sup>a</sup>	F <sub>(1,6)</sub> = 0,003; p = 0,957
1376	<i>Lb. casei</i> subsp. <i>alactosus</i> CCT 1376 NCDO 2713	2,17 ± 0,07 <sup>a</sup>	2,12 ± 0,06 <sup>a</sup>	F <sub>(1,6)</sub> = 0,765; p = 0,415
566	<i>Lb. paracasei</i> CCT 0566 ATCC 10746	2,30 ± 0,07 <sup>a</sup>	2,36 ± 0,12 <sup>a</sup>	F <sub>(1,6)</sub> = 0,704; p = 0,434
7501	<i>Lb. paracasei</i> CCT 7501	1,98 ± 0,09 <sup>a</sup>	2,06 ± 0,06 <sup>a</sup>	F <sub>(1,6)</sub> = 2,079; p = 0,199
335	<i>Lb. paracasei</i> ATCC 335	0,70 ± 0,29 <sup>a</sup>	0,72 ± 0,16 <sup>a</sup>	F <sub>(1,6)</sub> = 0,014; p = 0,908
6	<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 7469	2,16 ± 0,07 <sup>a</sup>	2,16 ± 0,05 <sup>a</sup>	F <sub>(1,6)</sub> = 0,002; p = 0,965
95	<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 9595	2,40 ± 0,09 <sup>a</sup>	2,46 ± 0,10 <sup>a</sup>	F <sub>(1,6)</sub> = 0,784; p = 0,410
842	<i>Lb. rhamnosus</i> CCT 0842	1,80 ± 0,12 <sup>a</sup>	1,76 ± 0,08 <sup>a</sup>	F <sub>(1,6)</sub> = 0,294; p = 0,607
5835	<i>Lb. rhamnosus</i> CCT 5835	2,17 ± 0,11 <sup>a</sup>	2,17 ± 0,11 <sup>a</sup>	F <sub>(1,6)</sub> = 0,001; p = 0,977
12	<i>Lb. plantarum</i> ATCC 10012	1,91 ± 0,03 <sup>a</sup>	1,85 ± 0,05 <sup>a</sup>	F <sub>(1,6)</sub> = 3,578; p = 0,107
14	<i>Lb. plantarum</i> ATCC 8014	2,52 ± 0,08 <sup>a</sup>	2,51 ± 0,13 <sup>a</sup>	F <sub>(1,6)</sub> = 0,029; p = 0,871
30	<i>Lb. leishmanii</i> ATCC 7830	3,06 ± 0,20	-	-
38	<i>Lb. fermentum</i> ATCC 9338	2,74 ± 0,17 <sup>a</sup>	2,68 ± 0,11 <sup>a</sup>	F <sub>(1,6)</sub> = 0,319; p = 0,593
71	<i>Lb. fermentum</i> ATCC 23271	2,09 ± 0,22 <sup>a</sup>	1,74 ± 0,05 <sup>b</sup>	F <sub>(1,6)</sub> = 9,648; p = 0,021
46	<i>Lb. helveticus</i> ATCC 12046	1,63 ± 0,06	-	-
L5	<i>Lb. acidophilus</i> LA-5® (comercial)	1,91 ± 0,09	-	-
SB	<i>Lb. acidophilus</i> 74-2 (comercial)	2,29 ± 0,13	-	-
97	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 4797	1,82 ± 0,06	-	-
44	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> CCT 3744	2,45 ± 0,11 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>b</sup>	F <sub>(1,4)</sub> = 964,336; p < 0,0001
66	<i>Streptococcus thermophilus</i> ST 066 (comercial)	2,32 ± 0,28	-	-
ST	<i>Streptococcus thermophilus</i> Yo-Mix™ (comercial)	3,05 ± 0,12 <sup>a</sup>	1,37 ± 0,13 <sup>b</sup>	F <sub>(1,6)</sub> = 367,610; p < 0,0001
AS	<i>Streptococcus thermophilus</i> TH-4® (comercial)	1,73 ± 0,06	-	-

Tabela 8. Comparações individuais, por cepa bacteriana testada, das contagens obtidos em ágar MRS adicionado de cloreto de 2,3,5,-trifeniltetrazólio em diferentes concentrações. Valores com letras minúsculas diferentes são estatisticamente diferentes por ANOVA ( $p < 0.05$ ).

