

DRIENE GOMES GONZAGA

**IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E POTENCIAL APLICAÇÃO
TECNOLÓGICA DE BACTÉRIAS LÁTICAS PREDOMINANTES NO LEITE HUMANO EM
DIFERENTES FASES DA LACTAÇÃO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

G642i
2017
Gonzaga, Driene Gomes, 1987-
Identificação, caracterização fenotípica e potencial
aplicação tecnológica de bactérias lácticas predominantes no leite
humano em diferentes fases da lactação / Driene Gomes
Gonzaga. – Viçosa, MG, 2017.
xiii, 107f. : il. ; 29 cm.

Inclui anexo.

Inclui apêndices.

Orientador: Célia Lúcia de Lucas Fortes Ferreira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Bactérias lácticas. 2. Probióticos. 3. Leite humano.
4. Microbiota. 5. Liofilização. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Tecnologia de Alimentos. Programa de
Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. II. Título.

CDD 22 ed. 579.37

DRIENE GOMES GONZAGA

**IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E POTENCIAL APLICAÇÃO
TECNOLÓGICA DE BACTÉRIAS LÁTICAS PREDOMINANTES NO LEITE
HUMANO EM DIFERENTES FASES DA LACTAÇÃO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 08 de agosto de 2017.

Poliane Alfenas Zerbini
(Coorientadora)

Monique Renon Eller
(Coorientadora)

José Guilherme Prado Martin

Cláudio Furtado Soares

Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira
(Orientadora)

Ao meu padrinho Arnaldo Gomes da Cunha que além de muito amor me ofereceu as melhores oportunidades e um bem que ninguém jamais irá tirar de mim.

Dedico

AGRADECIMENTOS

“Agradecer é admitir que houve um momento em que se precisou de alguém; é reconhecer que o homem jamais poderá lograr para si o dom de ser autossuficiente. Ninguém e nada cresce sozinho, sempre é preciso um olhar de apoio, uma palavra de incentivo, um gesto de compreensão, uma atitude de amor.” (Autor Desconhecido).

A árdua jornada da pós graduação nos obriga a ser adulto quando não queremos e parecer criança porque precisamos. Sem sombra de dúvidas, o agradecimento mais digno e justo é a Deus. Foi Ele que me preparou para todos esses momentos desde o início. E foi Ele também que não me deixou sucumbir nas horas mais difíceis.

Para percorrer esse caminho tive uma base de sustentação muito sólida chamada FAMÍLIA, que andou ao meu lado a todo tempo e me apoiou em todas as decisões que tomei. São infinitamente mais doutores que eu: a minha mãe Terezinha, meu padrinho Arnaldo, meu companheiro Aurélio, meus irmãos Wérlon, Andreza e Brienda, meus sobrinhos, Daniel, Ana Lídia e João Pedro e também meus cunhados e sogra. Eles, juntamente com meus tios, tias, primos e primas, sempre trouxeram a mim o conforto de ser amada e a leveza de ser alegre em todos os momentos, até mesmo nos mais complicados. Durante esses quatro anos, duas estrelinhas foram brilhar no céu e deixou um imenso vazio aqui no peito. Tio Jésus e Lê, sei que estão daí sorrindo e vibrando comigo! Obrigada por tudo!

Por todos lados que fui sempre tive oportunidade de fazer grandes AMIGOS que andaram de braços dados comigo dividindo bons e maus momentos. Esses irmãos que escolhi também fazem parte dessa conquista. Não importa a distância, os verdadeiros sempre se fizeram presentes.

Existem também, aqueles que aparecem na minha trajetória enviados por Deus para contribuir com o que sabiam e facilitar a minha vida. Destaco aqui todas aquelas pessoas que dedicaram a mim pelo menos um tempinho seja para me ajudar com análises ou simplesmente para tomar uma café e trocar ideias e risadas: os colegas do Laboratório de Microbiologia Industrial (Fernanda, Fernandinha, Flávia, Juliana, Patrícia, Rafael e Renan), os do Laboratório de Fisiologia de Micro-organismos

(Fernando, Nívia e Raquel), os do Laboratório de Micorrizas (Alan, Camila, Prof. Catarina, Manu, Marliane, Paulo e Tomás), os do Laboratório de Microbiologia de Alimentos (Dayse, Felipe, Léo, Mayara e Ramila), meus estagiários queridos (Amanda, Gabi, Jéssica, Joyce, Lucão e Zequinha), minhas parceiras de trabalho (Érika, Michele, Naomi e Vivi) e Célio, nosso técnico, meus companheiros de doutorado e de baladas (Adeline, Kéllen, Jefinho e Marcela) e todos aqueles contatos que fiz de laboratório em laboratório. Sem sombra de dúvidas foram essas pessoas que trouxeram mais entusiasmo para meu dia a dia.

Tenho muita satisfação em agradecer minha coorientadora Poliane por toda ajuda e incentivo nos momentos em que parecia que eu estava caminhando em uma areia movediça. Aos professores Leandro Licursi, Sylvia Franceschini, Cláudia Pinto, José Guilherme Martin, Monique Eller e Cláudio Furtado que prontamente participaram de bancas e deram valiosas sugestões e a minha orientadora Célia Ferreira, que dividiu comigo a riqueza de uma vida inteira dedicada à academia.

Agradeço também as agências de fomento (Capes, Fapemig e CNPq) pela concessão de bolsa e custeio de projetos, bem como todos os professores e funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos e Bioagro pela boa convivência diária e a Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade.

A todos o meu MUITO OBRIGADA!

*“Hoje me sinto mais forte
Mais feliz, quem sabe
Só levo a certeza
De que muito pouco sei
Ou nada sei”*

(Almir Sater e Renato Teixeira)

BIOGRAFIA

DRIENE GOMES GONZAGA, filha de Wics Luiz Gonzaga e Terezinha Augusta Gomes Gonzaga, nascida em 05 de julho de 1987 na cidade de João Monlevade-MG. Iniciou seus estudos em nível superior com a graduação em Nutrição na Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri na cidade de Diamantina-MG no ano de 2006. O título de Bacharel em Nutrição foi obtido em julho de 2010. No ano de 2011, na cidade de Lavras-MG iniciou o mestrado em Ciência dos Alimentos na Universidade Federal de Lavras onde obteve o título de Mestre em Ciências dos Alimentos em 2013. Nesse mesmo ano iniciou o doutorado no Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa em Viçosa-MG.

RESUMO

GONZAGA, Driene Gomes, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2017. **Identificação, caracterização fenotípica e potencial aplicação tecnológica de bactérias lácticas predominantes no leite humano em diferentes fases da lactação.** Orientadora: Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira. Coorientadoras: Poliane Alfenas Zerbini e Monique Renon Eller.

O leite humano (LH) tem a função de fornecer nutrientes e outras substâncias responsáveis pela defesa do organismo contra ameaças externas nos primeiros meses de vida. A sua microbiota tem sido estudada e durante um tempo acreditou-se que os micro-organismos a presença de micro-organismos nessa matriz fosse consequência da contaminação devido a manipulação inadequada. Posteriormente, admitiu-se que os micro-organismos fazem parte da composição natural do leite e que desempenham várias funções no organismo. Por diversos motivos, alguns recém-nascidos não podem consumir o leite produzido pelas próprias mães e a alternativa é o leite depositado em bancos de leite. Para eliminar micro-organismos patogênicos, o leite recebido nos bancos é pasteurizado, com isso também são eliminadas bactérias benéficas. O presente estudo teve como objetivo identificar, caracterizar fenotipicamente e selecionar bactérias com potencial para uso em bancos de leite humano. Foram coletadas amostras de leite de 11 voluntárias em cinco períodos da lactação (5, 15, 30, 60 e 90 dias após o parto) e a partir delas, isoladas colônias crescidas em meios de cultura específicos. Para agrupar os micro-organismos, extraiu-se o DNA total de cada amostra e realizou-se REP-PCR. Um representante de cada grupo foi identificado. Para os testes fenotípicos, as estirpes anteriormente identificadas foram avaliadas quanto a aspectos de segurança, como capacidade de produção da hemolisina, atividade da enzima gelatinase, susceptibilidade a antibióticos e verificação da forma isomérica do ácido láctico produzido. A funcionalidade foi verificada por meio de teste de resistência ao suco gástrico e a sais biliares e antagonismo a patógenos indicadores. As culturas foram liofilizadas e novamente avaliadas. Após a formação de 74 grupos, foram identificadas duas espécies: *Enterococcus faecalis* (presentes em todas as fases da lactação) e *Lactobacillus fermentum* (presente no leite maduro de duas mães). Todas as estirpes resistiram ao processo de liofilização e foram classificadas como não β -hemolíticas, gelatinase

negativas, resistentes ao suco gástrico e a sais biliares e com capacidade de antagonizar patógenos. Nenhum isolado foi sensível a todos antibióticos testados, porém, a sensibilidade de alguns aumentou após a secagem. Todos produziram ácido láctico nas duas forma isoméricas. O isolado identificado com *E. faecalis* com a numeração 106 produziu L(+)-ácido láctico em maior proporção independentemente de ser liofilizado ou não. Com os resultados obtidos não é possível indicar nenhuma das estirpes estudadas para uso imediato. O entendimento do real papel dessas bactérias no leite humano é necessário para que esses isolados possam ser considerados probióticos e possam ser reincorporados ao leite de BLH.

ABSTRACT

GONZAGA, Driene Gomes, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2017. **Identification, phenotypical characterization and potential technological application of predominant lactic bacteria in human milk in diferente stages of lactation.** Adviser: Célia Lúcia de Lucas Fortes Ferreira. Co-advisers: Poliane Alfenas Zerbini and Monique Renon Eller.

Human milk (HM) has the function of providing nutrients and other substances responsible for defending the body against external threats in the first months of life. Their microbiota has been studied and for a while it was believed that the microorganisms the presence of microorganisms in this matrix was a consequence of contamination due to improper handling. Subsequently, it was recognized that microorganisms form part of the natural composition of milk and perform functions in the body. For various reasons, some newborns can not consume the milk produced by the mothers themselves and the alternative is milk deposited in milk banks (HMB). To eliminate pathogenic microorganisms, the milk received at the banks is pasteurized, thereby also eliminating beneficial bacteria. The present study aimed to identify, characterize phenotypically and select bacteria with potential for use in HMB. Milk samples were collected from 11 volunteers in five lactation periods (5, 15, 30, 60 and 90 days postpartum) and from them isolated colonies grown in specific culture media. To group the microorganisms, the total DNA was extracted from each sample and REP-PCR was performed. One representative from each group was identified. For the phenotypic tests, the previously identified strains were evaluated for safety aspects such as hemolysin production capacity, activity of the enzyme gelatinase, susceptibility to antibiotics and verification of the isomeric form of lactic acid produced. The functionality was verified through resistance test to gastric juice and to bile salts and antagonism to indicator pathogens. The cultures were lyophilized and retested. After the formation of 74 groups, two species were identified: *Enterococcus faecalis* (present in all stages of lactation) and *Lactobacillus fermentum* (present in mature milk of two mothers). All strains resisted the lyophilization process and were classified as non- β -hemolytic, gelatinase negative, resistant to gastric juice and bile salts and capable of antagonizing pathogens. No isolates were sensitive to all antibiotics tested, however, the sensitivity of some increased after drying. All produced lactic acid in the two

isomeric forms. The isolate identified with *E. faecalis* with the number 106 produced L(+)- lactic acid to a greater extent regardless of whether it is lyophilized or not. With the results obtained, it is not possible to indicate any of the strains studied for immediate use. Understanding the true role of these bacteria in human milk is necessary so that these isolates can be considered as probiotics and can be reincorporated into BLH milk.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	14
2	HIPÓTESES	16
3	REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1	Colonização microbiana do TGI	17
3.2	Dinâmica das populações microbianas no TGI humano	18
3.3	Leite humano	20
3.4	Microbiota do leite humano	22
3.5	Bancos de leite humano	29
3.5.1	Características de segurança, funcionais e tecnológicas de bactérias probióticas	29
4	OBJETIVOS	32
4.1	Geral	32
4.2	Específicos	32
5	MATERIAIS E MÉTODOS	33
5.1	Ativação dos isolados	33
5.2	Testes morfofisiológicos	34
5.3	Identificação genética	34
5.3.1	Extração do DNA genômico	34
5.3.2	REP-PCR	35
5.3.3	Amplificação do gene 16S rDNA	35
5.4	Teste tecnológico – Liofilização	36
5.5	Testes de segurança	37
5.5.1	Avaliação da capacidade de produção de hemolisina	37
5.5.2	Avaliação de atividade de gelatinase	37
5.5.3	Susceptibilidade a antibióticos	38
5.5.4	Forma isomérica do ácido láctico	38
5.6	Testes de funcionalidade	39
5.6.1	Teste de resistência ao suco gástrico	39
5.6.2	Teste de resistência a sais biliares	40
5.6.3	Antagonismo em relação a patógenos indicadores	40

5.7	Análises estatísticas	40
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
	ARTIGO 1: BACTÉRIAS LÁTICAS CULTIVÁVEIS PREDOMINANTES NO LEITE HUMANO EM DIFERENTES FASES DA LACTAÇÃO	51
	RESUMO	53
	ABSTRACT	54
1	INTRODUÇÃO	55
2	MATERIAIS E MÉTODOS	58
2.1	Coleta de amostras e isolamento dos micro-organismos	58
2.2	Extração do DNA genômico	59
2.3	Agrupamento dos isolados por meio de REP-PCR	59
2.4	Amplificação e sequenciamento do gene 16S rDNA	60
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
4	CONCLUSÃO	66
	REFERÊNCIAS BIBLOGRÁFICAS	67
	ARTIGO 2: SELEÇÃO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DO LEITE HUMANO COM POTENCIAL PARA USO EM BANCOS DE LEITE	72
	RESUMO	74
	ABSTRACT	75
1	INTRODUÇÃO	76
2	MATERIAIS E MÉTODOS	78
2.1	Origem dos micro-organismos	78
2.2	Teste tecnológico – Liofilização	79
2.3	Testes de segurança	79
2.3.1	Avaliação da capacidade de produção de hemolisina	79
2.3.2	Avaliação de atividade de gelatinase	80
2.3.3	Susceptibilidade a antibióticos	80
2.3.4	Forma isomérica do ácido láctico	81
2.4	Testes de funcionalidade	81

2.4.1	Resistência ao suco gástrico	82
2.4.2	Resistência a sais biliares	82
2.4.3	Antagonismo em relação a patógenos indicadores	82
2.5	Análises estatísticas	83
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	84
3.1	Liofilização	84
3.2	Testes de segurança	85
3.3	Testes de funcionalidade	91
4	CONCLUSÃO	94
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
	MATERIAL SUPLEMENTAR	103
	CONCLUSÃO GERAL	106
	ANEXO A - Parecer do comitê de ética em pesquisa	107
	APENDICE 1 – Histograma de agrupamento de bactérias isoladas do leite humano em diferentes fases da lactação por meio de REP-PCR	109
	APENDICE 2 – Agrupamento de bactérias isoladas do leite humano em diferentes fases da lactação com 97% de similaridade	114
	APENDICE 3 – Sequencias representativas da OTU do agrupamento de bactérias isoladas do leite humano em diferentes fases da lactação com 97% de similaridade	115
	APENDICE 4 – Identificação, nomenclatura na Coleção de Culturas da Universidade Federal de Viçosa, origem e Assession number das bactérias isoladas do leite humano em diferentes fases da lactação	118

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Leite humano (LH) é um fluido corporal de grande importância para a sobrevivência do recém-nascido (RN). A ele é atribuída a função de fornecer os nutrientes necessários para o crescimento e desenvolvimento do bebê e também outras substâncias responsáveis pela defesa do organismo contra ameaças externas (BRANDTZAEG, 2007; KRAMER; KAKUMA, 2002). A composição do LH varia de acordo com as necessidades do RN e pode ser diferenciada em três fases: o colostro, o leite de transição e o leite maduro (BALLARD; MORROW, 2013; MARTINS; TUMA; FALCÃO, 2003). As alterações observadas no processo de colonização da microbiota intestinal, tão importante para a saúde do neonato, estão relacionadas às modificações na composição que ocorrem durante essas fases da lactação.

Como um órgão ativo, a microbiota intestinal apresenta modificações em cada fase da vida (GRZEŚKOWIAK et al., 2012; PALMER et al., 2007; ZWIELEHNER et al., 2009). O processo de colonização do trato gastro intestinal (TGI) humano inicia-se no nascimento e a partir desse momento diversas alterações são observadas (MATAMOROS et al., 2013). O favorecimento do desenvolvimento de espécies de bactérias benéficas garante proteção ao indivíduo ao longo da vida (DE LA COCHETIÈRE et al., 2008; SAVINO; LIGUORI; LUPICA, 2010)

Uma constatação comum em alguns estudos é de que nos primeiros dias de vida o intestino do RN apresenta diversidade microbiológica muito baixa, principalmente de espécies anaeróbias (ROUDIÈRE et al., 2009; SCHWIERTZ et al., 2003). Após determinado tempo, a microbiota estabelece uma relação mútua com o hospedeiro e atinge a estabilidade com pequenas variações (PALMER et al., 2007; VANHOUTTE et al., 2004). Inicialmente acreditava-se que o LH era um fluido estéril e que só depois de ordenhado tornava-se substrato para alguns tipos de bactérias com potencial patogênico como as dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus* (WEST; HEWITT; MURPHY, 1979). Posteriormente admitiu-se que esses micro-organismos poderiam fazer parte da composição natural do LH (HEIKKILÄ; SARIS, 2003; NOVAK et al., 2001).

Devido a fatores como baixa produção láctea e enfermidades que acometem as mães, nem sempre é possível que a amamentação seja realizada (GARTNER et al., 2005). As alternativas são o uso de fórmulas infantis que tentam substituir o leite materno ou o uso de leite proveniente de mães doadoras. Os bancos de leite humano

(BLH) são instituições responsáveis pela coleta, processamento, estocagem e distribuição do leite para os RNs que por algum motivo não podem receber aleitamento materno direto (ANVISA, 2008). Nesses locais, o leite recebido é pasteurizado para que bactérias patogênicas sejam eliminadas e não ofereçam risco a quem os consome. Essa etapa é de extrema importância para evitar riscos à saúde dos RNs, principalmente aqueles com maior vulnerabilidade, porém, esse processo também elimina as bactérias que poderiam causar benefícios ao TGI (BRASIL, 2006).

A constante reafirmação da relevância da composição da microbiota intestinal impulsiona a realização de novas pesquisas. Uma alternativa inovadora é a seleção de bactérias que possam ser incorporadas ao leite já pasteurizado. Esses micro-organismos devem ser seguros do ponto de vista microbiológico, ou seja, não podem apresentar nenhuma característica de potencial patogênico. Devem apresentar propriedades funcionais, causando a melhora do estado de saúde do indivíduo, e ainda serem tecnologicamente viáveis para que possam ser incorporados novamente na matriz láctea (SAARELA et al., 2000). Nesse caso, a liofilização tem se apresentado como a técnica mais eficiente para preservação e veiculação desses micro-organismos (VINDEROLA et al., 2012).

Reconhecida a necessidade de estudos voltados para a resolução dos problemas apresentados, o presente trabalho teve como objetivo identificar, caracterizar e selecionar bactérias lácticas predominantes no LH em diferentes fases da lactação visando o seu potencial para uso em BLH.

2 HIPÓTESES

1 - O leite humano é fonte de bactérias lácticas que varia de acordo com a fase da lactação.

2 – Bactérias lácticas isoladas do leite humano possuem características funcionais.

3 – Bactérias lácticas isoladas do leite humano são seguras para consumo.

4 – Bactérias lácticas isoladas de leite humano apresentam características tecnológicas que indicam que elas podem servir de fonte de suplementação para banco de leite.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Colonização microbiana do TGI

Vários estudos têm investigado sobre a origem das bactérias presentes no TGI do RN. Alguns autores acreditam que a composição da microbiota intestinal do bebê é resultado da ingestão de micro-organismos presentes na pele da mãe adquiridos durante cada mamada, enquanto outros defendem a existência de uma via que carrega espécies microbianas pertencentes à microbiota materna diretamente para o leite (GUEIMONDE et al., 2007; HUNT et al., 2011). A segunda hipótese ganha relevância visto que estudos detectaram diferenças entre os genótipos das bactérias presentes na pele da mãe daquelas encontradas nas fezes dos bebês (GUEIMONDE et al., 2007; HUNT et al., 2011; MARTÍN et al., 2003, 2009). Entretanto, a via pela qual esses micro-organismos atravessam o epitélio intestinal até atingir a glândula mamária não foi completamente elucidada, porém avanços científicos tem sido obtidos (MARTÍN et al., 2004).

Três potenciais mecanismos do estabelecimento do microbioma do leite humano são considerados. Em todos eles acredita-se que alterações fisiológicas que ocorrem na mãe durante e depois da gravidez podem facilitar a migração das bactérias para a glândula mamária: (1) As alterações hormonais que ocorrem nesse período podem ter uma influência sobre a permeabilidade do intestino, o que poderia facilitar a absorção bacteriana; (2) Através do fluxo retrógrado, a microbiota da pele da mãe e a microbiota bucal do bebê podem contribuir para o estabelecimento do microbioma do leite humano; (3) As bactérias do trato intestinal materno podem ser absorvidas pelas diferentes células imunitárias. A migração maciça de células imunes para as glândulas mamárias poderia proporcionar outra possível rota e alterar esse microbioma (JEURINK et al., 2013).

O terceiro mecanismo proposto envolve a utilização de células dendríticas como facilitadores do transporte de micro-organismos. Em tese, as células dendríticas são capazes de infiltrar-se entre as junções do epitélio sem o agredir. Uma vez associadas a essas células, as bactérias poderiam circular em outros locais (RESCIGNO et al., 2001). Essa teoria é endossada pela detecção de espécies de mesma identidade genética no leite e em amostras de sangue periférico materno (PEREZ et al., 2007). A associação de estudos levaram a crer na teoria de que as

células são transportadas para a glândula mamária no interior de células mononucleares (LANGA et al., 2012; RESCIGNO et al., 1998, 2001). Um estudo que considerou a carga bacteriana do LH juntamente com micronutrientes e células humanas, concluiu que a ingestão da microbiota do leite não é reconhecida pelo sistema imune do bebê como uma infecção e que as respostas imunes são direcionadas a micro-organismos específicos (BOIX-AMORÓS; COLLADO; MIRA, 2016).