Isolado	Espécie	Controle	15 mg/L	30mg/L	45mg/L	ANOVA
667	<i>Lb. casei</i> CIRM-BIA 667 <sup>T</sup> CNRZ 313 <sup>T</sup>	2,51 ± 0,34 <sup>a</sup>	2,43 ± 0,44 <sup>a</sup>	0,77 ± 0,10 <sup>b</sup>	0,15 ± 0,21 <sup>b</sup>	F <sub>(3, 8)</sub> = 30,668; p < 0,0001
767	<i>Lb. casei</i> CIRM-BIA 767 CNRZ 1244	2,04 ± 0,08 <sup>a</sup>	2,01 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,85 ± 0,47 <sup>b</sup>	0,30 ± <sup>b</sup>	F <sub>(3, 9)</sub> = 23,066; p = 0,000
769	<i>Lb. casei</i> CIRM-BIA 769 CNRZ 1874	2,14 ± 0,31 <sup>a</sup>	1,91 ± 0,44 <sup>a</sup>	1,63 ± 0,04 <sup>a</sup>	-	F <sub>(2,7)</sub> = 1,473; p = 0,293
771	<i>Lb. casei</i> CIRM-BIA 771 CNRZ 1393	2,19 ± 0,26 <sup>a</sup>	2,05 ± 0,36 <sup>a</sup>	2,15 ± 0,04 <sup>a</sup>	-	F <sub>(2,7)</sub> = 0,232; p = 0,799
1465	<i>Lb. casei</i> subsp. <i>casei</i> CCT 1465 ATCC 393	2,27 ± 0,19 <sup>a</sup>	2,29 ± 0,11 <sup>a</sup>	1,58 ± 0,09 <sup>b</sup>	-	F <sub>(2,7)</sub> = 18,232; p = 0,002
1376	<i>Lb. casei</i> subsp. <i>alactosus</i> CCT 1376 NCDO 2713	2,10 ± 0,13 <sup>a</sup>	2,11 ± 0,06 <sup>a</sup>	2,02 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,60 ± 0,30 <sup>b</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 74,114; p < 0,0001
566	<i>Lb. paracasei</i> CCT 0566 ATCC 10746	2,51 ± 0,03 <sup>a</sup>	2,50 ± 0,02 <sup>a</sup>	1,09 ± 0,27 <sup>b</sup>	0,92 ± 0,44 <sup>b</sup>	F <sub>(3, 8)</sub> = 59,421; p < 0,0001
7501	<i>Lb. paracasei</i> CCT 7501	2,37 ± 0,01 <sup>a</sup>	2,33 ± 0,02 <sup>ab</sup>	2,38 ± 0,10 <sup>a</sup>	2,24 ± 0,05 <sup>b</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 5,098; p = 0,017
335	<i>Lb. paracasei</i> ATCC 335	1,31 ± 0,06	-	-	-	-
6	<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 7469	2,74 ± 0,01 <sup>a</sup>	2,81 ± 0,09 <sup>a</sup>	2,77 ± 0,05 <sup>a</sup>	2,76 ± 0,02 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 1,166; p = 0,363
95	<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 9595	2,53 ± 0,03 <sup>a</sup>	2,50 ± 0,05 <sup>a</sup>	2,51 ± 0,03 <sup>a</sup>	2,55 ± 0,01 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 1,922; p = 0,180
842	<i>Lb. rhamnosus</i> CCT 0842	1,87 ± 0,50 <sup>a</sup>	1,83 ± 0,38 <sup>a</sup>	1,56 ± 0,18 <sup>a</sup>	0,79 ± 0,29 <sup>b</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 7,804; p = 0,004
5835	<i>Lb. rhamnosus</i> CCT 5835	2,10 ± 0,70 <sup>a</sup>	2,08 ± 0,73 <sup>a</sup>	2,01 ± 0,71 <sup>a</sup>	2,08 ± 0,74 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 0,013; p = 0,998