A presença de bactérias no intestino e no leite materno indica que a capacidade de bactérias circularem a partir do intestino é subestimada (FERNÁNDEZ et al., 2013). A própria fisiologia da lactação contribui para a explicação da existência de bactérias na microbiota endógena do LH. Durante a preparação para a amamentação, uma série de alterações hormonais promovem o aumento dos ductos mamários, alvéolos e glândulas sebáceas e maior circulação linfática. Ademais, a liberação de oxitocina provoca a contração das células mioepiteliais o que pode facilitar o transporte de bactérias (BEISCHER; MACKAY; COLDITZ, 1997).

3.2 Dinâmica das populações microbianas no TGI humano

Estudos revelam que o conjunto de micro-organismos que habitam o intestino é único para cada ser humano, análogo a uma impressão digital (ALBESHARAT et al., 2011; FAVIER et al., 2002; PALMER et al., 2007). Além disso, há evidências de que um desequilíbrio no ecossistema microbiano tem forte influência na saúde humana (BLAUT; CLAVEL, 2007; DE LA COCHETIÈRE et al., 2008; TURNBAUGH et al., 2006)

Como um órgão ativo, a microbiota intestinal apresenta modificações em cada fase da vida. Essas alterações ocorrem não somente pelas mudanças das necessidades biológicas mas também devido a processos de saúde e doença (GRZEŚKOWIAK et al., 2012; PALMER et al., 2007; ZWIELEHNER et al., 2009). A utilização de pré e probióticos, assim como o uso mais racional de antibióticos, podem ser otimizados a partir da geração de conhecimento sobre o ambiente em questão. Além de considerar características genéticas dos pacientes, é possível considerar esquemas personalizados de prevenção e tratamento de doenças (PREIDIS; VERSALOVIC, 2009). É importante entender como ocorre a sucessão microbiana nos indivíduos para planejar possíveis intervenções que terão alvos específicos.

O processo de colonização do TGI humano começa a acontecer no nascimento e a partir desse momento diversas alterações são observadas. Crianças nascidas por parto normal apresentam microbiota com perfil diferente daquelas que nasceram por meio de cirurgia cesariana. A diferenciação também ocorre quando consideram-se bebês nascidos a termo ou prematuros, bem como aqueles que alimentam-se exclusivamente de leite materno ou fazem uso de fórmulas infantis ou outros alimentos (FANARO et al., 2003; MATAMOROS et al., 2013).

Os fatores que influenciam a composição da microbiota do TGI não limitam-se apenas a esses citados. Outros aspectos fisiológicos podem ser determinantes no processo de colonização, como o amadurecimento do processo de peristalse, o ambiente superficial do epitélio, a intensidade da secreção de muco, as condições de permeabilidade intestinal, a frequência do acontecimento do processo de translocação bacteriana, o estado do sistema imune da mucosa intestinal, dentre outros (DE LA COCHETIERE et al., 2007).

Muito se discute sobre a existência de bactérias no intestino do feto durante a vida intra uterina, porém não há um consenso (MACKIE; SGHIR; GASKINS, 1999; MATAMOROS et al., 2013; PENDERS et al., 2006). Bactérias isoladas do cordão umbilical e do líquido amniótico sustentam a hipótese de que possivelmente ocorre uma translocação bacteriana da mãe para o feto (DIGIULIO et al., 2008; JIMÉNEZ et al., 2005). Por outro lado, bactérias encontradas no mecônio, que são as primeiras fezes dos bebês, têm origem da vagina ou pele materna (JIMÉNEZ et al., 2008a; MADAN et al., 2012).

Inicialmente, o TGI dos RNs é colonizado por micro-organismos anaeróbios facultativos pertencentes à família das *Enterobacteriaceae* que consomem o oxigênio disponível no ambiente e liberam gás carbônico. Após a ocorrência da modificação na atmosfera, tem-se então um ambiente propício para o estabelecimento de espécies anaeróbias estritas, como *Bifidobacterium*, *Clostridium* e *Bacteroides* (JIMÉNEZ et al., 2008a). Nos primeiros dias de vida o intestino do RN possui diversidade microbiológica muito baixa, principalmente de espécies anaeróbias (ROUDIÈRE et al., 2009; SCHWIERTZ et al., 2003). Após determinado tempo os micro-organismos estabelecem relação mútua com o hospedeiro e atinge a estabilidade (PALMER et al., 2007; VANHOUTTE et al., 2004).

Na idade adulta, a composição da microbiota difere-se muito entre os indivíduos, porém é possível observar a predominância de alguns grupos microbianos.

A maior parte das bactérias é pertencente aos filos *Firmicutes* ou *Bacteroidetes*, seguidos de *Proteobacteria* e *Actinobacteria* (ECKBURG, 2005; WANG et al., 2007). Os *Lactobacillus plantarum* foi apontado como um micro-organismo-chave, presente na imensa maioria dos indivíduos estudados (ALBESHARAT et al., 2011). É possível que exista um grupo de micro-organismos que está persistente entre a população de forma geral e este possui papel chave na manutenção do equilíbrio da microbiota intestinal (O'TOOLE; CLAEISSON, 2010).

O envelhecimento traz consigo uma série de mudanças fisiológicas que impactam diretamente na alimentação e nutrição do indivíduo, conseqüentemente, a disponibilidade de substratos para a microbiota intestinal também estará sujeita a mudanças (WOODMANSEY et al., 2004). Ao envelhecer, o indivíduo perde gradativamente a capacidade de reverter situações de stress metabólico aumentando significativamente o número de episódios pro-inflamatórios (SALMINEN et al., 2008). Os estudos sobre as alterações na microbiota de indivíduos adultos e idosos não são conclusivos, já que os mesmos foram desenvolvidos utilizando-se técnicas diferentes, o que dificulta a comparação entre eles. Adicionalmente, é delicado comparar indivíduos com histórico de saúde e doença distintos.

3.3 Leite humano

O leite humano é um líquido biológico complexo responsável pela nutrição e fornecimento de compostos bioativos importantes para o crescimento e desenvolvimento do RN. Recomenda-se que este seja o único alimento fornecido ao bebê até que o mesmo atinja os seis meses de idade e que ele seja ofertado de forma complementar a outros alimentos até o primeiro ou segundo ano de vida do indivíduo (KRAMER; KAKUMA, 2002; WORK GROUP ON BREASTFEEDING, 1997).

Cerca de 40 a 55% do valor energético do LH advém de matrizes lipídicas representadas por triacilgliceróis (98%) e também por diacilgliceróis, monoacilgliceróis, ácidos graxos livres e colesterol (KOLETZKO et al., 2001). Além de ser a principal fonte de energia para os RNs, os lipídeos presentes no LH são importantes para a manutenção e amadurecimento do sistema nervoso, especialmente em bebês nascidos com baixo peso. Observa-se também um efeito protetivo do leite para as mucosas contra infecções (ISAACS; LITOV; THORMAR, 1995; TANAKA et al., 2013).

As proteínas presentes no LH têm como principal papel o fornecimento de aminoácidos, que são de suma importância para o crescimento dos bebês. Basicamente, as proteínas do LH são divididas em caseínas, proteínas do soro do leite e mucinas. Em maior abundância as caseínas são as que mais variam entre os períodos de lactação (LÖNNERDAL, 2003). Algumas frações proteicas como grelina, leptina e adiponectina, possuem funções hormonais de grande importância, já que são responsáveis pela regulação do apetite, balanço energético e diferenciação celular. A presença desses componentes podem ser determinantes na regulação do crescimento e desenvolvimento do RN e também em desfechos metabólicos da vida adulta (SAVINO; LIGUORI; LUPICA, 2010).

Os carboidratos representam outra fração importante entre os componentes do LH, eles estão relacionados ao fornecimento de energia. Uma variedade deles estão disponíveis, porém a lactose é o encontrado em maior abundância. Acredita-se que ela desempenha papel crucial na saúde do TGI do RN, pois o seu metabolismo proporciona a acidificação do meio, o que favorece a absorção de cálcio e dificulta a proliferação de micro-organismos patogênicos (CALIL; LEONE; RAMOS, 1992; GARZA et al., 1987). Assim como a lactose, as centenas de formas de oligossacarídeos presentes no LH desempenham funções relevantes para a saúde intestinal do bebê. Considerados como prebióticos, eles favorecem a microbiota benéfica e protegem o epitélio intestinal (GERMAN et al., 2008; WARD et al., 2006).

A riqueza de micronutrientes e fatores protetores para o RN, torna o LH um fluido ainda mais especial. Moléculas nitrogenadas não proteicas como a ureia, a creatinina, nucleotídeos, aminoácidos livres e peptídeos podem alterar atividades enzimáticas, modificar o perfil da microbiota e função imune, bem como participar da maturação e reparação do TGI do bebê (GUTIÉRREZ-CASTRELLÓN et al., 2007; SINGHAL et al., 2008; UAUY; QUAN; GIL, 1994).

A presença de anticorpos carregados pelo leite materno representa a proteção primária contra agentes patogênicos no RN (BRANDTZAEG, 2007). Até que o organismo do RN seja capaz de produzir suas próprias imunoglobulinas o fornecimento das mesmas acontece via aleitamento. À medida que o organismo do bebê torna-se capaz de produzir suas próprias substâncias imunológicas é possível notar que a quantidade de anticorpos presentes no leite diminuem (LAWRENCE; LAWRENCE, 2004).

3.4 Microbiota do leite humano

A reunião de diversos estudos possibilitou a visualização da evolução cronológica do pensamento científico sobre os micro-organismos presentes no leite humano. Inicialmente, a presença de determinadas espécies como as dos gêneros *Enterococcus* e *Staphylococcus* era considerada contaminação, muito provavelmente, consequência da manipulação inadequada. Com o passar do tempo, considerou-se a possibilidade de algumas espécies microbianas fazerem parte da composição natural do leite. Estudos mais recentes tendem a considerar essa presença como funcional a até mesmo imprescindível para o amadurecimento do TGI.

Nota-se que a incorporação de novas técnicas tornaram possíveis a identificação de espécies anteriormente não consideradas. A diversidade das tecnologias no entanto, dificulta a comparação dos dados disponíveis.

No Quadro 1 estão sumarizados estudos sobre a microbiota do leite humano em ordem cronológica. Foram destacados os objetivos e conclusões de cada trabalho bem como o tipo de parto ocorrido e a fase da lactação em que a matéria prima analisada foi coletada.

QUADRO 1 – Estudos relacionados a microbiota do leite humano organizados em ordem cronológica.

Ref. Ano Sujeitos	Tipo de Parto Fase da lactação	Grupos microbianos e/ou espécies	Objetivo	Conclusão
1 1979 n=21	Dados não descritos	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , gênero <i>Streptococcus</i>	Investigar bacteriologicamente a coleta de leite por doadoras e seu posterior armazenamento para uso em banco de leite.	Observações preliminares indicam que um teste de resazurina tendo apenas 2 horas, não deve ser utilizado para o controle de qualidade bacteriológica do leite humano. Na indústria de laticínios, o fracasso dos testes de redução de corantes para detectar leites com números moderados de potenciais agentes patogênicos tem sido documentada e este parece ocorrer com leite humano também
2 2003 n=40	Parto não descrito Leite Maduro	Entre parênteses, a ocorrência nas amostras <i>Staphylococcus aureus</i> (5), <i>Staphylococcus capitis</i> (8), <i>Staphylococcus epidermidis</i> (39), <i>Staphylococcus hominis</i> (11), <i>Staphylococcus lugdunensis</i> (2), <i>Staphylococcus sp.</i> (19), <i>Streptococcus agalactiae</i> (1), <i>Streptococcus mitis</i> (11), <i>Streptococcus orais</i> (1), <i>Streptococcus parasanguis</i> (5), <i>Streptococcus peroris</i> (3), <i>Streptococcus salivarius</i> (18), <i>Streptococcus sp.</i> (9), <i>Lactobacillus rhamnosus</i> (2), <i>L. cripatus</i> (1), <i>L. lactis</i> (1), <i>Lactococcus lactis</i> (1), <i>Leuconostoc mesenteroides</i> (1), <i>Enterococcus faecalis</i> (3), <i>Enterococcus sp.</i> (1), <i>Actinomyces odontolyticus</i> (1), <i>Rothia mucilaginosa</i> (1).	Explorar a composição bacteriana comensal do leite materno com ênfase naquelas com atividade antimicrobiana contra <i>Staphylococcus aureus</i> .	Uma criança que consome cerca de 800 mL de leite materno por dia irá ingerir cerca de 8×10^4 e 8×10^6 bactérias comensais ao mamar. As bactérias comensais de leite materno podem ter um papel na prevenção do crescimento de organismos patogênicos.
3 2003 n=16 (8+8)	Parto Normal e Cirúrgico Colostro	<i>Enterococcus faecium</i> , <i>Lactobacillus gasseri</i>	Investigar a presença de bactérias de ácido láctico no leite materno de mulheres saudáveis, que podem afetar a composição qualitativa e quantitativa da microflora intestinal neonato.	O aleitamento pode ser uma fonte significativa de bactérias do ácido láctico para o intestino infantil. Bactérias do ácido láctico presentes no leite podem ter uma origem endógena e pode não ser o resultado da contaminação da pele da mama circundante.

Ref. Ano Sujeitos	Tipo de Parto Fase da lactação	Grupos microbianos e/ou espécies	Objetivo	Conclusão
4 2007 n=10 (5+5)	Parto Normal e Cirúrgico Colostro	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus hominis</i> , <i>Streptococcus salivarius</i> , <i>Streptococcus mitis</i> , <i>Streptococcus parasanguis</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Streptococcus spp.</i> , <i>Leuconostoc citreum</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Weissella cibaria</i> , <i>Weissella confusa</i> , <i>Propionibacterium acnes</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Serratia rosteomaculans</i> , <i>Acinetobacter spp.</i> , <i>Veillonella sp.</i> , <i>Gemella haemolysans</i> , <i>Pseudomonas synxantha</i>	Avaliar as bactérias dominantes existentes no leite materno de mulheres saudáveis e o papel potencial do trânsito através da vagina na aquisição da microbiota do leite materno	Padrões de PCR-DGGE e bibliotecas de clones sugerem que cada mulher tenha um padrão bacteriano específico no seu leite, e confirmam, a nível molecular, que o leite de mulheres saudáveis é uma fonte de bactérias comensais para o intestino infantil. Reforça-se que estudos moleculares recentes que demonstraram que a colonização de bactérias do ácido láctico não é significativamente relacionada com o tipo de parto.
5 2007 n=20	Parto não descrito Leite Maduro	<i>Bifidobacterium longum</i> , <i>B. animalis</i> , <i>B. difidum</i> , <i>B. catenulatum</i>	Avaliar por meio de técnicas moleculares se o leite humano contém bifidobactérias e determinar as espécies de bifidobactérias presentes	O leite materno contém bifidobactérias e espécies de <i>Bifidobacterium</i> específicas que podem promover o desenvolvimento microbiota saudável.
6 2007 n=10	Parto não descrito Colostro	<i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Peptostreptococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Escherichia spp</i>	Examinar a presença de um inóculo bacteriano natural no leite materno e o seu transporte intracelular para o seio da mãe, através da circulação.	Os resultados sugerem uma nova forma de comunicação mãe-bebê. No entanto, estudos adicionais são necessários para identificar os mecanismos subjacentes a esta translocação bacteriana elevada e para elucidar as consequências deste fenômeno para as mulheres grávidas e lactantes e para a instrução do sistema imunológico neonatal.
7 2008 n=36	Parto normal Colostro	Dominantes: <i>Staphylococcus epidermidis</i> e <i>Enterococcus faecalis</i> Outros: <i>Propionibacterium</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i> , <i>Bifidobacterium brevis</i> , <i>Actinomyces neuii</i> , <i>Arthrobacter sp.</i> , <i>Corynebacterium amicolatum</i> , <i>Fingoldia magna</i> , <i>Gemella haemolysans</i> , <i>Rothia nuclaginosa</i> , <i>Enterobacter sp.</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella sp</i>	Analisar a diversidade bacteriana de colostro obtidas de mulheres saudáveis e caracterizar as espécies bacterianas dominantes e a presença de possíveis fatores de virulência	O colostro contém um número significativo de bactérias. As principais espécies foram negativas para os fatores de virulência testados e foram satisfatoriamente susceptíveis aos antibióticos. Supõe-se que este fluido biológico desempenha um papel fundamental na colonização inicial do intestino neonatal.

Ref. Ano Sujeitos	Tipo de Parto Fase da lactação	Grupos microbianos e/ou espécies	Objetivo	Conclusão
8 2009 n=46 (23+23)	Parto normal Colostro	Leite: <i>Bifidobacterium adolescentis</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. bifidum</i> . Feses: <i>B. adolescentis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. pseudocatenulatum</i> , <i>B. dentium</i> .	Isolamento e identificação de estirpes de bifidobactérias do leite humano e a análise da comunidade de bifidobactérias por métodos moleculares	O leite materno é fonte de bifidobactérias para o intestino infantil
9 2009 n=50	Dados não descritos	Em todas as amostras: <i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Bifidobacterium</i> e <i>Lactobacillus</i> Em algumas amostras: <i>Clostridium</i> , <i>Enterococcus</i> e <i>Bacteroides</i>	Contribuir para um conhecimento alargado da diversidade bacteriana do leite materno de mulheres saudáveis através da aplicação da técnica qRTi-PCR para detectar e quantificar vários grupos de bactérias relevantes	qRTi-PCR permitiu a detecção de DNA bacteriano de estafilococos, estreptococos, bactérias do ácido láctico e bifidobactérias em amostras de leite humano, o que confirma que este fluido biológico pode ser uma importante fonte de bactérias e DNA bacteriano no intestino infantil
10 2010 n=40 (20+20)	Parto normal Colostro, transição e maduro	Entre parênteses a % de isolamento nos respectivos dias de coleta (1, 10, 30 e 90 dias) Feses: <i>Streptococcus</i> : (28, 13, 26, 26) <i>Lactobacillus</i> : (7, 8, 9, 16) <i>Bifidobacterium</i> : (21, 59, 57, 42) <i>Enterococcus</i> : (31, 8, 4, 16) <i>Staphylococcus</i> : (10, 4, 0, 0) Outros: (3, 8, 4, 0) Leite: <i>Streptococcus</i> : (65, 38, 36, 50) <i>Lactobacillus</i> : (0, 4, 7, 11) <i>Bifidobacterium</i> : (3, 0, 11, 4) <i>Enterococcus</i> : (3, 8, 0, 0) <i>Staphylococcus</i> : (29, 50, 43, 31) Outros: (0, 0, 3, 4)	Avaliar o desenvolvimento e estabelecimento de bactérias do ácido láctico e bifidobactérias no leite materno e na microbiota de crianças nascidas de parto normal, a termo e alimentados exclusivamente de leite materno durante os 3 primeiros meses de idade. Avaliar a presença de cepas de bifidobactérias viáveis no leite materno	O leite materno contém lactobacilos e bifidobactérias viáveis que podem contribuir para o estabelecimento e desenvolvimento da microbiota no recém-nascido, proporcionando a criança uma fonte contínua de inoculação bacteriana.
11 2011 n=16	Parto não descrito Colostro, transição e maduro	Gêneros mais abundantes: <i>Streptococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Serratia</i> e <i>Corynebacteria</i>	Investigar profundamente a estabilidade e a diversidade das comunidades de bactérias do leite humano ao longo do tempo	O LH, que é recomendado como fonte de nutrição ideal para quase todas as crianças saudáveis, contém uma coleção de bactérias mais diversa do que relatada previamente
12 2011 n=40	Parto normal Transição e maduro	8 dias: predominância de <i>Bacterioides</i> e <i>Staphylococcus</i> e baixos números de <i>Enterobacteriaceae</i> . 90 dias: Níveis similares de <i>Enterococcaceae</i> , <i>Clostridia</i> grupos XIV e IV, <i>Atopobium</i> , <i>Bifidobacterium</i> e <i>Lactobacillus</i>	Avaliar a microbiota intestinal de recém-nascido com aleitamento materno exclusivo de duas localidades diferentes da Espanha	Ressalta-se a necessidade da definição do núcleo microbiano da microbiota saudável infantil levando em conta as possíveis diferenças devido à sua origem geográfica

Ref. Ano Sujeitos	Tipo de Parto Fase da lactação	Grupos microbianos e/ou espécies	Objetivo	Conclusão
13 2011 n=30 (15+15)	Parto normal Maduro	<p>Leite + Fezes das mães + Fezes das crianças: <i>Streptococcus gallolyticus</i>, <i>Lactobacillus oris</i>, <i>L. gasseri</i>, <i>Enterococcus mundtii</i>, <i>E. faecium</i>, <i>E. faecalis</i> Leite: <i>L. animalis</i>, <i>L. helveticus</i>, <i>L. plantarum</i>, <i>L. fermentum</i>, <i>L. brevis</i>, <i>L. oris</i>, <i>L. gasseri</i>, <i>S. australis</i>, <i>Str. vestibularis</i>, <i>S. gallolyticus</i>, <i>E. durans</i>, <i>E. mundtii</i>, <i>E. faecium</i>, <i>E. faecalis</i>, <i>E. hirae</i>, <i>Pediococcus pentosaceus</i> Fezes das mães: <i>L. plantarum</i>, <i>L. fermentum</i>, <i>P. pentosaceus</i>, <i>L. brevis</i>, <i>S. gallolyticus</i>, <i>L. oris</i>, <i>L. gasseri</i>, <i>E. mundtii</i>, <i>E. faecium</i>, <i>E. faecalis</i>, <i>L. casei</i>, <i>Weissella confusa</i>, <i>L. vaginalis</i>, <i>L. cleohominis</i>, <i>L. mucosae</i>, <i>S. lutetiensis</i>, <i>L. rhamnosus</i>, <i>L. salivarius</i>, <i>E. durans</i> Fezes da crianças: <i>L. plantarum</i>, <i>L. fermentum</i>, <i>P. pentosaceus</i>, <i>L. brevis</i>, <i>Str. gallolyticus</i>, <i>L. oris</i>, <i>L. gasseri</i>, <i>E. mundtii</i>, <i>E. faecium</i>, <i>E. faecalis</i>, <i>L. casei</i>, <i>W. confusa</i>, <i>L. mucosae</i>, <i>Str. lutetiensis</i>, <i>L. rhamnosus</i>, <i>L. salivarius</i>.</p>	Investigar a presença de identidade de bactérias do ácido láctico em nível genotípico no leite materno de mulheres saudáveis, nas fezes das mães e dos bebês e em amostras de alimentos fermentados	Os dados demonstram não só a especificidade ao hospedeiro individual mas também suportam a hipótese de que há uma transferência vertical de bactérias do ácido láctico do intestino da mãe para o intestino do bebê através do leite.
14 2012 n=18	Parto normal e cirúrgico Colostro e maduro	<p>Famílias: <i>Neisseriaceae</i>, <i>Enterococcaceae</i>, <i>Comamonadaceae</i>, <i>Veillonellaceae</i>, <i>Xanthomonadaceae</i>, <i>Enterobacteriaceae</i>, <i>Moraxellaceae</i>, <i>Staphylococcaceae</i>, <i>Streptococcaceae</i>, <i>Leuconostocaceae</i>.</p> <p>Gêneros: <i>Enterococcus</i>, <i>Veillonella</i>, <i>Stenotrophomonas</i>, <i>Citrobacter</i>, <i>Acinetobacter</i>, <i>Streptococcus</i>, <i>Staphylococcus</i>, <i>Lactococcus</i>, <i>Weissella</i>, <i>Leuconostoc</i>.</p>	Identificar os fatores pré e pós-natais que podem potencialmente influenciar as comunidades de bactérias que habitam o leite humano e comparar a composição bacteriana do leite materno	Bactérias do leite não são contaminantes e sugere-se que o microbioma do leite é influenciado por vários fatores que distorcem significativamente a sua composição. Bactérias presentes no leite materno estão entre os primeiros micro-organismos introduzidos no corpo humano, os dados enfatizam a necessidade de entender o papel biológico que o microbioma do leite pode desempenhar para a saúde humana.

Ref. Ano Sujeitos	Tipo de Parto Fase da lactação	Grupos microbianos e/ou espécies	Objetivo	Conclusão
15 2012 n=38 (19+19)	Parto não descrito Colostro e maduro	<i>Staphylococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Bifidobacterium</i> .	Investigar a potencial transmissão de mãe para filho de Estafilococos, Lactobacilos e Bifidobactérias a nível de estirpe. Para este efeito, foi investigada o perfil genético de isolados obtidos a partir de amostras de leite e fezes de pares mãe-bebê.	Os resultados deste trabalho mostram a presença das mesmas estirpes bacterianas específicas de <i>Bifidobacterium</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Staphylococcus</i> no leite materno e nas amostras fecais infantis e sugerem que o leite materno pode ser uma fonte adicional de bactérias para o intestino infantil.
16 2013 n=10	Parto não descrito Transição e maduro	Filos: Proteobacteria(65%) + Firmicutes(34%) Gêneros: <i>Pseudomonas</i> (61,1%), <i>Staphylococcus</i> (33,4%) <i>Streptococcus</i> (0,5%).	Determinar os gêneros de bactérias do leite humano, procurar motifs de DNA imunomoduladores e determinar tipos de ORFs em LH que podem influenciar a presença e estabilidade de bactérias nessa matriz alimentar complexa	Os resultados expandem a complexidade do microbioma do leite humano e comprovam os benefícios da sua ingestão. A descoberta de motivos moduladores da imunidade indica a necessidade de mais estudos da funcionalidade do LH
17 2013 n=14 (7+7)	Parto normal Colostro, transição e maduro	Generos: <i>Staphylococcus</i> (60,1%), <i>Streptococcus</i> (17,6%) e <i>Propionibacterium</i> (13,7%). Espécies: <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Paropionibacterium acnes</i> , <i>P. granuisum</i> , <i>Rothia mucilaginoso</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>E. gallinarum</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus lugdunensis</i> , <i>Staphylococcus aureus/haemolyticus/hominis</i> , <i>Staphylococcus pasteuri/warneri</i> , <i>Streptococcus salivarius/thermophilus/vestibularis</i> , <i>Streptococcus mitis/pneumoniae</i> , <i>Veillonella atypicall/disparr/parvula</i> , <i>Escherichia/Shigella spp.</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Investigar a diversidade bacteriana no leite materno, com ênfase na identificação de anaeróbios obrigatórios associados ao intestino.	O leite materno pode ser uma importante fonte de diversidade de bactérias para o intestino neonatal, incluindo anaeróbios obrigatórios associados ao intestino, e pode assim influenciar de forma significativa a colonização do intestino e maturação do sistema imune.
18 2014 n=14 (7+7)	Parto normal Colostro, transição e maduro	Fezes Maternas: Filos - <i>Actinobacteria</i> (9,9%), <i>Bacteroidetes</i> (18,6%), <i>Firmicutes</i> (46,8%), <i>Proteobacteria</i> (24,7%). Leite: Filos - <i>Actinobacteria</i> (17,0%), <i>Firmicutes</i> (82,1%), <i>Proteobacteria</i> (0,9%) Fezes do neonato: Filos - <i>Actinobacteria</i> (18,7%), <i>Bacteroidetes</i> (10,6%), <i>Firmicutes</i> (44,5%), <i>Proteobacteria</i> (16,2%).	Investigar se estirpes viáveis de anaeróbios obrigatórios associados ao intestino são compartilhados entre o ecossistema intestinal materno e neonato através da amamentação	Anaeróbios obrigatórios podem ser verticalmente transferido da mãe para o bebê pela amamentação. Uma nova forma de comunicação mãe-recém-nascido, em que as bactérias do intestino maternas atingem o leite materno através de uma via entero-mamária para influenciar a colonização do intestino neonatal e maturação do sistema imune.

Ref. Ano Sujeitos	Tipo de Parto Fase da lactação	Grupos microbianos e/ou espécies	Objetivo	Conclusão
19 2014 n=64 (32+32)	Parto normal e cirúrgico Colostro, transição e maduro	<i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i> e <i>Enterococcus spp.</i> foram os grupos de bactérias predominantes. Contagens totais de bactérias, <i>Bifidobacterium</i> e <i>Enterococcus spp.</i> aumentou ao longo do período de lactação. Em todas as fases de lactação a concentração de <i>Bifidobacterium spp.</i> foi significativamente maior em amostras de leite de gestações a termo do que em gestações pré-termo. Maiores concentrações de bactérias no colostro e leite de transição foram encontrados em cesarianas. No entanto, <i>Bifidobacterium</i> foi detectado com maior frequência em partos vaginais do que em partos cesáreos	Analisar fatores determinantes da microbiota do leite	O estágio da lactação, idade gestacional e tipo de parto podem influenciar a composição de várias bactérias que habitam o leite materno e, conseqüentemente, podem afetar a colonização intestinal precoce da criança. Estes resultados podem ajudar a promover novas estratégias terapêuticas, a fim de adquirir uma colonização adequada, especialmente nos casos em que a exposição microbiana é sub-ótima. No entanto, mais estudos são necessários para definir completamente os efeitos biológicos destes micro-organismos sobre a saúde do bebê.
20 2015 n=45	Parto não descrito Colostro	Prevalência nas amostras: <i>Staphylococcus</i> - 66,7% <i>Staphylococcus epidermides</i> - 71,1% <i>Streptococcus</i> - 62,2% <i>Clostridium</i> cluster XIV - 95,6% <i>Clostridium</i> cluster IV 64,4% Enterobacteriaceae (grupo) - 100% <i>Bifidobacterium</i> - 53,3% Bacterioides-Prevotella (grupo) - 62,2% <i>Enterococcus</i> - 8,9% <i>Lactobacillus</i> - 0%	Fornecer conhecimentos sobre a composição da comunidade microbiana do colostro de mães eslovenas saudáveis que amamentam e relatar sobre a prevalência de gens de bacteriocinas.	Este estudo fornece evidência para o potencial do colostro de fornecer uma variedade de micro-organismos que suportam a saúde da glândula mamária e para fornecer pequenas quantidades de gêneros associado ao intestino aos recém-nascidos.
21 2016 n=21	Parto não descrito Colostro, transição e maduro	<i>Staphylococcus</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Finegoldia</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Peptoniphilus</i> , <i>Anaerococcus</i> , <i>Gemella</i> .	Desenvolver e estabelecer protocolo utilizando técnicas moleculares e de citometria de fluxo para calcular o número exato de bactérias presentes no leite em três estágios da lactação em diferentes mães e correlacionar essa carga bacteriana com fatores como estágio de desenvolvimento do leite, composição de nutrientes, número de células imunes e somáticas e diversidade microbiana.	Não houve correlação entre a carga bacteriana e a quantidade de células imunes no leite, reforçando a ideia de que as bactérias do leite não são detectadas como uma infecção pelo sistema imunológico.

Legendas: Referências: 1. (WEST; HEWITT; MURPHY, 1979); 2.(HEIKKILA; SARIS, 2003); 3. (MARTÍN et al., 2003); 4. (MARTÍN et al., 2007); 5. (GUEIMONDE et al., 2007); 6.(PEREZ et al., 2007); 7. (JIMÉNEZ et al., 2008b); 8. (MARTÍN et al., 2009); 9. (COLLADO; DELGADO; MALDONADO, 2009); 10. (SOLÍS et al., 2010); 11. (HUNT et al., 2011); 12. (ECHARRI et al., 2011); 13. (ALBESHARAT et al., 2011); 14. (CABRERA-RUBIO et al., 2012); 15. (MARTÍN et al., 2012); 16. (WARD et al., 2013); 17. (JOST et al., 2013); 18. (JOST et al., 2014); 19. (KHODAYAR-PARDO et al., 2014); 20. (OBERMAJER et al., 2015); 21. (BOIX-AMORÓS; COLLADO; MIRA, 2016).

3.5 Bancos de leite humano

Os avanços nas pesquisas e o reconhecimento da importância do LH impulsionou o surgimento de BLHs. No Brasil existem mais de 200 unidades em operação. Vinculados a esses bancos estão os postos de coletas de LH, que são os órgãos responsáveis por ações de promoção e apoio ao aleitamento materno e pelo acompanhamento técnico do recolhimento da matéria prima, bem como o seu processamento, estocagem, controle de qualidade e distribuição (ANVISA, 2008).

Diversos fatores influenciam na segurança dos leites depositados em BLH, como agentes infecciosos, alterações decorrentes do armazenamento, tratamentos térmicos e até mesmo relacionados às doadoras, que podem não oferecer informações corretas sobre seu estado de saúde ou uso de medicamentos e fitoterápicos (LANDERS; HARTMANN, 2013). Nesse contexto as atividades realizadas nos BLHs são importantes para garantir a segurança dos usuários e por isso possui uma legislação própria, a RDC/ANVISA nº 171 de 2006 (BRASIL, 2006).

3.5.1 Características de segurança, funcionais e tecnológicas de bactérias probióticas

Alguns organismos utilizados em alimentos possuem o status de segurança concedido pelo seu histórico de utilização segura (DONOHUE, 2006), porém, a compreensão dos mecanismos e dos potenciais efeitos adversos devem ser observados por variados ensaios (REID, 2006). A eficácia dos probióticos tem sido estudada e comprovada por diversas formas, o seu uso deve ser feito de forma cautelosa.

Com iniciativa da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação foi criado um grupo de trabalho para a elaboração de diretrizes para a avaliação de probióticos em alimentos e assim foram estabelecidos testes mínimos a serem realizados para que micro-organismos sejam considerados como tal. De acordo com o protocolo, o primeiro passo a ser seguido é a identificação da estirpe por métodos fenotípicos e genotípicos e o seu depósito em uma coleção de culturas internacional. Posteriormente, devem ser feitas caracterizações funcionais e avaliações de segurança por meio de testes *in vitro* e *in vivo*. Ensaio com seres humanos devem ser realizados em três etapas e se possível, seus resultados devem ser confirmados com testes auxiliares (FAO/WHO, 2002).

Para que seja ofertado ao consumidor, deve-se fornecer informações como: identificação inequívoca (gênero, espécie e estirpe), número mínimo de bactérias viáveis ao final da vida útil do produto, condições de armazenamento adequadas e contatos para que o consumidor possa se informar. Fatores relacionados à tecnologia de produção também devem estar em pauta, já que a oferta do produto ao consumidor deve obedecer a critérios sensoriais (SAARELA et al., 2000)

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) baseia-se em diretrizes do *Codex Alimentarius* e também exige evidências científicas que comprovem a alegação de propriedade funcional ou de saúde (BRASIL, 1999). São necessários estudos da composição química com caracterização molecular, ensaios bioquímicos, nutricionais, fisiológicos e toxicológicos em animais, estudos epidemiológicos e ensaios clínicos. Exigem-se evidências nacionais e internacionais na literatura científica bem como a comprovação do uso tradicional sem associação a danos à saúde (BRASIL, 1999, 2002).

Diversas modalidades de testes tem sido elaboradas para a verificação da segurança e funcionalidade de micro-organismos isolados de variadas fontes (ARBOLEYA et al., 2011; BARBOSA; GIBBS; TEIXEIRA, 2010; BEN OMAR et al., 2004; CÁRDENAS et al., 2014; FRANZ et al., 2003; GOMES et al., 2008; PERIN et al., 2014; SÁNCHEZ et al., 2007; VESTERLUND et al., 2007; YOON; KIM; HWANG, 2008). Entre os testes comumente realizados *in vitro* são considerados: a verificação da produção de hemolisinas e gelatinases, a não resistência a antibióticos, a

resistência a acidez gástrica e a ácidos biliares, adesão ao muco e/ou células epiteliais e a atividade antimicrobiana frente a organismos potencialmente patogênicos (FAO/WHO, 2002).

No que tange aos aspectos funcionais, consideram-se a adesão do micro-organismo ao epitélio onde acontecerá a sua atuação, suas propriedades imunomodulatórias, propriedades de antagonismo, e aquelas anti-mutagênicas e anti-carcinogênicas. No âmbito tecnológico a atenção volta-se ao processo de produção da cultura probiótica e a interação com as outras culturas que eventualmente possam estar presente no produto, seja ela uma cultura *starter* ou um outro probiótico. No caso de bactérias isoladas do leite há uma preocupação maior quando a sua veiculação não acontece em produtos lácteos (SAARELA et al., 2000).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo identificar, caracterizar e selecionar bactérias lácticas predominantes no LH em diferentes fases da lactação visando o seu potencial para uso em BLH.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Identificar, caracterizar e selecionar bactérias lácticas predominantes no LH em diferentes fases da lactação visando o seu potencial para uso em BLH.

4.2 Específicos

- ✓ Agrupar isolados com perfis semelhantes por meio de REP-PCR;
- ✓ Identificar isolados representantes de cada grupo por meio de sequenciamento parcial do rDNA 16S;
- ✓ Avaliar características de segurança dos isolados com testes de atividade hemolítica, gelatinase, susceptibilidade a antibióticos e forma isomérica do ácido láctico produzido;
- ✓ Avaliar o potencial funcional dos isolados por meio da avaliação da resistência a sais biliares e suco gástrico, bem como a atividade antagonista a patógenos;
- ✓ Avaliar a viabilidade das culturas selecionadas quando submetidas a processamento tecnológico de liofilização;
- ✓ Reavaliar características de segurança e funcionais após a liofilização.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido nas dependências do Laboratório de Culturas Láticas do Instituto de Biotecnologia Aplicado à Agropecuária (BIOAGRO) e no Laboratório de Culturas Láticas do Departamento de Culturas Láticas do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) da UFV. Todos os procedimentos foram realizados de forma a não comprometer a identidade e integridade dos indivíduos envolvidos, com a devida autorização do Conselho de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Viçosa – CEP/ UFV aprovado com o parecer número 663.168 de 03/06/2014 (ANEXO A).

5.1 Ativação dos isolados

As culturas utilizadas foram isoladas a partir do LH coletado de 11 mães voluntárias com idade gestacional a termo, procedentes de parto normal ou cesárea, com amamentação materna exclusiva, que gozavam de perfeitas condições de saúde, não sendo portadoras de doenças crônicas. Não fizeram uso de antibióticos ou outros medicamentos na semana de coleta ou anterior a cada coleta, não apresentavam dificuldades na amamentação e encontravam-se nos períodos de amamentação estipulados para a coleta das amostras de leite. As amostras foram coletadas de forma asséptica, em cinco períodos, sendo eles: 5, 15, 30, 60 e 90 dias após o nascimento do bebê (FIGURA 1) (COSTA, 2012).

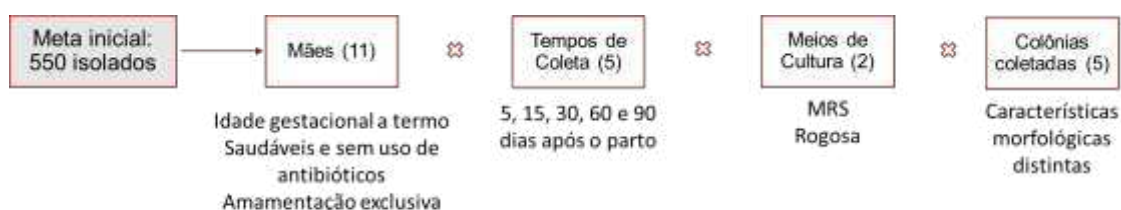


FIGURA 1 – Obtenção do isolados

A pesquisa por *Bifidobacterium* spp e *Lactobacillus* spp foi realizada empregando-se a técnica “Pour Plate” em placas de Petri com a utilização do meio

Ágar Rogosa e MRS modificado com adição de 1% (v/v) de cisteína 0,05% e 5% (v/v) dos antibióticos NPPL. As placas foram incubadas a 37 ± 1 °C por 48 horas em anaerobiose. De cada placa da maior diluição em que foi observado crescimento foram retiradas cinco colônias isoladas que foram mantidas sob congelamento em ultrafreezer (-80 °C) em caldo MRS adicionado de uma substância crioprotetora (glicerol 20%). Com a coleta de cinco colônias de cada um dos 5 tempos e de cada uma das 11 mães obteve-se o total de 550 amostras (COSTA, 2012). Em algumas placas não foi observado crescimento, o que impossibilitou a coleta de colônias. No momento da reativação das culturas algumas amostras não apresentaram crescimento o que resultou em um universo de 301 amostras.

5.2 Testes morfofisiológicos

Após a reativação as amostras de bactérias isoladas foram submetidas ao teste de coloração de gram para verificação da pureza e análise morfológica (HOLDEMAN; CATO; MOORE, 1987).

5.3 Identificação genética

5.3.1 Extração do DNA genômico

A extração do DNA foi realizada por meio de *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* da Promega (A1125). Após ativação dos isolados, 1,0 mL de cada uma das culturas foi transferido asépticamente para um microtubo estéril e centrifugado a $15000 \times g$ por 6 minutos (Centrifuge 5804 R). O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em tampão EDTA (50mM pH=8). Foi adicionado 120 µL de lisozima (10 mg/mL) e os tubos incubados a 37 °C/ 30 min. Consequente, foram seguidas as orientações do fabricante. O DNA foi ressuspendido em 50 µL de solução de hidratação e quantificado (ng/ µL) em espectrofotômetro a 260-280 nm (NanoDrop 2000 spectrophotometer– Thermo Scientific). Após quantificação, as soluções foram estocadas a -20 °C.

5.3.2 REP-PCR

Objetivando-se agrupar os isolados para posterior identificação, foi realizada REP-PCR, que baseia-se na amplificação de uma região móvel do DNA. A REP-PCR foi conduzida utilizando-se o *primer* (GTG)₅ (5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3'). As reações de PCR foram realizadas com volume final de 25 µL utilizando-se Go Taq Master Mix (Promega), 50 pMol do *primer*, 1 µL de DNA na concentração aproximada de 80 ng e água ultra pura para PCR (Promega).

As condições da reação foram: 94 °C por 2 minutos para abertura inicial das fitas, 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 45 segundos, anelamento a 46 °C por 45 segundos e extensão a 72 °C por 100 minutos e extensão final de 72 °C por 10 min. Os fragmentos resultantes foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1 % (m/v) por 2 h a uma voltagem de 110 V em tampão TBE (Tris/Borato/ EDTA) pH 8,0. Para revelação das bandas, as amostras foram coradas com brometo de etídio (0,5 ml/mL) e visualizadas em transiluminador LPIX (Loccus Biotecnologia, São Paulo, SP, Brazil). Os padrões de bandas obtidos foram analisados utilizando-se o programa Bionumercs 6.0 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) e a similaridade entre os isolados foi calculada utilizando a correlação de Pearson. O dendrograma foi construído utilizando Unweighted Pair Group Method with Arithmetic (UPGMA) (DAL BELLO et al., 2010; GEVERS; HUYS; SWINGS, 2001; VERSALOVIC et al., 1994).

5.3.3 Amplificação do gene 16S rDNA

Para a amplificação do DNA da região 16S do rDNA foram utilizados os *primers* universais, P027 (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') e R1492 (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCTCAG-3') que amplificaram um fragmento de aproximadamente 1500 pares de bases entre as posições 27 e 1492 (OLIVEIRA et al., 2013). Tal reação foi padronizada para volume final de 25 µL utilizando-se *GoTaq® Green Master Mix* da Promega. As amostras foram amplificadas em termociclador modelo MJ96 (Biocycler Termocicladores, Biosystems Importadora Ltda, Curitiba, Brasil) utilizando-se a seguinte programação: 94 °C por 4 minutos, 35 ciclos de

desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 63 °C por 60 segundos e extensão a 72 °C por 90 segundos e finalizado com extensão de 72 °C por 7 minutos. (OLIVEIRA et al., 2013). Os produtos de reação da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1 % (m/v), utilizando-se o marcador de 1 kb DNA Ladder RTU (Read-to-use – 250 a 10.000 pb), corado com solução de brometo de etídio de 0,5 mg/mL e visualizado sob luz ultravioleta para verificação da extensão dos fragmentos amplificados. Após confirmação da amplificação, as amostras da reação de PCR foram enviadas para empresa *Macrogen Inc.* (Seoul, Korea) onde foram purificadas e sequenciadas.

Regiões das sequências com qualidade inferior a 25 na escala Phred foram aparadas e as regiões remanescentes foram alinhadas para obtenção da sequência consenso utilizando-se o programa *Geneious Trial version 10.0.7* (KEARSE et al., 2012). As distâncias entre pares de sequências foram calculadas e utilizadas para agrupá-las em Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs) com similaridade de 97 % pelo programa *Mothur* (SCHLOSS et al., 2009). A anotação taxonômica foi realizada utilizando-se sequências do banco de dados SILVA (QUAST et al., 2013).