12	<i>Lb. plantarum</i> ATCC 10012	1,83 ± 0,09 <sup>a</sup>	1,79 ± 0,04 <sup>a</sup>	1,78 ± 0,11 <sup>a</sup>	1,77 ± 0,08 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 0,349; p = 0,790
14	<i>Lb. plantarum</i> ATCC 8014	2,31 ± 0,05 <sup>a</sup>	2,29 ± 0,02 <sup>a</sup>	2,29 ± 0,03 <sup>a</sup>	2,32 ± 0,03 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 0,731; p = 0,553
30	<i>Lb. leishmanii</i> ATCC 7830	2,00 ± 0,17 <sup>a</sup>	1,97 ± 0,20 <sup>a</sup>	2,00 ± 0,07 <sup>a</sup>	2,06 ± 0,19 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 0,202; p = 0,893
38	<i>Lb. fermentum</i> ATCC 9338	2,11 ± 0,09 <sup>a</sup>	2,13 ± 0,02 <sup>a</sup>	2,09 ± 0,07 <sup>a</sup>	2,17 ± 0,08 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 0,633; p = 0,608
71	<i>Lb. fermentum</i> ATCC 23271	2,89 ± 0,44 <sup>a</sup>	3,10 ± 0,51 <sup>a</sup>	3,21 ± 0,45 <sup>a</sup>	3,16 ± 0,51 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 0,122; p = 0,945
46	<i>Lb. helveticus</i> ATCC 12046	1,91 ± 0,55 <sup>a</sup>	1,87 ± 0,59 <sup>a</sup>	1,96 ± 0,60 <sup>a</sup>	2,01 ± 0,56 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 0,043; p = 0,987
L5	<i>Lb. acidophilus</i> LA-5® (comercial)	1,96 ± 0,04 <sup>a</sup>	1,96 ± 0,04 <sup>a</sup>	1,96 ± 0,02 <sup>a</sup>	1,92 ± 0,05 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 1,249; p = 0,335
SB	<i>Lb. acidophilus</i> 74-2 (comercial)	1,89 ± 0,15 <sup>a</sup>	1,81 ± 0,14 <sup>a</sup>	1,60 ± 0,21 <sup>a</sup>	1,82 ± 0,11 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 2,620; p = 0,099
97	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 4797	2,00 ± 0,02 <sup>a</sup>	2,14 ± 0,16 <sup>a</sup>	1,98 ± 0,06 <sup>a</sup>	1,97 ± 0,10 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 2,609; p = 0,100
44	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> CCT 3744	1,89 ± 0,37 <sup>a</sup>	1,92 ± 0,30 <sup>a</sup>	1,78 ± 0,42 <sup>a</sup>	1,85 ± 0,24 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 0,118; p = 0,948
66	<i>Streptococcus thermophilus</i> ST 066 (comercial)	1,84 ± 0,07 <sup>a</sup>	1,83 ± 0,12 <sup>a</sup>	1,16 ± 0,21 <sup>b</sup>	0,69 ± 0,18 <sup>c</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 50,119; p < 0,0001
ST	<i>Streptococcus thermophilus</i> Yo-Mix™ (comercial)	2,08 ± 0,15 <sup>a</sup>	2,04 ± 0,12 <sup>a</sup>	1,99 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,96 ± 0,07 <sup>a</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 0,968; p = 0,440
AS	<i>Streptococcus thermophilus</i> TH-4® (comercial)	2,11 ± 0,02 <sup>a</sup>	2,08 ± 0,06 <sup>a</sup>	1,97 ± 0,03 <sup>ab</sup>	1,87 ± 0,17 <sup>b</sup>	F <sub>(3, 12)</sub> = 5,613; p = 0,012