5.4 Teste tecnológico - Liofilização

As formas clássicas para a manutenção de micro-organismos são a refrigeração e o congelamento, no entanto a liofilização possibilita que as bactérias sejam armazenadas em temperatura ambiente, diminuindo os custos de estocagem e transporte. Contudo, o procedimento pode causar alterações fenotípicas nas bactérias e por isso, foi necessário verificar se as características avaliadas foram mantidas.

Antes de serem liofilizados, cada isolado foi replicado três vezes consecutivas em caldo MRS, sendo a última replicação realizada em um volume de 20 mL. Após crescimento, cada solução foi centrifugada a 8.000 x g por 15 min (Beckman GS – 6R), o precipitado foi lavado duas vezes em solução tampão PBS pH=7,4 e novamente centrifugado nas mesmas condições. O concentrado celular foi resuspenso em 20 mL de leite desnatado reconstituído (12%) e distribuídas (4 mL cada) em frascos de vidro e congelados a -80 °C até o início da liofilização. O procedimento ocorreu durante

22 hs em câmara única. O vácuo de secagem foi 0,22 mBar com temperaturas entre -35 e -25 °C durante a secagem primária. Ao final do processo os frascos foram selados e armazenados a 25 °C até a data prevista para as análises (VINDEROLA et al., 2012).

A viabilidade das culturas foi avaliada por meio da contagem de células por plaqueamento em profundidade em ágar MRS com o precipitado de células usado antes da liofilização, com o pó obtido logo após o procedimento de secagem e 90 dias após o procedimento, reconstituído em água destilada (4 mL), em duplicata (VINDEROLA et al., 2012). Os testes fenotípicos posteriores a liofilização foram executados após e três replicações consecutivas da solução reconstituída.

5.5 Testes de segurança

5.5.1 Avaliação da capacidade de produção de hemolisina

Os isolados foram estriados em ágar MRS suplementado com 5% (v/v) de sangue de carneiro desfibrinado recém-coletado. Os resultados foram avaliados após incubação a 37 °C/ 48 h, em condição de aerobiose. A atividade hemolítica foi verificada por meio da formação de zonas claras ao redor da colônia (β - hemólise), formação de pigmento verde (α - hemólise) ou ausência de reação (γ - hemólise) (BAUMGARTNER et al., 1998).

5.5.2 Avaliação de atividade de gelatinase

A atividade da enzima gelatinase dos isolados foi avaliada utilizando-se o ágar MRS suplementado com 3% (m/v) de gelatina. O resultado foi avaliado após incubação a 37 °C/ 48 h sob aerobiose. A produção da enzima foi verificada por meio da formação de um halo ao redor da estria após adição de aproximadamente 0,3 mL da solução de Frazier (cloreto mercúrio, 15,0 g; concentrado ácido clorídrico, 20 mL; e água destilada, 100 mL) por placa para confirmação da hidrólise da gelatina (SU et al., 1991).

5.5.3 Susceptibilidade a antibióticos

A escolha dos antibióticos utilizados foi baseada na frequência de uso relatada por profissionais de saúde ativos nas Unidades de Terapia Intensiva (UTI) neonatais da cidade de Viçosa-MG. Para verificação do perfil de sensibilidade dos isolados a 14 diferentes antibióticos, foi utilizado o método da difusão em placa (BAWER et al., 1966) com discos impregnados com os seguintes antibióticos: amicacina (10 µg), ampicilina (30 µg), cefalexina (30 µg), vancomicina (30 µg), meropenem (10 µg), gentamicina (10 µg), oxacilina (1 µg), cefalotina (30 µg), eritromicina (15 µg), sulfonamidas (300 µg), penicilina (10 µg), ceftriaxona (30 µg), ciprofloxacina (5 µg) e amoxicilina (10 µg), obtidos do laboratório SENSIFAR® (Cefar Diagnóstica, São Paulo, Brasil).

As bactérias do LH foram previamente ativadas e distribuídas (100 µL) pela técnica de *spread plate* em placas de Petri contendo ágar MRS em concentração próxima a 10^8 UFC.mL⁻¹. Os discos contendo os antibióticos foram adicionados às placas em pontos equidistantes, sob leve pressão, com o auxílio de uma pinça esterilizada. Após 1 h sob temperatura ambiente, as placas foram incubadas a 37 °C, por 16 a 18 h e 24 h no caso da vancomicina (NCCLS 2016). O experimento foi realizado em duplicata em três repetições. A sensibilidade do micro-organismo foi avaliada por meio da medição do diâmetro dos halos de inibição ao redor dos discos de antibióticos, medidos com paquímetro e expressos em mm. De acordo com o tamanho do halo obtido, os isolados foram classificados em resistentes, intermediários e sensíveis (CLSI/NCCLS, 2016).

5.5.4 Forma isomérica do ácido láctico

Para a verificação da forma isomérica do ácido láctico produzido pelas bactérias foi utilizado kit enzimático Megazyme K-DLATE/07/14® (*Megazyme International Ireland*). Os procedimentos foram seguidos de acordo com instruções do fabricante. A análise é baseada na oxidação de cada forma isomérica, que é estequiometricamente equivalente à quantidade de NADH liberado. O cálculo é feito

a partir da diferença na absorvância antes e depois da reação com auxílio de planilha (MAGACALC) fornecida pelo fabricante. A quantidade total de ácido láctico produzido foi obtida pela soma das duas formas isoméricas.

5.6 Testes de funcionalidade

Para a execução dos testes de resistência ao suco gástrico e a sais biliares, cada isolado foi ativado três vezes consecutivas em caldo MRS, sendo a última ativação realizada em um volume de 20 mL. Após crescimento, cada solução foi centrifugada a 2.750 x g por 15 min, a 4 °C (Beckman GS – 6R); o sobrenadante foi descartado e o concentrado celular ressuspendido em 2 mL de caldo MRS. O inóculo foi ajustado adicionando-se gotas do concentrado celular em tubos contendo 5 mL de caldo MRS estéril, até obtenção de uma densidade ótica de 0,9 +/- 0,2 em espectrofotômetro a 600 nm (TESHIMA, 2001). Todas as análises foram realizadas em duplicata em três repetições.

5.6.1 Resistência ao suco gástrico

O concentrado de células padronizado (DO ~ 0,9) de cada cultura foi inoculado (5% v/v) em 10 mL de suco gástrico artificial (cloreto de sódio: 2,0 g; pepsina: 3,2 g; ácido clorídrico concentrado: 7 mL; água destilada: 1000 mL; e pH final de 2) e esterilizado por filtração em membranas de *Milipore* de 0,20 µm, de acordo com a descrição da farmacopeia americana publicada pela *American Society of Microbiology*, (ASM, 1981).

As amostras permaneceram incubadas a 37 °C e foram plaqueadas em profundidade em ágar MRS após 0, 15, 30, 60 e 90 minutos de exposição ao suco gástrico. Uma alíquota do concentrado de células de cada amostra foi plaqueada antes da inoculação no suco gástrico para obtenção do número inicial de células viáveis. A contagem de células viáveis das placas foi realizada após incubação a 37 °C/ 48 h.

5.6.2 Resistência a sais biliares

Inoculou-se 1 mL do concentrado de células padronizado (DO ~ 0,9) em tubos contendo 10 mL de caldo MRS adicionado de 0,3% (v/v) de *Oxgall* (Sigma®). Como controle foi realizado o mesmo procedimento, porém com o MRS sem a adição do sal. Os tubos foram mantidos a 37 °C e o crescimento avaliado em espectrofotômetro a 600 nm, em intervalos de 2 h, durante 6 h de incubação. Uma bactéria é considerada resistente a sais biliares quando apresenta DO \geq 0,3 (600 nm) após 6 h de incubação na presença de 0,3% de sais biliares (GILLILAND; STALEY; BUSH, 1984).

5.6.3 Antagonismo em relação a patógenos indicadores

Para avaliação do potencial antimicrobiano dos isolados, foram utilizados ensaios de incubação *spot* em superfície sólida (*spot-on-lawn-assay*), em que foi aplicado um toque dos isolados sobre o centro de placas contendo ágar MRS. As placas foram incubadas 37 °C por 48 horas e após a formação de colônias visíveis, foram vertidas sobre as placas 10 mL de ágar BHI (*Brain heart infusion*, Oxoid) semissólido (0,7% m/v) previamente inoculado com os seguintes patógenos: *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43895, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 *Cronobacter sakazakii* ATCC 51329 e *Clostridium difficile* ATCC 43596 em concentração de 10^6 UFC.mL⁻¹. A atividade antagonista foi verificada pela formação de halos de inibição (zonas claras) do crescimento do patógeno ao redor da massa de crescimento onde o isolado foi aplicado no ágar. O diâmetro dos halos de inibição foram medidos com paquímetro analógico (modelo Zaas150, Zaas) (BISWAS et al., 1991; FLEMING; ETCHELLS; COSTILOW, 1975).

5.7 Análises estatísticas

A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Grupos dependentes com distribuição paramétrica foram comparados por ANOVA com

medidas repetidas seguidas de teste de Bonferroni. As análises foram realizadas com o auxílio do *software SPSS Statistics for Windows 17.0* (IBM, 2008).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBESHARAT, R. et al. Phenotypic and genotypic analyses of lactic acid bacteria in local fermented food, breast milk and faeces of mothers and their babies. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 148–55, 2011.

ANVISA. **Banco de Leite Humano: Funcionamento, Prevenção e Controle de Riscos**. Brasília-DF: Agencia Nacional de Vigilância Sanitária, 2008.

ARBOLEYA, S. et al. Characterization and in vitro properties of potentially probiotic Bifidobacterium strains isolated from breast-milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 149, n. 1, p. 28–36, 2011.

ASM. Gastric Juice. In: **Manual of Methods for General Bacteriology**. Washington: American Society for Microbiology - United States Pharmacopeia, 1981. p. 208–220.

BALLARD, O.; MORROW, A. L. Human Milk Composition. Nutrients and Bioactive Factors. **Pediatric Clinics of North America**, v. 60, n. 1, p. 49–74, 2013.

BARBOSA, J.; GIBBS, P. A.; TEIXEIRA, P. Virulence factors among enterococci isolated from traditional fermented meat products produced in the North of Portugal. **Food Control**, v. 21, n. 5, p. 651–656, 2010.

BAUMGARTNER, A. et al. Relatedness of Lactobacillus rhamnosus Strains Isolated from Clinical Specimens and Such from Food-stuffs, Humans and Technology. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 31, n. 5, p. 489–494, 1998.

BEISCHER, N.; MACKAY, E.; COLDITZ, P. **Obstetrics and the Newborn: An Illustrated Textbook**. 3th Editio ed. Philadelphia: Sauders Company, 1997.

BEN OMAR, N. et al. Functional and safety aspects of Enterococci isolated from different Spanish foods. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 118–130, 2004.

BISWAS, S. R. et al. Influence of Growth Conditions on the Production of a bacteriocin prediocin Ach, by Pediococcus acidilactici H. **Applied Environmental Microbiology**, v. 57, n. 4, p. 1265–1267, 1991.

BLAUT, M.; CLAVEL, T. Metabolic diversity of the intestinal microbiota: implications for health and disease. **The Journal of Nutrition**, v. 137, n. 3 Suppl 2, p. 751S–5S, 2007.

BOIX-AMORÓS, A.; COLLADO, M. C.; MIRA, A. Relationship between Milk Microbiota, Bacterial Load, Macronutrients, and Human Cells during Lactation. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1–9, 2016.

BRANDTZAEG, P. Induction of secretory immunity and memory at mucosal surfaces. **Vaccine**, v. 25, n. 30, p. 5467–5484, 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Resolução - RDC nº 18, de 30 de abril de 1999 - Diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. 1999.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Resolução - RDC nº 2, de 7 de janeiro de 2002 - Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde. 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária RDC nº171, de 4 de setembro de 2006. Dispõe sobre Regulamento Técnico para o funcionamento de Bancos de Leite Humano. 2006.

CABRERA-RUBIO, R. et al. The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery 1 – 4. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 96, p. 544–551, 2012.

CALIL, V. M. L. T.; LEONE, C. R.; RAMOS, J. L. A. Composição nutricional do colostro de mães de recém- nascidos de termo adequados e pequenos para a idade gestacional . II - Composição nutricional do leite humano nos diversos estágios da lactação . Vantagens em relação ao leite de vaca. **Pediatria (São Paulo)**, v. 14, n. 1, p. 14–23, 1992.

CÁRDENAS, N. et al. Characterisation of Lactobacillus gastricus strains isolated from human milk. **International Dairy Journal**, v. 39, n. 1, p. 167–177, 2014.

CLSI/NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 26th. ed. Wayne, Pennsylvania - USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2016. v. 36

COLLADO, M. C.; DELGADO, S.; MALDONADO, A. Assessment of the bacterial diversity of breast milk of healthy women by quantitative real-time PCR. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, p. 523–528, 2009.

COSTA, É. C. DA. **Caracterização microbiológica e físico-química de leite humano em diferentes períodos de lactação**. Viçosa-MG. Universidade Federal de Viçosa, 2012.

DAL BELLO, B. et al. Microbial ecology of artisanal products from North West of Italy and antimicrobial activity of the autochthonous populations. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 7, p. 1151–1159, 2010.

DE LA COCHETIERE, M.-F. et al. Intestinal Microbiota in Neonates and Preterm Infants: A Review. **Current Pediatric Reviews**, v. 3, n. 1, p. 21–34, 2007.

DE LA COCHETIÈRE, M.-F. et al. Effect of antibiotic therapy on human fecal

microbiota and the relation to the development of *Clostridium difficile*. **Microbial Ecology**, v. 56, n. 3, p. 395–402, 2008.

DIGIULIO, D. B. et al. Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: A molecular and culture-based investigation. **PLoS ONE**, v. 3, n. 8, p. 1–10, 2008.

DONOHUE, D. C. Safety of probiotics. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 15, n. 4, p. 563–569, 2006.

ECHARRI, P. P. et al. Assessment of intestinal microbiota of full-term breast-fed infants from two different geographical locations. **Early Human Development**, v. 87, n. 7, p. 511–3, 2011.

ECKBURG, P. B. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. **Science**, v. 308, p. 1635–1638, 10 jun. 2005.

FANARO, S. et al. Intestinal microflora in early infancy: composition and development. **Acta paediatrica**. Supplement, v. 91, n. 441, p. 48–55, 2003.

FAO/WHO. **Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. April 30 and May 1, 2002**. London, Ontario, Canada: FAO/WHO, 2002.

FAVIER, C. F. et al. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 1, p. 219–226, 2002.

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

FLEMING, H. P.; ETCHELLS, J. L.; COSTILOW, R. N. Microbial inhibition by an isolate of *Pediococcus* from cucumber brines. **Applied microbiology**, v. 30, n. 6, p. 1040–1042, 1975.

FRANZ, C. M. A. P. et al. *Enterococci* in foods - A conundrum for food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, n. 2–3, p. 105–122, 2003.

GARTNER, L. M. et al. Breastfeeding and the use of human milk. **Pediatrics**, v. 115, n. 2, p. 496–506, 2005.

GARZA, C. et al. Special properties of human milk. **Clinics in Perinatology**, v. 14, n. 1, p. 11–32, 1987.

GERMAN, J. B. et al. Human Milk Oligosaccharides: Evolution, Structures and Bioselectivity as Substrates for Intestinal Bacteria. In: **Personalized Nutrition for the Diverse Needs of Infants and Children**. Basel: KARGER, 2008. v. 62p. 205–222.

GEVERS, D.; HUYS, G.; SWINGS, J. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. **FEMS Microbiology Letters**, v. 205, n. 1, p. 31–6, 27 nov. 2001.

GILLILAND, S. E.; STALEY, T. E.; BUSH, L. J. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. **Journal of Dairy Science**, v. 67, n. 12, p. 3045–3051, 1984.

GOMES, B. C. et al. Prevalence and characterization of *Enterococcus spp.* isolated from Brazilian foods. **Food Microbiology**, v. 25, n. 5, p. 668–675, 2008.

GRZEŚKOWIAK, Ł. et al. The impact of perinatal probiotic intervention on gut microbiota: double-blind placebo-controlled trials in Finland and Germany. **Anaerobe**, v. 18, n. 1, p. 7–13, 2012.

GUEIMONDE, M. et al. Breast Milk: A Source of Bifidobacteria for Infant Gut Development and Maturation ? **Neonatology**, v. 92, p. 64–66, 2007.

GUTIÉRREZ-CASTRELLÓN, P. et al. Immune response to nucleotide-supplemented infant formulae: systematic review and meta-analysis. **British Journal of Nutrition**, v. 98, n. S1, p. S64-7, 2007.

HEIKKILÄ, M. P.; SARIS, P. E. J. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 3, p. 471–478, 2003.

HOLDEMAN, L. V. .; CATO, E. P. .; MOORE, W. E. C. **Anaerobe Laboratory Manual**. Blacksburg - USA: Virginia Polytechnic Institute and State University, 1987.

HUNT, K. M. et al. Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, p. 1–8, 2011.

IBM, S. **SPSS 17.0 IBM**, Chicago, 2008. Disponível em: <www.spss.com>

ISAACS, C. E.; LITOV, R. E.; THORMAR, H. Antimicrobial activity of lipids added to human milk, infant formula, and bovine milk. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 6, n. 7, p. 362–366, 1995.

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

JIMÉNEZ, E. et al. Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. **Current Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 270–274, 2005.

JIMÉNEZ, E. et al. Is meconium from healthy newborns actually sterile? **Research in Microbiology**, v. 159, n. 3, p. 187–193, 2008a.

JIMÉNEZ, E. et al. Assessment of the bacterial diversity of human colostrum and screening of *Staphylococcal* and *Enterococcal* populations for potential virulence factors. **Research in Microbiology**, v. 159, n. 9–10, p. 595–601, 2008b.

JOST, T. et al. Assessment of bacterial diversity in breast milk using culture-dependent and culture-independent approaches *British Journal of Nutrition*. **British Journal of Nutrition**, v. 110, p. 1253–1262, 2013.

JOST, T. et al. Vertical mother-neonate transfer of maternal gut bacteria via breastfeeding. **Environmental Microbiology**, v. 16, n. 9, p. 2891–2904, 2014.

KEARSE, M. et al. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p. 1647–1649, 2012.

KHODAYAR-PARDO, P. et al. Impact of lactation stage, gestational age and mode of delivery on breast milk microbiota. **Journal of Perinatology**, v. 34, n. 8, p. 599–605 2014.

KOLETZKO, B. et al. Physiological aspects of human milk lipids. **Early human development**, v. 65 Suppl, p. S3–S18, 2001.

KRAMER, M. S.; KAKUMA, R. **The optimal duration of exclusive breastfeeding: A systematic review**. Geneva: WHO - World Health Organization, 2002.

LANDERS, S.; HARTMANN, B. T. Donor Human Milk Banking and the Emergence of Milk Sharing. **Pediatric Clinics of North America**, v. 60, n. 1, p. 247–260, 2013.

LANGA, S. et al. Characterization of *Lactobacillus salivarius* CECT 5713, a strain isolated from human milk: From genotype to phenotype. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 94, n. 5, p. 1279–1287, 2012.

LAWRENCE, R. M.; LAWRENCE, R. A. Breast milk and infection. **Clinics in Perinatology**, v. 31, n. 3, p. 501–528, 2004.

LÖNNERDAL, B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 77, n. 6, p. 1537S–1543S, jun. 2003.

MACKIE, R. I.; SGHIR, A.; GASKINS, H. R. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 69 (suppl), 1999.

MADAN, J. C. et al. Gut microbial colonisation in premature neonates predicts neonatal sepsis. **Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition**, v. 97, n. 6, p. F456–462, 2012.

MARTÍN, R. et al. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. **The Journal of Pediatrics**, v. 143, n. 6, p. 754–758, 2003.

MARTÍN, R. et al. The commensal microflora of human milk: New perspectives for food bacteriotherapy and probiotics. **Trends in Food Science and Technology**, v. 15, n. 3–4, p. 121–127, 2004.

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

MARTÍN, R. et al. Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 4, p. 965–969, 2009.

MARTÍN, V. et al. Sharing of Bacterial Strains Between Breast Milk and Infant Feces. **Journal of Human Lactation**, v. 28, n. 1, p. 36–44, fev. 2012.

MARTINS, V.; TUMA, L.; FALCÃO, M. C. Composição do leite humano : o alimento ideal Human milk composition : the ideal nutrition for infants. **Revista de Medicina (São Paulo)**, v. 82, n. 1, p. 1–10, 2003.

MATAMOROS, S. et al. Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health. **Trends in Microbiology**, v. 21, n. 4, p. 167–73, 2013.

NOVAK, F. R. et al. Colostro humano : fonte natural de probióticos ? **Journal of Pediatrics**, v. 77, n. 4, p. 265–270, 2001.

O'TOOLE, P. W.; CLAEISSON, M. J. Gut microbiota: Changes throughout the lifespan from infancy to elderly. **International Dairy Journal**, v. 20, n. 4, p. 281–291, abr. 2010.

OBERMAJER, T. et al. Colostrum of Healthy Slovenian Mothers: Microbiota Composition and Bacteriocin Gene Prevalence. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, p. e0123324, 2015.

OLIVEIRA, M. N. V et al. Endophytic microbial diversity in coffee cherries of *Coffea arabica* from southeastern Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 59, n. 4, p. 221–30, 2013.

PALMER, C. et al. Development of the human infant intestinal microbiota. **PLoS Biology**, v. 5, n. 7, p. 1556–1573, 2007.

PENDERS, J. et al. Factors Influencing the Composition of the Intestinal Microbiota in Early Infancy. **Pediatrics**, v. 118, n. 2, p. 511–521, 2006.

PEREZ, P. F. et al. Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? **Pediatrics**, v. 119, n. 3, p. e724–e732, 2007.

PERIN, L. M. et al. Virulence, antibiotic resistance and biogenic amines of bacteriocinogenic *Lactococci* and *Enterococci* isolated from goat milk. **International**

Journal of Food Microbiology, v. 185, p. 121–126, 2014.

PREIDIS, G. A.; VERSALOVIC, J. Targeting the Human Microbiome With Antibiotics, Probiotics, and Prebiotics: Gastroenterology Enters the Metagenomics Era. **Gastroenterology**, v. 136, n. 6, p. 2015–2031, 2009.

QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. D590–D596, 2013.

REID, G. Safe and efficacious probiotics: what are they? **Trends in Microbiology**, v. 14, n. 8, p. 348–352, 2006.

RESCIGNO, M. et al. Bacteria-induced neo-biosynthesis, stabilization, and surface expression of functional class I molecules in mouse dendritic cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 5229–5234, 1998.

RESCIGNO, M. et al. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. **Nature Immunology**, v. 2, n. 4, p. 361–367, 2001.

ROUDIÈRE, L. et al. Optimized PCR-Temporal Temperature Gel Electrophoresis compared to cultivation to assess diversity of gut microbiota in neonates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 79, n. 2, p. 156–165, 2009.

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

SALMINEN, A. et al. Activation of innate immunity system during aging: NF- κ B signaling is the molecular culprit of inflamm-aging. **Ageing Research Reviews**, v. 7, n. 2, p. 83–105, 2008.

SÁNCHEZ, J. et al. Antimicrobial and safety aspects, and biotechnological potential of bacteriocinogenic enterococci isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). **International Journal of Food Microbiology**, v. 117, n. 3, p. 295–305, 2007.

SAVINO, F.; LIGUORI, S. A.; LUPICA, M. M. Adipokines in breast milk and preterm infants. **Early Human Development**, v. 86, n. SUPPL. 1, p. 77–80, 2010.

SCHLOSS, P. D. et al. Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 23, p. 7537–7541, 2009.

SCHWIERTZ, A. et al. Development of the intestinal bacterial composition in hospitalized preterm infants in comparison with breast-fed, full-term infants. **Pediatric Research**, v. 54, n. 3, p. 393–399, 2003.

SINGHAL, A. et al. Dietary nucleotides and fecal microbiota in formula-fed infants: a randomized controlled trial. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 87, n. 6, p. 1785–92, 2008.

SOLÍS, G. et al. Establishment and development of lactic acid bacteria and bifidobacteria microbiota in breast-milk and the infant gut. **Anaerobe**, v. 16, n. 3, p. 307–10, 2010.

SU, Y. A. et al. Nucleotide sequence of the gelatinase gene (gelE) from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 1, p. 415–420, 1991.

TANAKA, K. et al. The pilot study: Sphingomyelin-fortified milk has a positive association with the neurobehavioural development of very low birth weight infants during infancy, randomized control trial. **Brain and Development**, v. 35, n. 1, p. 45–62, 2013.

TESHIMA, E. **Seleção de bactérias bífidas isoladas de lactentes e modulação da microbiota intestinal por meio de probióticos, prebióticos e simbióticos**. Viçosa-MG. Universidade Federal de Viçosa, 2001.

TURNBAUGH, P. J. et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature**, v. 444, n. 7122, p. 1027–31, 2006.

UAUY, R.; QUAN, R.; GIL, A. Role of nucleotides in intestinal development and repair: implications for infant nutrition. **The Journal of nutrition**, v. 124, n. 8 Suppl, p. 1436S–1441S, 1994.

VANHOUTTE, T. et al. Temporal stability analysis of the microbiota in human feces by denaturing gradient gel electrophoresis using universal and group-specific 16S rRNA gene primers. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 48, n. 3, p. 437–446, 2004.

VERSALOVIC, J. et al. Genomic fingerprint of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v. 5, p. 25–40, 1994.

VESTERLUND, S. et al. Safety assessment of *Lactobacillus* strains: Presence of putative risk factors in faecal, blood and probiotic isolates. **International Journal of Food Microbiology**, v. 116, n. 3, p. 325–331, 2007.

VINDEROLA, G. et al. Preservation of functionality of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1 after incorporation of freeze-dried cells into different food matrices. **Food Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 274–280, 2012.

WANG, Q. et al. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 16, p. 5261–5267, 2007.

WARD, R. E. et al. In vitro fermentation of breast milk oligosaccharides by

Bifidobacterium infantis and *Lactobacillus gasseri*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 6, p. 4497–4499, 2006.

WARD, T. L. et al. Human milk metagenome: a functional capacity analysis. **BMC Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 116, 2013.

WEST, P. A.; HEWITT, J. H.; MURPHY, O. M. The Influence of Methods of Collection and Storage on the Bacteriology of Human Milk. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 46, p. 269–277, 1979.

WOODMANSEY, E. J. et al. Comparison of compositions and metabolic activities of fecal microbiotas in young adults and in antibiotic-treated and non-antibiotic-treated elderly subjects. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 10, p. 6113–6122, 2004.

WORK GROUP ON BREASTFEEDING. Breastfeeding and the use of human milk. **Pediatrics**, v. 100, n. 6, p. 1035–1039, 1997.

YOON, M. Y.; KIM, Y. J.; HWANG, H.-J. Properties and safety aspects of *Enterococcus faecium* strains isolated from Chungkukjang, a fermented soy product. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, n. 5, p. 925–933, 2008.

ZWIELEHNER, J. et al. Combined PCR-DGGE fingerprinting and quantitative-PCR indicates shifts in fecal population sizes and diversity of *Bacteroides*, bifidobacteria and *Clostridium* cluster IV in institutionalized elderly. **Experimental Gerontology**, v. 44, n. 6–7, p. 440–6, 2009.

**ARTIGO 1: BACTÉRIAS LÁTICAS CULTIVÁVEIS PREDOMINANTES NO LEITE
HUMANO EM DIFERENTES FASES DA LACTAÇÃO**

Título: Bactérias lácticas cultiváveis predominantes no leite humano em diferentes fases da lactação

Autores:

Driene Gomes Gonzaga¹

Érika Carla Costa Brumano²

Poliane Alfenas Zerbini³

José Guilherme Prado Martin⁴

Sylvia do Carmo Castro Franceschini⁵

Célia Lúcia de Lucas Fortes Ferreira⁶

¹ Autor correspondente - Programa de Pós-Graduação de Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal de Viçosa (UFV) Av PH Rolfs, s/n, Campus Universitário, Viçosa-MG (driene@gmail.com)

² - Programa de Pós-Graduação de Ciência e Tecnologia de Alimentos - UFV (erikacarlacosta@yahoo.com.br)

³ - Professora Adjunto do Departamento de Microbiologia da UFV (palfenas@ufv.br)

⁴ - Professor Adjunto do Departamento de Microbiologia da UFV (guilherme.martin@ufv.br)

⁵ - Professora Titular do Departamento de Nutrição e Saúde da UFV (sylvia@ufv.br)

⁶ - Professora Titular do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFV (clferrei@ufv.br)

RESUMO

A microbiota do leite humano (LH) tem sido estudada há anos. Inicialmente considerava-se que as espécies microbianas presentes nessa matriz fossem consequência da contaminação devido manipulação inadequada. Após diversos estudos admitiu-se que os micro-organismos fazem parte da composição natural do leite e que desempenha diversas funções no organismo. O leite doado para bancos de leite humano (BLH) são alternativas para aqueles bebês que impossibilitados de receber o aleitamento materno. Para eliminar bactérias patogênicas o LH do BLH é pasteurizado, no entanto, esse processo elimina também as bactérias benéficas. Visto a importância dessas bactérias para o amadurecimento do trato gastro intestinal do neonato, o objetivo do presente trabalho foi identificar bactérias lácticas predominantes em diferentes fases da lactação, visando seu potencial de uso como suplemento de micro-organismos probióticos em BLH. Foram coletadas amostras de leite de onze voluntárias em cinco períodos da lactação (5, 15, 30, 60 e 90 dias após o parto). A partir do plaqueamento em profundidade em dois meios de cultura (MRS modificado e Rogosa) foram isoladas cinco colônias de cada placa da última diluição. Após a extração do DNA total, os isolados foram agrupados por meio de REP-PCR e identificados através da amplificação da região 16S do rDNA. Após a formação de 74 grupos, foram identificadas duas espécies: *Enterococcus faecalis* (presentes em todas as fases da lactação) e *Lactobacillus fermentum* (presente no leite maduro de duas mães). Diante dos dados apresentados é possível concluir que *E. faecalis* e *L. fermentum* podem ser considerados representantes do grupo das bactérias lácticas predominantes no LH em diferentes fases da lactação.

Palavras chave: Probióticos, REP-PCR, bancos de leite humano.

ABSTRACT

The human milk (HM) microbiota has been studied for years. Initially it was considered that the microbial species present in this food were a consequence of the contamination due to inadequate manipulation. After several studies it was recognized that the microorganisms are part of the natural composition of the milk and it performs various functions in the body. Milk donated to human milk banks (HMB) are alternatives for those infants who are unable to breastfeed. To eliminate pathogenic bacteria, the HM of HMB is pasteurized, however, this process also eliminates beneficial bacteria. Considering the importance of these bacteria for the maturation of the gastrointestinal tract of the neonate, the objective of the present study was to identify lactic bacteria predominant in different stages of lactation, aiming at its potential use as a supplement to probiotic microorganisms in HMB. Milk samples were collected from eleven volunteers in five lactation periods (5, 15, 30, 60 and 90 days postpartum). From the plating in depth in two culture media (modified MRS and Rogosa) five colonies of each plate of the last dilution were isolated. After extracting the total DNA, the isolates were pooled by REP-PCR and identified by amplification of the 16S rDNA region. After the formation of 74 groups, two species were identified: *Enterococcus faecalis* (present in all phases of lactation) and *Lactobacillus fermentum* (present in mature milk of two mothers). In view of the presented data it is possible to conclude that *E. faecalis* and *L. fermentum* can be considered representative of the group of lactic bacteria predominant from HM at different stages of lactation.

Key words: Probiotics, REP-PCR, human milk banks

1 INTRODUÇÃO

Sabe-se hoje que a microbiota do leite humano (LH) é composta por micro-organismos variados e que sua diversidade é influenciada multifatorialmente (HEIKKILA; SARIS, 2003; JIMÉNEZ et al., 2008; MARTÍN et al., 2007a; WEST; HEWITT; MURPHY, 1979). Em estudos iniciais com as técnicas disponíveis àquela época foram detectados poucos gêneros de bactérias presente no LH. Acreditava-se que ele era um fluido estéril e que só depois de ordenhado tornava-se substrato para alguns tipos de bactérias com potencial patogênico como as dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus* (WEST; HEWITT; MURPHY, 1979). Posteriormente admitiu-se que esses micro-organismos poderiam fazer parte da composição natural do LH (HEIKKILÄ; SARIS, 2003; NOVAK et al., 2001).

Com o passar dos anos, técnicas mais aprimoradas foram incorporadas aos estudos e maior quantidade de gêneros foi encontrada (BOIX-AMORÓS; COLLADO; MIRA, 2016; HEIKKILÄ; SARIS, 2003; OBERMAJER et al., 2015). O uso da reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento do RNA ribossomal possibilitou a detecção de gêneros como *Bifidobacterium*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Gemella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pseudomonas*, *Propionibacterium*, *Serratia*, *Weissella* entre outros (BOIX-AMORÓS; COLLADO; MIRA, 2016; JOST et al., 2013; KHODAYAR-PARDO et al., 2014).

Tem-se aventado que a microbiota intestinal inicial da criança é influenciada pela forma como acontece o parto. Aquelas que passam por parto vaginal são expostas a quantidade superior de espécies microbianas em comparação àquelas nascidas por parto cirúrgico (CABRERA-RUBIO et al., 2015; DOGRA et al., 2015; KHODAYAR-PARDO et al., 2014). Algumas espécies são adquiridas pela cavidade oral (DAVÉ et al., 2016; DOMINGUEZ-BELLO et al., 2010), outras pela superfície das mamas (DOMINGUEZ-BELLO et al., 2010) e possivelmente pelos ductos mamários (MARTÍN et al., 2012). No entanto, atualmente, o leite materno é considerado a principal fonte de bactérias responsáveis pelo amadurecimento do trato gastrointestinal (TGI) do recém-nascido (RN) (HUNT et al., 2011; JEURINK et al., 2013; MARTÍN et al., 2003, 2012; PALMER et al., 2007; RAUTAVA, 2016).

A microbiota intestinal do RN apresenta várias funções, entre elas, a maturidade imunológica e um papel importante nos processos de saúde e doença (MARTÍNEZ-ABAD et al., 2016). Em diversos estudos comprovou-se que substâncias provenientes do metabolismo de micro-organismos probióticos fazem parte de uma cadeia de respostas imunes extremamente importantes para a manutenção da saúde dos indivíduos, especialmente crianças recém nascidas que estão em pleno amadurecimento do sistema de defesa (DOGRA et al., 2015; KALLIOMAKI et al., 2008; WADA; LÖNNERDAL, 2014). Diante dos benefícios promovidos pela exposição do TGI a uma microbiota saudável é interessante pensar em terapias envolvendo micro-organismos probióticos que visem à redução do número de doenças autoimunes e alérgicas, bem como desordens metabólicas futuras (COLLADO et al., 2015).

Quando o LH não pode ser ofertado aos RNs, outras alternativas são necessárias e uma das opções consiste no uso de leites depositados em bancos de leite humano (BLH) (GARTNER et al., 2005; LANDERS; HARTMANN, 2013). O alimento alternativamente ofertado a esses bebês, que geralmente encontram-se internados em Unidades de Tratamento Intensivos Neonatais, é doado por mães que têm produção excedente. Ele passa por processo de pasteurização para evitar que micro-organismos patogênicos proliferem e comprometam ainda mais a condição de saúde dos usuários (BRASIL, 2006). Durante o procedimento, a microbiota endógena é eliminada por não resistir ao calor aplicado, com isso, os RN já fragilizados deixam de ser contemplados com os benefícios carreados pela presença de micro-organismos probióticos de em sua alimentação (SERAFINI et al., 2003).

O amadurecimento da microbiota do TGI está diretamente atrelado à sua exposição a micro-organismos e evolui ao longo do tempo (COLLADO et al., 2015). O conhecimento sobre micro-organismos isolados do LH em suas diversas fases de maturação e sua disponibilização para RN, considerando sua faixa etária, constitui uma importante inovação. Desta forma, conhecer e identificar a microbiota láctica predominante pode contribuir para o desenvolvimento de uma possível fonte de bactérias para suplementação do leite depositado em BLH. Isso representa devolver ao LH o seu papel de provedor de micro-organismos benéficos ao RN. Além disso, o fato de se utilizarem bactérias isoladas da própria fonte propicia maiores chances de

adaptação das mesmas ao TGI do neonato. O objetivo do presente estudo foi identificar bactérias lácticas predominantes em diferentes fases da lactação visando seu potencial de uso como suplemento de micro-organismos probióticos em BLH.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização do estudo o projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e foi aprovado com o parecer número 663.168.

2.1 Coleta de amostras e isolamento dos micro-organismos

Os micro-organismos utilizados foram isolados de LH coletado de 11 mães voluntárias com idade gestacional a termo, procedentes de parto normal ou cirúrgico, com amamentação materna exclusiva, que gozavam de perfeitas condições de saúde, não sendo portadoras de doenças crônicas e/ou contagiosas. Considerou-se apenas aquelas que não fizeram o uso de antibióticos ou outros medicamentos nas semanas anteriores ao parto até o momento da coleta e que não apresentavam dificuldades na amamentação. As amostras foram coletadas de forma asséptica, em cinco períodos: 5, 15, 30, 60 e 90 dias após o parto. Após a coleta, as amostras foram transportadas em ambiente refrigerado (10 °C) e imediatamente diluídas para realização do plaqueamento.

Para o isolamento de bactérias do ácido láctico (BAL) de interesse, foram utilizadas técnicas de plaqueamento em profundidade nos meios de cultura clássicos indicados na literatura, quais sejam: Ágar MRS (De Man, Rogosa e Sharpe, Difco, Michigan, USA) (DE MAN; ROGOSA; SHAPE, 1960) modificado com adição de 1% (v/v) de solução contendo 0,05% (v/v) de cisteína e 5% (v/v) dos antibióticos neomicina, paramonicina, ácido nalidíxico e cloreto de lítio (NPNL) (TERAGUCHI et al., 1978) e Ágar Rogosa (Rogosa, Difco, Michigan, USA) (ROGOSA; MITCHELL; WISEMAN, 1951) comumente utilizados para isolamento de *Bifidobacterium* spp. e de *Lactobacillus* spp respectivamente. Seguiu-se incubação a 37 ± 1 °C por 48 horas em anaerobiose (Anaerobac, Probac do Brasil Produtos Bacteriológicos, São Paulo, Brasil).

De cada placa da maior diluição em que foi observado crescimento foram retiradas cinco colônias isoladas que foram mantidas sob congelamento em ultrafreezer (-80 °C) em caldo MRS adicionado de crioprotetor (glicerol 20%). Após

isolamento e reativação dos isolados, estes foram submetidos a coloração de Gram para verificação da pureza e determinação morfológica (HOLDEMAN; CATO; MOORE, 1987).

Os isolados que cresceram após a reativação e apresentaram culturas puras foram submetidos à extração de DNA para agrupamento e identificação.

2.2 Extração do DNA genômico

Após ativação dos isolados, 1,0 mL de cada solução contendo micro-organismo multiplicado foi transferido para um microtubo e centrifugado a 15000 x g por 3 min. A extração do DNA foi realizada utilizando o *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* da Promega A1125 (Promega, Madison, EUA), seguindo as instruções do fabricante. A solução contendo DNA foi quantificada em espectrofotômetro a 260-280 nm (NanoDrop 2000 spectrophotometer – Thermo Scientific, Wilmington USA). Após quantificação, as soluções contendo o DNA foram estocadas a -20 °C até o momento das análises.

2.3 Agrupamento dos isolados por meio de REP-PCR

Objetivando-se agrupar os isolados para posterior identificação, realizou-se REP-PCR, que baseia-se na amplificação de uma região móvel do DNA de acordo com técnica descrita anteriormente (VERSALOVIC et al., 1994). A REP-PCR foi conduzida utilizando-se o *primer* (GTG)₅ (5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3' (DAL BELLO et al., 2010). As reações de PCR foram realizadas com volume final de 25 µL utilizando-se *Go Taq Master Mix* (Promega), 50 pMol do *primer*, 1 µL de DNA na concentração aproximada de 80 ng.mL⁻¹ e água ultra pura para PCR (Promega). As condições da reação foram: 94 °C por 2', 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 45", anelamento a 46 °C por 45" e extensão a 72 °C por 100" e extensão final de 72 °C por 10'. Os fragmentos resultantes foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1 % (m/v) por 2 h a uma voltagem de 110 V em tampão TBE (Tris/Borato/ EDTA) pH 8,0. Para revelação das bandas as amostras foram coradas com solução brometo de etídio (0,5 mg.mL⁻¹) e visualizadas em luz ultravioleta (LPIX – EX, Loccus

Biotecnologia, São Paulo, Brasil). Os padrões de bandas obtidos foram analisados utilizando-se o programa *Bionumerics* 6.0 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) e a similaridade entre os isolados foi calculada utilizando-se a correlação de Pearson. Construiu-se dendograma utilizando-se Unweighted Pair Group Method with Arithmetic (UPGMA) (DAL BELLO et al., 2010; GEVERS; HUYS; SWINGS, 2001; VERSALOVIC et al., 1994).

2.4 Amplificação e sequenciamento do gene 16S rDNA

Para a amplificação do DNA da região 16S do rDNA foram utilizados os *primers* universais P027 (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') e R1492 (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCTCAG-3') que amplificaram um, fragmento de 3 aproximadamente 1500 pares de bases entre as posições 27 e 1492 do gene rDNA (OLIVEIRA et al., 2013). A reação foi padronizada para volume final de 25 μ L utilizando-se *GoTaq® Green Master Mix* da Promega. As amostras foram amplificadas em termociclador moledo MJ96 (Biocycler Termocicladores, Biosystems Importadora Ltda, Curitiba, Brasil) utilizando-se a seguinte programação: 94 °C por 4', 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30", anelamento a 63 °C por 60" e extensão a 72 °C por 90" e finalizado com extensão de 72 °C por 7'. (OLIVEIRA et al., 2013). Os produtos de reação da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1 % (m/v), utilizando-se o marcador de 1 kb DNA Ladder RTU (Read-to-use – 250 a 10.000 pb), corado com solução de brometo de etídio (0,5 mg.mL⁻¹) e visualizado sob luz ultravioleta para confirmação da amplificação dos fragmentos. Após confirmação, os fragmentos foram enviados para empresa *Macrogen Inc.* (Seoul, Korea) onde foram purificados e sequenciados pelo método Sanger.

Regiões das sequências com qualidade inferior a 25 na escala Phred foram aparadas e as regiões remanescentes foram alinhadas para obtenção da sequência consenso utilizando-se o programa *Geneious Trial version 10.0.7* (KEARSE et al., 2012). As distâncias entre pares de sequências foram calculadas e utilizadas para agrupá-las em Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs) com similaridade de 97% pelo programa *Mothur* (SCHLOSS et al., 2009). A anotação taxonômica foi realizada utilizando-se sequências do banco de dados SILVA (QUAST et al., 2013).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O foco deste estudo foi o uso de bactérias com potencial probiótico em BLH, para isso, é necessário que as mesmas sejam cultiváveis, razão pela qual o estudo foi realizado com isolamento em meios de cultura clássicos. Sendo assim, o isolamento de cinco colônias de dois meios de cultura (Rogosa e MRS modificado) em cinco fases da lactação de cada uma das onze mães resultariam em um total de 550 isolados. No entanto, não houve crescimento em todas as amostras. Além disso, após o congelamento, alguns isolados não apresentaram crescimento, o que impediu a recuperação de todos os isolados iniciais. Os 251 isolados que constituem o universo dessa pesquisa, além da situação indicada, resultaram da conformidade desejada na coloração de Gram (cocos e bacilos gram positivos).

Uma análise que leva em consideração não apenas a morfologia observada mas também características genotípicas dos isolados permite o agrupamento dos mesmos e ainda elucida tendências genéticas da população em questão. Assim a REP-PCR é uma técnica que utiliza a reação da cadeia da polimerase para amplificar regiões palindrômicas repetitivas do DNA em diferentes partes do genoma (VERSALOVIC et al., 1994). O *primer* anela-se em regiões distintas e gera fragmentos de tamanhos variados que posteriormente são separados em gel de eletroforese. Espera-se que bactérias com genomas semelhantes amplifiquem fragmentos semelhantes e apresentem padrões de bandas com relativa proximidade que permita a distinção entre espécies mais distantes filogeneticamente (TERZIC-VIDOJEVIC; LOZO; TOPISIROVIC, 2009).

Com a análise agrupamento (UPGMA) realizada entre os 251 isolados após a REP-PCR obteve-se a formação de 74 grupos, ao considerar a similaridade de 90%. Assim, 74 isolados representativos foram identificados por meio do sequenciamento de parte do gene rDNA16S, revelando a presença de duas espécies, *Enterococcus faecalis* (n=68) e *Lactobacillus fermentum* (n=6).

Ao unir os resultados da REP-PCR e dos sequenciamentos observa-se coerência entre eles. A medida das distâncias euclidianas entre os indivíduos na REP-PCR gerou uma matriz de similaridade em que cada local onde as bandas estiveram presentes no gel representa um componente. Com esses dados foi possível fazer uma

análise de componentes principais e diagramar a distância entre os indivíduos baseados na correlação de Pearson existentes entre eles (FIGURA 1).

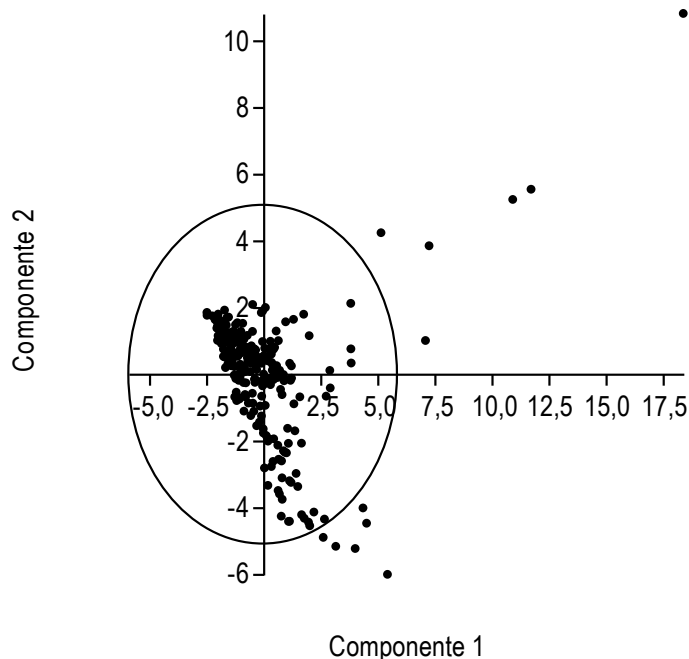


FIGURA 1 – Análise dos componentes principais baseada na matriz de similaridade gerada pela comparação dos padrões de bandas em gel de eletroforese de produtos de REP-PCR de bactérias do leite humano em diferentes fases da lactação. A elipse engloba a região em que 97% dos indivíduos encontra-se. (n=251)

A elipse projetada no centro da Figura 1 engloba a região onde 97% dos indivíduos se encontram. O que mostra a congruência entre os resultados da identificação dos isolados e da REP-PCR. Identificou-se que a população de *L. fermentum* corresponde a 2,39% do total. Os doze pontos situados fora da elipse correspondem aos seis *L. fermentum* identificados e também a outros *E. faecalis* que diferenciam-se dos outros que encontram-se dentro da elipse. Ao considerar que as colônias foram obtidas em cada tempo de lactação na mesma placa de maior diluição, é possível que várias estirpes da mesma espécie tenham sido isoladas.

Embora estudos indiquem a abundância de espécies dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* no LH (GUEIMONDE et al., 2007; MARTÍN et al., 2003, 2004, 2009;

SOTO et al., 2014), o presente estudo diverge de tais afirmativas considerando-se espécies cultiváveis, no entanto, corrobora algumas publicações que indicam que a presença do gênero *Lactobacillus* é inferior a 10% da microbiota total avaliada (HEIKKILA; SARIS, 2003; JIMÉNEZ et al., 2008; SOLÍS et al., 2010). Diferentemente da maioria dos estudos disponíveis na literatura, em que as coletas de amostras foram predominantemente pontuais, a proposta desse trabalho foi verificar a predominância de BAL nas diferentes fases da maturação do LH ao longo de 90 dias.

A aplicação de técnicas específicas desconsidera a presença de algumas espécies e evidenciam outras, que não necessariamente encontram-se naquele meio em alta concentração. A análise genotípica de microbiomas também não leva em consideração a viabilidade dos micro-organismos em questão, o que sugere cautela ao se comparar resultados (QUIGLEY et al., 2011). Por esses e outros motivos, a comparação da prevalência das espécies identificadas em cada estudo não pode ser realizada, porém, o conhecimento buscado é resultado da soma de várias pesquisas.

A sobrevivência de espécies bacterianas no LH pode ser determinada pelas alterações químicas da matriz, que podem favorecer determinadas espécies em detrimento de outras (WANG et al., 2015). A composição de macro nutrientes do leite modifica-se ao longo do tempo. O colostro, leite ofertado ao bebê nos primeiros dias, possui alta concentração de proteína comparado às fases tardias. Após o décimo quinto dia de vida do lactente tem-se então leite maduro, mais rico em carboidratos que no início da lactação. Entre um estágio e outro está o leite de transição, com níveis de carboidratos, proteínas e lipídios intermediários comparado as outras duas fases (BALLARD; MORROW, 2013; MARTINS; TUMA; FALCÃO, 2003). Essa seria uma das causas do dinamismo da comunidade microbiana, já que a disponibilidade de nutrientes afeta a sobrevivência das espécies.

Os isolados identificados como *L. fermentum* foram coletados de amostras de leite maduro provenientes de duas mães distintas, sendo uma aos 60 e outra aos 90 dias após o parto (TABELA 1). Em todos os outros tempos de coleta com todas as mães, a espécie identificada foi *E. faecalis*. Desta forma, nas condições analisadas, pode-se afirmar que *E. faecalis* é a espécie predominante no leite humano em todas as fases da lactação. E que *L. fermentum* podem eventualmente fazer parte da microbiota do leite em sua fase tardia.

TABELA 1 – Incidência de *Enterococcus faecalis* e *Lactobacillus fermentum* no leite materno em diferentes estágios de lactação.

Mãe	Tempos de Lactação									
	5 dias		15 dias		30 dias		60 dias		90 dias	
	L	E	L	E	L	E	L	E	L	E
1	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+
2	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
3	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
4	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
5	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+
6	*	*	-	+	-	+	-	+	-	+
7	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
8	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
9	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
10	-	+	-	+	-	+	-	+	**	**
11	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+

L = *L. fermentum*; E = *E. faecalis*; + = Presente; - = Ausente; * = Nenhuma cultura foi isolada; ** = Amamentação descontinuada; 5 dias = Colostro, 15 dias = Leite de transição, 30, 60 e 90 dias = Leite maduro.

O crescimento de bactérias selvagens em meios específicos para isolamento nem sempre acontece, já que o ambiente natural de onde elas foram retiradas conta com inúmeros fatores facilitadores da sua sobrevivência, que culminam na sua adaptação. Desta forma, observa-se no presente estudo a perda de um grande número dessas espécies, que não adaptaram-se aos meios de cultivo comerciais (JOST et al., 2013). Entretanto, como o propósito é obter espécies cultivadas para a suplementação de leite de banco de leite, não é interessante seguir adiante com bactérias que exigem condições muito especiais para o seu crescimento, isso dificultaria a rotina de administração das mesmas.

A divergência entre as espécies identificadas e as originalmente pesquisadas foi constatada anteriormente (JOST et al., 2013) e chama atenção para a fragilidade da especificidade e seletividade dos meios disponíveis atualmente. Evidencia-se então a necessidade de progresso nessa área, já que o trabalho com probióticos torna-se inviável sem a disponibilidade de meios de cultura especialmente desenhados para esta atividade.

De forma geral, os resultados obtidos seguem a linha da literatura recente que apontam o desafio de se compreender os mecanismos e finalidade da presença massiva de alguns micro-organismos no LH, como espécies do gênero *Enterococcus* e *Bacterioides*, por exemplo, além de gêneros que até muito recentemente eram tidos como indesejáveis (JOST et al., 2014; KHODAYAR-PARDO et al., 2014; NOVAK et

al., 2001). A presença abundante de bactérias dos gêneros *Enterococcus* e *Staphylococcus* é entendida como um agente desafiador ao organismo do neonato e isso faz parte da evolução do microbioma (NOVAK et al., 2001). Essas espécies microbianas podem ter a função de instigar o sistema imunológico imaturo da criança preparando-o para o desafio da defesa contra micro-organismos patogênicos no futuro (JOST et al., 2013). Os produtos metabólicos dessas espécies também podem estar relacionados com o preparo do ambiente intestinal para o posterior aporte de outras espécies também importantes.

Os benefícios atribuídos à presença de bactérias do gênero *Lactobacillus* no TGI são largamente conhecidos e ainda são frequentemente estudados. A capacidade de formação de biofilme (AOUDIA et al., 2016), propriedades imunomoduladoras (OLIVARES et al., 2006, 2007) e a habilidade de inibir espécies patogênicas (TULUMOĞLU; KAYA; ŞİMŞEK, 2014) foram consideradas importantes características probióticas de representantes desse gênero. Já as bactérias do gênero *Enterococcus* estão envolvidas em episódios em que a saúde do indivíduo foi afetada (BARBOSA-RIBEIRO et al., 2016; DONOHUE; SALMINEN, 1996; YANG et al., 2015). No entanto, estudos demonstraram a presença de representantes desse grupo sem que alguma enfermidade estivesse envolvida (DONOHUE; SALMINEN, 1996; GOMES et al., 2008; YOON; KIM; HWANG, 2008). Um estudo do genoma de diversas estirpes de *E. faecalis* procurou a distinção de espécies altamente virulentas de inofensivas comensais e obteve resultados coesos. Foi demonstrado que a capacidade de gerar infecção no indivíduo é resultado de uma complexa interação de genes e não somente a presença ou ausência dos mesmos (SOLHEIM et al., 2009).

A identificação dessas espécies presentes no LH pode colaborar no esclarecimento do real papel da microbiota do LH no amadurecimento de TGI dos neonatos. Ao elucidar quais são os representantes do grupo das bactérias lácticas cultiváveis, podem-se direcionar estudos mais específicos em relação à segurança, funcionalidade e a viabilidade tecnológica das espécies isoladas, que podem ser um diferencial no tratamento de enfermidades para público alvo específico.

4 CONCLUSÃO

Uma hipótese putativa do real papel dos diferentes micro-organismos no LH ainda permeia a comunidade científica mas o fato é que esses micro-organismos estão presentes nessa matriz alimentar e que pela periodicidade de presença em diferentes estágios além da considerável concentração, a sua função não deve ser ignorada. Conhecer as espécies predominantes e mais adaptadas a cada fase da lactação além de complementar a necessidade do RN, aproxima ainda mais do natural o leite de BLH que eventualmente venha a ser suplementado com esses micro-organismos. Diante dos dados apresentados é possível concluir que *E. faecalis* e *L. n fermentum* podem ser considerados representantes do grupo das bactérias lácticas predominantes no LH em diferentes fases da lactação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOUDIA, N. et al. Biofilms of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum*: Effect on stress responses, antagonistic effects on pathogen growth and immunomodulatory properties. **Food Microbiology**, v. 53, p. 51–59, 2016.
- BALLARD, O.; MORROW, A. L. Human Milk Composition. Nutrients and Bioactive Factors. **Pediatric Clinics of North America**, v. 60, n. 1, p. 49–74, 2013.
- BARBOSA-RIBEIRO, M. et al. Antimicrobial susceptibility and characterization of virulence genes of enterococcus faecalis isolates from teeth with failure of the endodontic treatment. **Journal of Endodontics**, v. 42, n. 7, p. 1022–1028, 2016.
- BOIX-AMORÓS, A.; COLLADO, M. C.; MIRA, A. Relationship between Milk Microbiota, Bacterial Load, Macronutrients, and Human Cells during Lactation. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1–9, 2016.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária RDC nº171, de 4 de setembro de 2006. Dispõe sobre Regulamento Técnico para o funcionamento de Bancos de Leite Humano. 2006.
- CABRERA-RUBIO, R. et al. Impact of mode of delivery on the milk microbiota composition of healthy women. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 7, p. 1–7, 2015.
- COLLADO, M. C. et al. Gut microbiota : a source of novel tools to reduce the risk of human disease ? v. 77, n. 1, 2015.
- DAL BELLO, B. et al. Microbial ecology of artisanal products from North West of Italy and antimicrobial activity of the autochthonous populations. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 7, p. 1151–1159, 2010.
- DAVÉ, V. et al. Bacterial microbiome of breast milk and child saliva from low-income Mexican-American women and children. **Pediatric Research**, v. 79, n. 6, p. 846–854, 3 jun. 2016.
- DE MAN, J. C.; ROGOSA, M.; SHAPE, M. E. A medium for the cultivation of *Lactocacilli*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 23, n. 1, p. 130–135, 1960.
- DOGRA, S. et al. Dynamics of infant gut microbiota are influenced by delivery mode and gestational duration and are associated with subsequent adiposity. **mBio**, v. 6, n. 1, p. 1–9, 2015.
- DOMINGUEZ-BELLO, M. G. et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 26, p. 11971–11975, 29 jun. 2010.
- DONOHUE, D. C.; SALMINEN, S. Safety of probiotic bacteria. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 5, p. 25–28, 1996.

GARTNER, L. M. et al. Breastfeeding and the use of human milk. **Pediatrics**, v. 115, n. 2, p. 496–506, 2005.

GEVERS, D.; HUYS, G.; SWINGS, J. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. **FEMS Microbiology Letters**, v. 205, n. 1, p. 31–6, 2001.

GOMES, B. C. et al. Prevalence and characterization of *Enterococcus spp.* isolated from Brazilian foods. **Food Microbiology**, v. 25, n. 5, p. 668–675, 2008.

GUEIMONDE, M. et al. Breast Milk: A Source of Bifidobacteria for Infant Gut Development and Maturation ? **Neonatology**, v. 92, p. 64–66, 2007.

HEIKKILÄ, M. P.; SARIS, P. E. J. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 3, p. 471–478, 2003.

HOLDEMAN, L. V. ; CATO, E. P. ; MOORE, W. E. C. **Anaerobe Laboratory Manual**. Blacksburg - USA: Virginia Polytechnic Institute and State University, 1987.

HUNT, K. M. et al. Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, p. 1–8, 2011.

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

JIMÉNEZ, E. et al. Assessment of the bacterial diversity of human colostrum and screening of *Staphylococcal* and *Enterococcal* populations for potential virulence factors. **Research in Microbiology**, v. 159, n. 9–10, p. 595–601, 2008.

JOST, T. et al. Assessment of bacterial diversity in breast milk using culture-dependent and culture-independent approaches British Journal of Nutrition. **British Journal of Nutrition**, v. 110, p. 1253–1262, 2013.

JOST, T. et al. Vertical mother-neonate transfer of maternal gut bacteria via breastfeeding. **Environmental Microbiology**, v. 16, n. 9, p. 2891–2904, 2014.

KALLIOMAKI, M. et al. Early differences in fecal microbiota composition in children may. **American Journal of Clinical Nutrition**, n. 1, p. 534–538, 2008.

KEARSE, M. et al. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p. 1647–1649, 2012.

KHODAYAR-PARDO, P. et al. Impact of lactation stage, gestational age and mode of delivery on breast milk microbiota. **Journal of Perinatology**, v. 34, n. 8, p. 599–605, 2014.

LANDERS, S.; HARTMANN, B. T. Donor Human Milk Banking and the Emergence of Milk Sharing. **Pediatric Clinics of North America**, v. 60, n. 1, p. 247–260, 2013.

MARTÍN, R. et al. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. **The Journal of Pediatrics**, v. 143, n. 6, p. 754–758, dez. 2003.

MARTÍN, R. et al. The commensal microflora of human milk: New perspectives for food bacteriotherapy and probiotics. **Trends in Food Science and Technology**, v. 15, n. 3–4, p. 121–127, 2004.

MARTÍN, R. et al. Diversity of the *Lactobacillus* group in breast milk and vagina of healthy women and potential role in the colonization of the infant gut. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 6, p. 2638–2644, 2007a.

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

MARTÍN, R. et al. Isolation of Bifidobacteria from Breast Milk and Assessment of the Bifidobacterial Population by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Quantitative Real-Time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 4, p. 965–969, 2009.

MARTÍN, V. et al. Sharing of Bacterial Strains Between Breast Milk and Infant Feces. **Journal of Human Lactation**, v. 28, n. 1, p. 36–44, fev. 2012.

MARTÍNEZ-ABAD, B. et al. Differential immunomodulatory effects of *Lactobacillus rhamnosus* DR20, *Lactobacillus fermentum* CECT 5716 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* on monocyte-derived dendritic cells. **Journal of Functional Foods**, v. 22, p. 300–312, 2016.

MARTINS, V.; TUMA, L.; FALCÃO, M. C. Composição do leite humano : o alimento ideal, **Revista de Medicina (São Paulo)**, v. 82, n. 1, p. 1–10, 2003.

NOVAK, F. R. et al. Coloostro humano : fonte natural de probióticos? **Journal of Pediatrics**, v. 77, n. 4, p. 265–270, 2001.

OBERMAJER, T. et al. Colostrum of Healthy Slovenian Mothers: Microbiota Composition and Bacteriocin Gene Prevalence. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, p. e0123324, 2015.

OLIVARES, M. et al. The consumption of two new probiotic strains, *Lactobacillus gasseri* CECT 5714 and *Lactobacillus coryniformis* CECT 5711, boosts the immune system of healthy humans. **International Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 47–52, 2006.

OLIVARES, M. et al. Oral intake of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 enhances the effects of influenza vaccination. **Nutrition**, v. 23, n. 3, p. 254–260, 2007.

OLIVEIRA, M. N. V et al. Endophytic microbial diversity in coffee cherries of *Coffea arabica* from southeastern Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 59, n. 4, p. 221–30, 2013.

PALMER, C. et al. Development of the human infant intestinal microbiota. **PLoS**

Biology, v. 5, n. 7, p. 1556–1573, 2007.

QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. D590–D596, 2013.

QUIGLEY, L. et al. Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 150, p. 81–94, 2011.

RAUTAVA, S. Early microbial contact, the breast milk microbiome and child health. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 7, n. 1, p. 5–14, 2016.

ROGOSA, M.; MITCHELL, J. A.; WISEMAN, R. F. A selective medium for the isolation and enumeration of oral and fecal *Lactobacilli*. **Journal of Bacteriology**, v. 62, p. 132–133, 1951.

SCHLOSS, P. D. et al. Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 23, p. 7537–7541, 2009.

SERAFINI, A. B. et al. Microbiological quality of human milk from a Brazilian milk bank. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, n. 6, p. 775–779, 2003.

SOLHEIM, M. et al. Comparative genomics of *Enterococcus faecalis* from healthy Norwegian infants. **BMC genomics**, v. 10, p. 194, 2009.

SOLÍS, G. et al. Establishment and development of lactic acid bacteria and bifidobacteria microbiota in breast-milk and the infant gut. **Anaerobe**, v. 16, n. 3, p. 307–10, 2010.

SOTO, A. et al. *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* in Human Breast Milk. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 59, n. 1, p. 78–88, 2014.

TERAGUCHI, S. et al. Enumeration of *Bifidobacteria* in dairy products. **Japanese Journal of Bacteriology**, v. 33, p. 753–761, 1978.

TERZIC-VIDOJEVIC, A.; LOZO, J.; TOPISIROVIC, L. Dominant lactic acid bacteria in artisanal Pirot cheeses of different ripening period. **Genetika**, v. 41, n. 3, p. 339–352, 2009.

TULUMOĞLU, Ş.; KAYA, H. I.; ŞİMŞEK, Ö. Probiotic characteristics of *Lactobacillus fermentum* strains isolated from tulum cheese. **Anaerobe**, v. 30, p. 120–125, 2014.

VERSALOVIC, J. et al. Genomic fingerprint of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v. 5, p. 25–40, 1994.

WADA, Y.; LÖNNERDAL, B. Bioactive peptides derived from human milk proteins —

mechanisms of action. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 25, n. 5, p. 503–514, 2014.

WANG, M. et al. Fecal Microbiota Composition of Breast-Fed Infants Is Correlated With Human Milk Oligosaccharides Consumed. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 60, n. 6, p. 825–833, 2015.

WARD, T. L. et al. Human milk metagenome: a functional capacity analysis. **BMC Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 116, 2013.

WEST, P. A.; HEWITT, J. H.; MURPHY, O. M. The Influence of Methods of Collection and Storage on the Bacteriology of Human Milk. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 46, p. 269–277, 1979.

YANG, J. et al. Molecular characterization of resistance, virulence and clonality in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*: A hospital-based study in Beijing, China. **Infection, genetics and evolution**, v. 33, n. May, p. 253–60, 2015.

YOON, M. Y.; KIM, Y. J.; HWANG, H. J. Properties and safety aspects of *Enterococcus faecium* strains isolated from Chungkukjang, a fermented soy product. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, n. 5, p. 925–933, 2008.

**ARTIGO 2: SELEÇÃO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DO LEITE HUMANO COM
POTENCIAL PARA USO EM BANCOS DE LEITE**

Título: Seleção de bactérias isoladas do leite humano com potencial para uso em bancos de leite

Autores: Driene Gomes Gonzaga¹

Érika Carla Costa Brumano²

Poliane Alfenas Zerbini³

José Guilherme Prado Martin⁴

Monique Renon Eller⁵

Célia Lúcia de Lucas Fortes Ferreira⁶

¹ Autor correspondente - Programa de Pós-Graduação de Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal de Viçosa (UFV) Av PH Rofls, s/n, Campus Universitário, Viçosa-MG (driene@gmail.com)

² - Doutora UFV (erikacarlacosta@yahoo.com.br)

³ - Professora Adjunto do Departamento de Microbiologia da UFV (palfenas@ufv.br)

⁴ - Professor Adjunto do Departamento de Microbiologia da UFV (guilherme.martin@ufv.br)

⁵ - Professora Adjunto do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFV (Monique.eller@gmail.com.br)

⁶ - Professora Titular do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFV (clferrei@ufv.br)

RESUMO

O leite humano tem a função de fornecer nutrientes e também outras substâncias responsáveis pela defesa do organismo contra ameaças externas nos primeiros dias de vida. Por diversos motivos, alguns recém-nascidos não podem consumir o leite produzido pelas próprias mães e a alternativa é o leite depositado em bancos de leite. Para eliminar micro-organismos patogênicos o leite recebido nos bancos é pasteurizado mas com isso também são eliminadas bactérias benéficas. O presente estudo teve como objetivo selecionar bactérias com potencial para uso em bancos de leite humano. Para isso, estirpes de *Enterococcus faecalis* (n=6) e de *Lactobacillus fermentum* (n=6) foram avaliadas quanto a aspectos de segurança, como capacidade de produção da hemolisina, atividade da enzima gelatinase, susceptibilidade a antibióticos e verificação da forma isomérica do ácido láctico produzido. A funcionalidade foi verificada por meio de teste de resistência ao suco gástrico e a sais biliares e antagonismo a patógenos indicadores. As culturas foram liofilizadas e novamente avaliadas. Todas as estirpes resistiram ao processo de liofilização e foram classificadas como não β -hemolíticas, gelatinase negativas, resistentes ao suco gástrico e a sais biliares e com capacidade de antagonizar patógenos. Nenhum isolado foi sensível a todos antibióticos testados, porém, a sensibilidade de alguns aumentou após a secagem. Todos produziram ácido láctico nas duas forma isoméricas. O isolado 106 produziu L(+)-ácido láctico em maior proporção independente de ser liofilizado ou não. Com os resultados obtidos não é possível indicar nenhuma das estirpes estudadas para uso imediato em bancos de leite. O entendimento do real papel dessas bactérias no leite humano é necessário para que esses isolados possam ser considerados probióticos e possam ser reincorporados ao leite de BLH.

Palavras chave: Bactérias probióticas, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus fermentum*, liofilização.

ABSTRACT

Human milk (HM) has the function of providing nutrients and other substances responsible for defending the body against external threats in the first days of life. For various reasons, some newborns can not consume the milk produced by the mothers themselves and the alternative is milk deposited in milk banks (HMB). To eliminate pathogenic microorganisms, the milk received in the banks is pasteurized but with this also beneficial bacteria are eliminated. The present study aimed to select bacteria with potential for use in human milk banks. For this, strains of *Enterococcus faecalis* (n = 6) and *Lactobacillus fermentum* (n = 6) were evaluated for safety aspects, such as hemolysin production capacity, gelatinase enzyme activity, antibiotic susceptibility and isomer lactic acid produced. The functionality was verified through resistance test to gastric juice and to bile salts and antagonism to indicator pathogens. The cultures were lyophilized and retested. All strains resisted the lyophilization process and were classified as non- β -hemolytic, gelatinase negative, resistant to gastric juice and bile salts and capable of antagonizing pathogens. No isolates were sensitive to all antibiotics tested, however, the sensitivity of some increased after drying. All produced lactic acid in the two isomeric forms. Isolate 106 produced L (+) - lactic acid to a greater extent regardless of whether it was lyophilized or not. With the results obtained it is not possible to indicate any of the strains studied for immediate use in milk banks. Understanding the true role of these bacteria in human milk is necessary so that these isolates can be considered as probiotics and can be reincorporated into HMB milk.

Key words: Probiotic bacteria, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus fermentum*, lyophilization.

1 INTRODUÇÃO

O leite humano (LH) é um alimento complexo que além de prover a nutrição dos recém-nascidos (RNs), é responsável por carrear diversos compostos bioativos de extrema importância para a saúde e crescimento dos neonatos (BRANDTZAEG, 2007; KRAMER; KAKUMA, 2002). Ele também é a fonte de bactérias essenciais para o amadurecimento do trato gastrointestinal (TGI) do bebê (COLLADO; DELGADO; MALDONADO, 2009).

Como um órgão ativo, a microbiota intestinal apresenta modificações em cada fase da vida (GRZEŚKOWIAK et al., 2012; PALMER et al., 2007; ZWIELEHNER et al., 2009). O processo de colonização do TGI humano inicia-se no nascimento e a partir desse momento diversas alterações são observadas (MATAMOROS et al., 2013). Paralelamente a isso, a composição básica do LH varia de acordo com as necessidades do RN e identifica-se três fases: o colostro, o leite de transição e o leite maduro (BALLARD; MORROW, 2013; MARTINS; TUMA; FALCÃO, 2003). As alterações observadas no processo de colonização da microbiota intestinal, tão importantes para a saúde do neonato, estão relacionadas às modificações na composição que ocorrem durante essas fases da lactação. O favorecimento do desenvolvimento de espécies de bactérias benéficas garante proteção ao indivíduo ao longo da vida (DE LA COCHETIÈRE et al., 2008; SAVINO; LIGUORI; LUPICA, 2010).

Devido a alguns fatores específicos como baixa produção láctea e enfermidades que acometem as mães, nem sempre é possível que a amamentação ocorra (GARTNER et al., 2005). As alternativas são o uso de fórmulas infantis ou o uso de leite proveniente de mães doadoras. Os bancos de leite humano (BLH) são instituições responsáveis pela coleta, processamento, estocagem e distribuição do leite para os RNs que por algum motivo não podem receber aleitamento materno direto (ANVISA, 2008). Nesses locais, o leite recebido é pasteurizado para que bactérias patogênicas sejam eliminadas e não ofereçam risco a quem os consome (BRASIL, 2006). Essa etapa é de extrema importância para evitar riscos à saúde dos RN,

principalmente aqueles com maior vulnerabilidade. Porém, esse processo também elimina as bactérias que poderiam trazer benefícios ao TGI.

A reconhecida importância da composição da microbiota intestinal impulsiona a realização de novas pesquisas. A seleção de bactérias que possam ser recolocadas no leite já pasteurizado apresenta-se como relevante inovação. Esses microorganismos devem ser seguros do ponto de vista microbiológico, ou seja, não podem apresentar nenhuma característica de potencial patogênico, devem preferencialmente apresentar propriedades funcionais, causando a melhora do estado de saúde do indivíduo, e ainda serem tecnologicamente viáveis para que possam ser incorporadas novamente na matriz láctea (SAARELA et al., 2000). Nesse caso, a liofilização tem se apresentado como a técnica mais eficiente para preservação e veiculação dos microorganismos em questão (VINDEROLA et al., 2012).

Reconhecida a necessidade de estudos voltados para a resolução dos problemas apresentados, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar fenotipicamente e selecionar bactérias visando o seu potencial para uso em BLH.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização do estudo, o projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e aprovado sob o parecer número 663.168.

2.1 Origem dos micro-organismos

Os micro-organismos utilizados foram isoladas de LH coletado de onze mães voluntárias de forma asséptica, em cinco períodos: 5, 15, 30, 60 e 90 dias após o parto. Para o isolamento de bactérias do ácido láctico (BAL) de interesse, foram utilizadas técnicas de plaqueamento em profundidade nos meios de cultura MRS (De Man, Rogosa e Sharpe, Difco, Michigan, USA (DE MAN; ROGOSA; SHAPE, 1960) modificado com adição de 1% (v/v) de solução contendo 0,05% (v/v) de cisteína e 5% (v/v) dos antibióticos neomicina, paramonicina, ácido nalidíxico e cloreto de lítio (NPNL) (TERAGUCHI et al., 1978) e Ágar Rogosa (Rogosa, Difco, Michigan, USA) (ROGOSA; MITCHELL; WISEMAN, 1951).

De cada placa da maior diluição em que foi observado crescimento foram retiradas cinco colônias isoladas. O DNA total dos isolados foi extraído com o auxílio de kit *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* da Promega A1125 (Promega, Madison, EUA), seguindo as instruções do fabricante. O agrupamento de isolados com características genéticas semelhantes foi feito por meio de REP-PCR que gerou 74 grupos. Uma representante de cada grupo teve parte da região do 16S rDNA amplificada e enviada para a empresa *Macrogen Inc.* (Seoul, Korea) para purificação e sequenciamento. Sequências com Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs) com similaridade de 97 % foram consideradas do mesmo grupo e a anotação taxonômica referente a cada um foi realizada utilizando-se sequências do banco de dados SILVA (QUAST et al., 2013). Foram identificadas 12 sequências com OTUs diferentes, metade delas classificadas como *Enterococcus faecalis* e a outra metade como *Lactobacillus fermentum*.

Os isolados escolhidos são representativos das três fases de maturação do LH, sendo que a amostra 25 representa o colostro, as amostras 93,96,106 e 381 são

provenientes do leite de transição e as amostras 464, 465, 497, 499 e 500 são representantes do leite maduro.

2.2 Teste tecnológico - Liofilização

As formas clássicas para a manutenção de micro-organismos são a refrigeração e o congelamento, no entanto a liofilização possibilita que as bactérias sejam armazenadas em temperatura ambiente, diminuindo os custos de estocagem e transporte. Contudo, o procedimento pode causar alterações fenotípicas nas bactérias e por isso, foi necessário verificar se as características avaliadas foram mantidas.

Antes de serem liofilizados, cada isolado foi replicado três vezes consecutivas em caldo MRS, sendo a última replicação realizada em um volume de 20 mL. Após crescimento, cada solução foi centrifugada a 8.000 x g por 15 min (Beckman GS – 6R), o precipitado foi lavado duas vezes em solução tampão PBS pH=7,4 e novamente centrifugado nas mesmas condições. O concentrado celular foi resuspenso em 20 mL de leite desnatado reconstituído (12%) e distribuídas (4 mL cada) em frascos de vidro e congelados a -80 °C até o início da liofilização. O procedimento ocorreu durante 22 hs em câmara única. O vácuo de secagem foi 0,22 mBar com temperaturas entre -35 e -25 °C durante a secagem primária. Ao final do processo os frascos foram selados e armazenados a 25 °C até a data prevista para as análises (VINDEROLA et al., 2012).

A viabilidade das culturas foi avaliada por meio da contagem de células por plaqueamento em profundidade em ágar MRS com o precipitado de células usado antes da liofilização, com o pó obtido logo após o procedimento de secagem e 90 dias após o procedimento, reconstituído em água destilada (4 mL), em duplicata (VINDEROLA et al., 2012). Os testes fenotípicos posteriores a liofilização foram executados após e três replicações consecutivas da solução reconstituída.

2.3 Testes de segurança

2.3.1 Avaliação da capacidade de produção de hemolisina

Os isolados foram estriados em ágar MRS suplementado com 5% (v/v) de sangue de carneiro desfibrinado recém-coletado. Os resultados foram avaliados após incubação a 37 °C/ 48 h, em condição de aerobiose. A atividade hemolítica foi verificada por meio da formação de zonas claras ao redor da colônia (β - hemólise), formação de pigmento verde (α - hemólise) ou ausência de reação (γ - hemólise) (BAUMGARTNER et al., 1998).

2.3.2 Avaliação de atividade de gelatinase

A atividade da enzima gelatinase dos isolados foi avaliada utilizando-se o ágar MRS suplementado com 3% (m/v) de gelatina. O resultado foi avaliado após incubação a 37 °C/ 48 h sob aerobiose. A produção da enzima foi verificada por meio da formação de um halo ao redor da estria após adição de aproximadamente 0,3 mL da solução de Frazier (cloreto mercúrio, 15,0 g; concentrado ácido clorídrico, 20 mL; e água destilada, 100 mL) por placa para confirmação da hidrólise da gelatina (SU et al., 1991).

2.3.3 Susceptibilidade a antibióticos

A escolha dos antibióticos utilizados foi baseada na frequência de uso relatada por profissionais de saúde ativos nas Unidades de Terapia Intensiva (UTI) neonatais da cidade de Viçosa-MG. Para verificação do perfil de sensibilidade dos isolados a 14 diferentes antibióticos, foi utilizado o método da difusão em placa (BAWER et al., 1966) com discos impregnados com os seguintes antibióticos: amicacina (10 μ g), ampicilina (30 μ g), cefalexina (30 μ g), vancomicina (30 μ g), meropenem (10 μ g), gentamicina (10 μ g), oxacilina (1 μ g), cefalotina (30 μ g), eritromicina (15 μ g), sulfonamidas (300 μ g), penicilina (10 μ g), ceftriaxona (30 μ g), ciprofloxacina (5 μ g) e amoxicilina (10 μ g), obtidos do laboratório SENSIFAR® (Cefar Diagnóstica, São Paulo, Brasil).

As bactérias do LH foram previamente ativadas e distribuídas (100 μ L) pela técnica de *spread plate* em placas de Petri contendo ágar MRS em concentração próxima a 10^8 UFC.mL⁻¹. Os discos contendo os antibióticos foram adicionados às

placas em pontos equidistantes, sob leve pressão, com o auxílio de uma pinça esterilizada. Após 1 h sob temperatura ambiente, as placas foram incubadas a 37 °C, por 16 a 18 h e 24 h no caso da vancomicina (NCCLS 2016). O experimento foi realizado em duplicata em três repetições. A sensibilidade do micro-organismo foi avaliada por meio da medição do diâmetro dos halos de inibição ao redor dos discos de antibióticos, medidos com paquímetro e expressos em mm. De acordo com o tamanho do halo obtido, os isolados foram classificados em resistentes, intermediários e sensíveis (CLSI/NCCLS, 2016).

2.3.4 Forma isomérica do ácido láctico

Para a verificação da forma isomérica do ácido láctico produzido pelas bactérias foi utilizado kit enzimático Megazyme K-DLATE/07/14® (*Megazyme International Ireland*). Os procedimentos foram seguidos de acordo com instruções do fabricante. A análise é baseada na oxidação de cada forma isomérica, que é estequiometricamente equivalente à quantidade de NADH liberado. O cálculo é feito a partir da diferença na absorvância antes e depois da reação com auxílio de planilha (MAGACALC) fornecida pelo fabricante. A quantidade total de ácido láctico produzido foi obtida pela soma das duas formas isoméricas.

2.4 Testes de funcionalidade

Para a execução dos testes de resistência ao suco gástrico e a sais biliares, cada isolado foi ativado três vezes consecutivas em caldo MRS, sendo a última ativação realizada em um volume de 20 mL. Após crescimento, cada solução foi centrifugada a 2.750 x g por 15 min, a 4 °C (Beckman GS – 6R); o sobrenadante foi descartado e o concentrado celular ressuspendido em 2 mL de caldo MRS. O inóculo foi ajustado adicionando-se gotas do concentrado celular em tubos contendo 5 mL de caldo MRS estéril, até obtenção de uma densidade ótica de 0,9 +/- 0,2 em espectrofotômetro a 600 nm (TESHIMA, 2001). Todas as análises foram realizadas em duplicata em três repetições.

2.4.1 Resistência ao suco gástrico

O concentrado de células padronizado (DO ~ 0,9) de cada cultura foi inoculado (5% v/v) em 10 mL de suco gástrico artificial (cloreto de sódio: 2,0 g; pepsina: 3,2 g; ácido clorídrico concentrado: 7 mL; água destilada: 1000 mL; e pH final de 2) e esterilizado por filtração em membranas de *Milipore* de 0,20 µm, de acordo com a descrição da farmacopeia americana publicada pela *American Society of Microbiology*, (ASM, 1981).

As amostras permaneceram incubadas a 37 °C e foram plaqueadas em profundidade em ágar MRS após 0, 15, 30, 60 e 90 minutos de exposição ao suco gástrico. Uma alíquota do concentrado de células de cada amostra foi plaqueada antes da inoculação no suco gástrico para obtenção do número inicial de células viáveis. A contagem de células viáveis das placas foi realizada após incubação a 37 °C/ 48 h.

2.4.2 Resistência a sais biliares

Inoculou-se 1 mL do concentrado de células padronizado (DO ~ 0,9) em tubos contendo 10 mL de caldo MRS adicionado de 0,3% (v/v) de *Oxgall* (Sigma®). Como controle foi realizado o mesmo procedimento, porém com o MRS sem a adição do sal. Os tubos foram mantidos a 37 °C e o crescimento avaliado em espectrofotômetro a 600 nm, em intervalos de 2 h, durante 6 h de incubação. Uma bactéria é considerada resistente a sais biliares quando apresenta DO ≥ 0,3 (600 nm) após 6 h de incubação na presença de 0,3% de sais biliares (GILLILAND; STALEY; BUSH, 1984).

2.4.3 Antagonismo em relação a patógenos indicadores

Para avaliação do potencial antimicrobiano dos isolados, foram utilizados ensaios de incubação *spot* em superfície sólida (*spot-on-lawn-assay*), em que foi aplicado um toque dos isolados sobre o centro de placas contendo ágar MRS. As placas foram incubadas 37 °C por 48 horas e após a formação de colônias visíveis, foram vertidas sobre as placas 10 mL de ágar BHI (*Brain heart infusion*, Oxoid)

semissólido (0,7% m/v) previamente inoculado com os seguintes patógenos: *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43895, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 *Cronobacter sakazakii* ATCC 51329 e *Clostridium difficile* ATCC 43596 em concentração de 10^6 UFC.mL⁻¹. A atividade antagonista foi verificada pela formação de halos de inibição (zonas claras) do crescimento do patógeno ao redor da massa de crescimento onde o isolado foi aplicado no ágar. O diâmetro dos halos de inibição foram medidos com paquímetro analógico (modelo Zaas150, Zaas) (BISWAS et al., 1991; FLEMING; ETCHELLS; COSTILOW, 1975).

2.5 Análises estatísticas

A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Grupos dependentes com distribuição paramétrica foram comparados por ANOVA com medidas repetidas seguidas de teste de Tukey e Bonferroni ($p < 0,05$). As análises foram realizadas com o auxílio do *software SPSS Statistics for Windows 17.0* (IBM, 2008).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Liofilização

A contagem do número de células viáveis realizada logo antes a liofilização, logo após o término do processo e 90 dias após o procedimento mostrou que secagem não afetou a sobrevivência das espécies analisadas. Inicialmente, observou-se média de 8,31 log UFC.mL⁻¹ (SD=0,38), ao fim da secagem a média de células viáveis registrada foi de 8,39 log UFC.mL⁻¹ (SD=0,41). O armazenamento por 90 dias provocou a redução de aproximadamente dois ciclos logarítmicos no número de células vivas ao registrar média de 6,49 log UFC.mL⁻¹.

É comum que bactérias lácticas sobrevivam ao processo de liofilização independentemente do agente crioprotetor utilizado (LU et al., 2017; SAARELA et al., 2005; VINDEROLA et al., 2012). Igualmente comum, é a perda da viabilidade ao longo do armazenamento (JAGANNATH; RAJU; BAWA, 2010). A preservação de células bacterianas torna-se aumentada quando o armazenamento ocorre em baixas temperaturas (PERALTA et al., 2017), porém, essa tentativa de prolongar a vida útil acarreta custos adicionais na manutenção de todo o processo.

A adição de micro-organismos probióticos ao leite de BLHs não é regulamentada pela legislação brasileira, toda via, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) reconhece os probióticos como um produto com alegação de propriedades nutricionais e/ou de saúde. Produtos alimentícios contendo esses organismos vivos devem ter em seus rótulos, a viabilidade que garanta a ação dentro do prazo de validade dos mesmos (BRASIL, 2002). De acordo com a Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007 a quantidade de micro-organismos vivos em leites fermentados deve estar na faixa de 10⁸ a 10⁹ UFC na recomendação diária do produto pronto para o consumo (BRASIL, 2007). Desta forma, o consumo do conteúdo de dois frascos dos micro-organismos testados, atende a recomendação da legislação mesmo após 90 dias estocado em temperatura ambiente.

3.2 Testes de segurança

Para garantir a sua estabilidade no organismo humano, bactérias, geralmente as patogênicas, possuem algumas características de defesa desenvolvidas. A sua sobrevivência depende delas serem capazes de entrar na células e se protegerem de mecanismos antimicrobianos do portador (VAN TYNE; MARTIN; GILMORE, 2013). Ao tratar-se de bactérias lácticas, é desejável que elas não possuam esse tipo de mecanismo, ou seja, não sejam capazes de causar hemólise celular do tipo beta e não possuam a atividade da enzima gelatinase, caso contrário, seria uma possível ameaça ao hospedeiro (BEGOVIĆ et al., 2013).

Bactérias hemolíticas utilizam os íons ferro disponíveis no organismo e causam a privação do referido micronutriente, a consequência disso muitas vezes é o desenvolvimento de anemias graves (VESTERLUND et al., 2007). Todas as amostras analisadas apresentaram atividade hemolítica do tipo alfa, o que é verificado pela formação de zona esverdeada em volta das culturas crescidas em meio de cultura adicionado de sangue de carneiro. Isso indica que as hemácias adicionadas ao meio de cultura não foram totalmente degradadas. Esses metabólitos formados são provavelmente a bilirrubina e biliverdina, ainda passíveis de serem utilizados pelo hospedeiro (HUSAIN, 2008).

Em um estudo foram analisadas as atividades hemolíticas exercidas por espécies de *Enterococcus* de diversas origens. Verificou-se alta prevalência de alfa-hemólise e apenas 15% dos isolados com atividade do tipo beta, com lesão completa da célula (SEMEDO et al., 2003). Em relação a *Lactobacillus*, estudos apontam a não existência de lesões em células hospedeiras (CUNHA et al., 2012; MAHMOUDI et al., 2016; SHEKH; DAVE; VYAS, 2016).

Bactérias que possuem a enzima gelatinase em atividade são capazes de lesar estruturas celulares e causar sérias inflamações (KANEMITSU et al., 2001). Essas são características específicas de espécies reconhecidamente patogênicas e indesejáveis em bactérias probióticas. Não foram observadas zonas claras em volta das culturas crescidas em meio adicionado de gelatina, o que indica a não atividade da enzima responsável por essa clivagem.

A busca por genes que codificam citolisinas (*cy/L_L*, *cy/L_S*, *cy/M*, *cy/B*, *cy/A*, e *cy/I*) é uma forma de rastreamento de espécies bacterianas capazes de causar lise na célula eucariótica, porém, em relação ao gênero *Enterococcus*, a técnica de maior confiabilidade é a verificação fenotípica, visto que algumas estirpes possuem o gene mas não o expressa (GOMES et al., 2008; SEMEDO et al., 2003).

A respeito da susceptibilidade a antibióticos, independentemente das alterações ocorridas posteriormente a liofilização, todos os micro-organismos testados foram não sensíveis aos antibióticos da classe dos amiloglicosídeos e dos glicopeptídeos. A eritromicina (ERI), substância representante da classe dos macrolídeos, também não foi capaz de prejudicar o crescimento das estirpes em questão, seja de forma intermediária ou completa (TABELA S1 – Material Suplementar). Diante disso, terapias antibacterianas envolvendo *Enterococcus* tem sido realizadas com a associação de antibióticos, ou seja, ao ser testado isoladamente a bactéria mostra-se resistente, porém, com a associação de dois ou mais agentes químicos é possível combater indivíduos dessa espécie (MURRAY, 1990).

Diversos trabalhos demonstraram a resistência de bactérias lácticas (gêneros *Enterococcus* e *Lactobacillus*) a pelo menos um representante das classes dos amiloglicosídeos (BAUMGARTNER et al., 1998; CUNHA et al., 2012; GOMES et al., 2008; LIU et al., 2014; MAHMOUDI et al., 2016; SÁNCHEZ et al., 2007), glicopeptídeos (HOSSEINI et al., 2009; MAHMOUDI et al., 2016; TULUMOĞLU; KAYA; ŞİMŞEK, 2014) e macrolídeos (BAUMGARTNER et al., 1998; BEN OMAR et al., 2004; RIBOLDI; FRAZZON; FRAZZON, 2009). Devido a diversidade de espécies de micro-organismos presentes, o ambiente intestinal torna-se propício para a transferência horizontal de genes. Bactérias patogênicas aproveitam-se dessa facilidade para tornar-se cada vez mais resistentes (CLEMENTI; AQUILANTI, 2011; FRAQUEZA, 2015).

Após passarem pelo processo da liofilização as estirpes estudadas tornaram-se mais susceptíveis à ação dos antibióticos, especialmente às quatro subclasses dos β -lactâmicos (FIGURA 1).

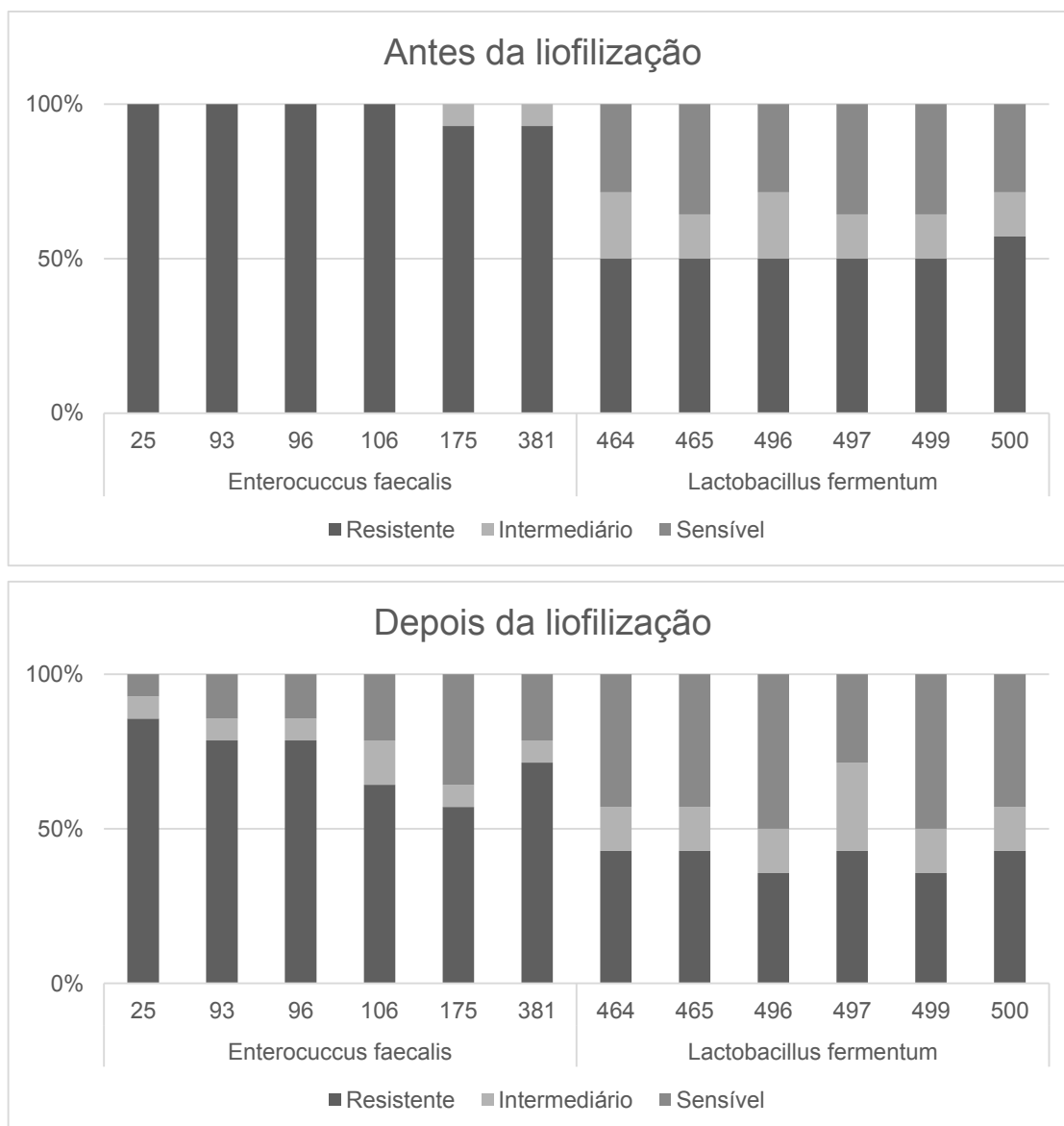


FIGURA 1 - Percentual de resistência e sensibilidade de bactérias isoladas de leite humano (n=12) a 14 antibióticos comumente utilizados na UTI neonatal do município de Viçosa-MG antes e após liofilização. Nomenclatura e concentração dos antibióticos: AMI=Amicacina (10µg), GEN=Gentamicina (10µg), ERI=Eritromicina (15µg), SUL=Sulfonamidas (300µg), VAN=Vancomicina (30µg) AMP=Ampicilina (30µg), OXA=Oxacilina (1µg), PEN=Penicilina (10µg), AMO=Amoxicilina (10µg), CRO=Ceftriaxona (30µg), CIP=Ciprofloxacina (5µg), CFE=Cefalexina (30µg), CFL=Cefalotina (30µg) e MER=Meropenem (10µg) Origem: SENSIFAR® (Cefar Diagnóstica, São Paulo, Brasil).

No presente estudo, a ampicilina inicialmente exerceu resistência a todos os *Enterococcus* testados, após a liofilização, quatro amostras tornaram-se sensíveis e uma apresentou sensibilidade intermediária. Em todas as 114 bactérias lácticas isoladas de queijo de uma região de Portugal foi detectada a não sensibilidade a pelo menos um tipo de antibiótico da classe dos β -lactâmicos (DOMINGOS-LOPES et al.,

2017). A verificação da resistência também foi feita em outros estudos com bactérias lácticas isoladas de diferentes matrizes (MAHMOUDI et al., 2016; YUKSEL; AKCELIK; AKCELIK, 2015).

Situação semelhante ocorreu com os *Lactobacillus* inicialmente não sensíveis a amoxicilina e após o procedimento foram sensíveis. Os resultados indicam que os *Enterococcus* testados tornaram-se mais sensíveis aos antibióticos cefalotina e meropenem. Com exceção da amostra 25, aqueles que inicialmente apresentavam-se como não sensíveis, tornaram-se sensíveis, ou com sensibilidade intermediária.

A amostra 175 (*E. faecalis*) antes da liofilização foi resistente a 13 dos 14 antibióticos, após a secagem apresentou-se sensível a 5 deles, inclusive ao único que anteriormente era parcialmente sensível. A eritromicina, que exercia resistência a essa estirpe, depois exerceu apenas resistência intermediária. Os *Lactobacillus* apresentaram poucas alterações relacionadas ao estresse causado pela secagem das amostras. As mudanças de fenótipo de resistente para sensível aconteceu apenas com antibiótico amoxicilina e uma amostra (497) com o antibiótico cefalotina.

A hipótese a ser considerada é de que a situação de estresse pode ter inibido a expressão dos genes responsáveis pela defesa contra esses antibióticos. Nada indica que os genes, que por ventura tenham sido silenciados, não possam voltar a serem expressos assim que as células recuperarem-se da condição estressante. É comum encontrar na literatura científica resultados que mostram que após serem submetidos a situação de estresse, algumas bactérias tornam-se menos sensíveis ao antibiótico testado, não o contrário como no presente trabalho (AL-NABULSI et al., 2015; CALICIOGLU et al., 2002). Por seleção natural, aquelas bactérias que sobreviveram ao estresse, multiplicam-se e transferem esses genes que lhes conferem resistência aos seus descendentes (CANIÇA et al., 2015).

É inusitado o fato de uma bactéria que esteja presente no LH seja resistente a tantos antibióticos, contudo, amostras de *E. faecalis* de origem clínica se mostraram mais virulentas comparadas àquelas de origem alimentar (MEDEIROS et al., 2014). É provável que a resistência observada seja necessária nesses micro-organismos ao considerar que sua manutenção no TGI do RN seja relevante para a sua saúde. Aquilo a que se é exposto nos primeiros dias de vida pode ser extremamente determinante ao longo de toda a vida. O organismo do RN está em constante desenvolvimento e

todos os processos que ocorrem visam o seu amadurecimento e a sua sobrevivência a adversidades (BEGOVIĆ et al., 2013; JIMÉNEZ et al., 2008).

A Figura 2 representa a quantidade ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) de ácido láctico produzido pelas bactérias testadas antes e após o processo de liofilização. Dados complementares estão disponibilizados na Tabela S2 no material suplementar.

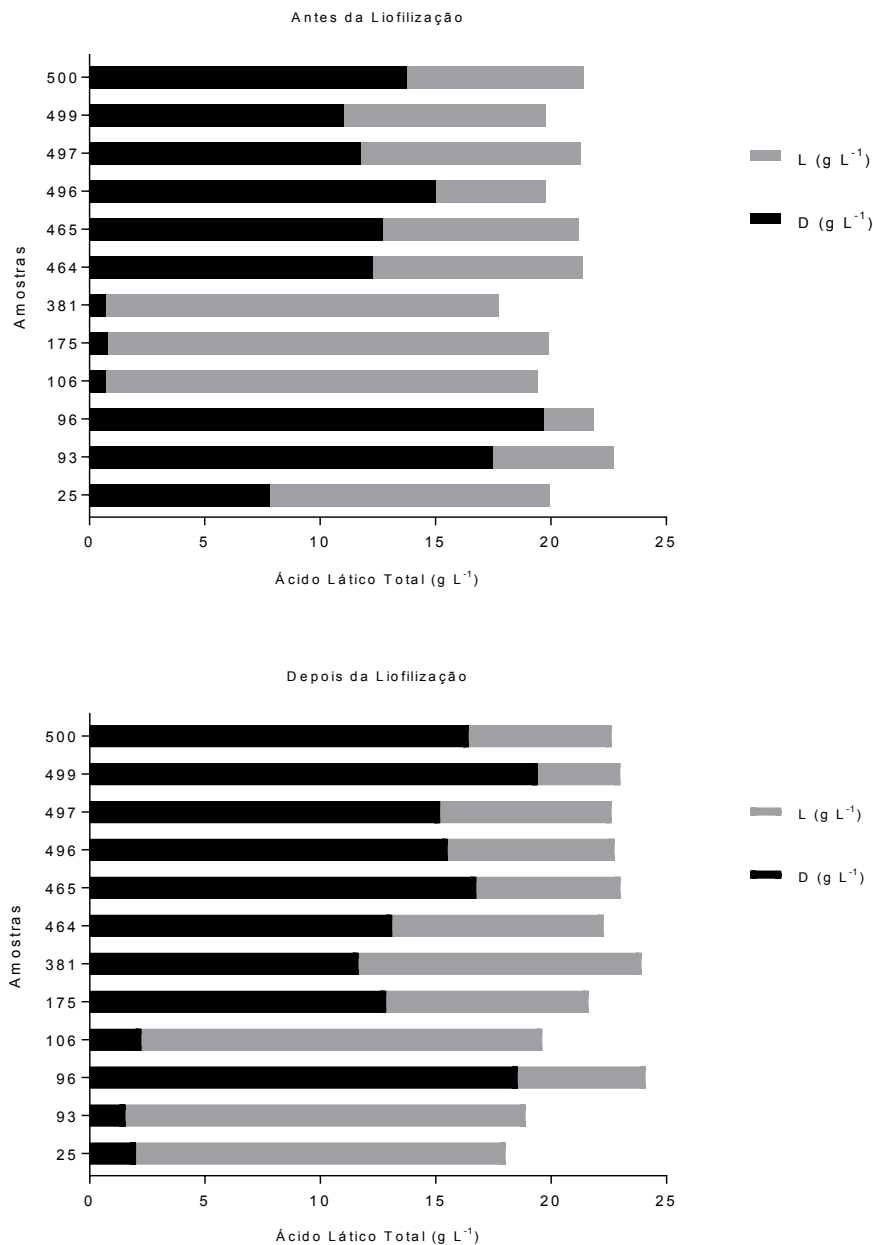


FIGURA 2 – Produção ácido láctico (D(-), L(+)) e total) por *Enterococcus faecalis* (n=6) e *Lactobacillus fermentum* (n=6) isolados de leite humano. Resultados derivados das médias de três repetições antes e depois da liofilização. Amostras 25, 93, 96, 106, 175 e 381 = *Enterococcus faecalis*, 464, 465, 496, 497, 499 e 500 = *Lactobacillus fermentum*

O volume de ácido láctico total produzido pelas estirpes testadas foi o mesmo antes e depois da liofilização, exceto para um *E. faecalis* (93), que produziu menor quantidade após o processo. A liofilização modificou o ácido majoritário produzido pelas amostras 93 e 175. Apenas dois isolados (464 e 497) produziram quantidades equilibradas dos dois isômeros independentemente da secagem. Os isolados que produziram maior quantidade de L(+)-ácido láctico comparado ao outro isômero foram 25, 106, 175 e 381 (todas *E. faecalis*), porém, apenas o isolado 106 manteve-se produzindo essa proporção entre os isômeros depois da liofilização.

Em alguns trabalhos, estirpes de *L. fermentum* produziram as duas formas isoméricas do ácido láctico (GARVIE, 1980; MANOME et al., 1998) já em outro apenas a forma L(+) foi detectada (COSTA et al., 2008). Em relação a estirpes de *E. faecalis*, estudos comprovam que a forma L(+) foi produzida em quantidades muito superiores a forma D(-)(REDDY et al., 2016; YUN; WEE; RYU, 2003; ZHANG et al., 2008).

O organismo humano não produz as enzimas necessárias para a digestão da forma D(-) do ácido láctico, por isso, a FAO recomenda ingestão máxima diária de até 100mg por kg de peso para que não tenha ação tóxica (FAO/WHO, 1967). O ácido que será produzido durante a fermentação é determinado pela presença das enzimas lactato desidrogenase específicas, que irão conduzir a quebra do piruvato para a produção da forma levógira ou dextrogira. Esse critério em algumas vezes é utilizado para diferenciação de espécies de culturas lácticas(GARVIE, 1980).

Enzimas lactato racemases são capazes de converter uma forma do ácido láctico em outra, sendo assim, é possível que inicialmente a bactéria produza o ácido na forma L(+) e a ação enzimática o transforme na forma D(-)(GOFFIN et al., 2005). Apenas com os dados coletados até o momento, não é possível determinar se os isolados em questão possuem enzimas desidrogenases específicas ou alguma racemase. O mesmo aconteceu em estudo anterior que avaliou o perfil de isômeros produzidos por estirpes de *Lactobacillus* utilizadas em processos de produção de etanol (COSTA et al., 2008).

3.3 Testes de funcionalidade

Para que um micro-organismo possa atuar como probiótico é necessário que ele passe por todas as barreiras do TGI e seja capaz de colonizar o intestino (FAO, 2006). A acidez característica do ambiente estomacal e a atuação da enzima pepsina são alguns dos principais desafios para a manutenção da viabilidade dessas espécies. Caso a bactéria seja capaz de transpor essa barreira, a etapa seguinte é sobreviver ao ambiente extremamente salinizado encontrado no duodeno.

As estirpes testadas nesse estudo mostraram-se resistentes ao serem expostas a líquidos que mimetizavam o suco gástrico e os sais biliares. Tanto antes da liofilização quanto após, as células de *E. faecalis* e *L. fermentum* responderam da mesma maneira. Em ambos os testes não houve decréscimo significativo no número de células vivas. Em relação aos sais biliares, as bactérias não somente sobreviveram, como apresentaram crescimento semelhante às do grupo controle, o que demonstra perfeita adaptação às condições impostas. Bactérias láticas normalmente são resistentes ao suco gástrico e a sais biliares (ASHAYERIZADEH et al., 2017; BAO et al., 2010; PIENIZ et al., 2014; SANDES et al., 2017; VAMANU, 2015; ZENG et al., 2016). Tal capacidade conferem a elas a possibilidade de atuar como probióticos.

Assim como apontado pela literatura (AHMADOVA et al., 2013; HADJI-SFAXI et al., 2011; ZAGO et al., 2011), as bactérias láticas estudadas, apresentam atividade antagonista em relação a patógenos. A média do diâmetro dos halos formados em volta das culturas estão representados na Figura 3. Valores de média e desvio padrão estão disponibilizados em material suplementar (TABELA S3).

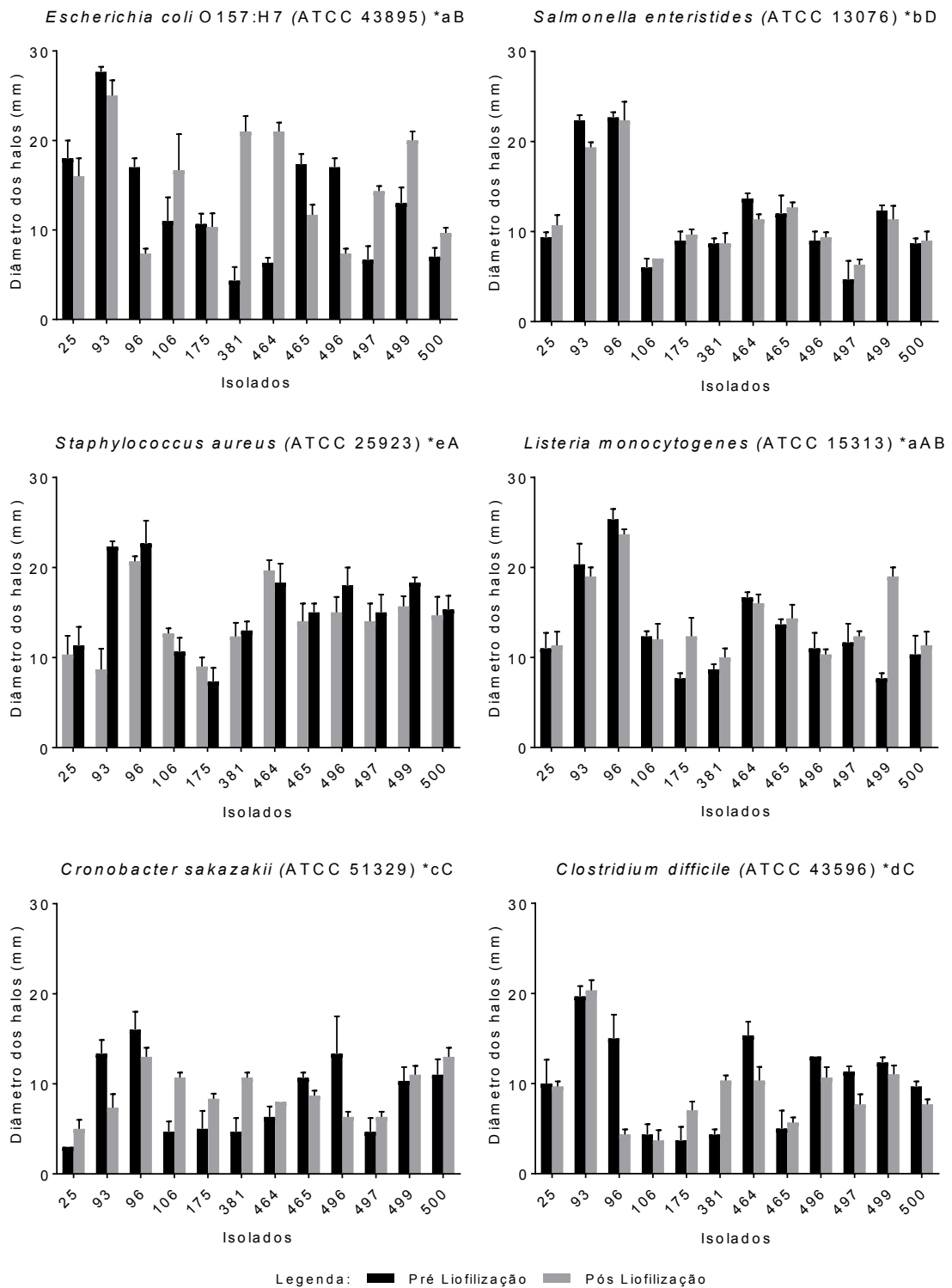


FIGURA 3 – Média dos diâmetros dos halos do antagonismo de bactérias isoladas de leite humano frente a patógenos indicadores antes e após liofilização. *Comparação de médias derivadas de doze isolados com três repetições cada. Grupos sinalizados com letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras minúsculas – Pré liofilização; Letras maiúsculas – Pós liofilização. Amostras 25, 93, 96, 106, 175 e 381 = *Enterococcus faecalis*, 464, 465, 496, 497, 499 e 500 = *Lactobacillus fermentum*.

A reunião dos resultados dos testes fenotípicos realizados não é suficiente para que as espécies estudadas possam ser recomendadas para suplementação de leites dos BLH. Ainda são necessários muitos estudos voltados para as características de segurança, principalmente relacionados a genes de virulência que por ventura elas possam carrear.

Os benefícios trazidos pelo uso de bactérias do gênero *Lactobacillus* como probiótico são comprovados por diversos estudos (ANANDHARAJ; SIVASANKARI, 2014; OUWEHAND; SALMINEN; ISOLAURI, 2002; SANDES et al., 2017; VERÓN et al., 2017), já as bactérias do gênero *Enterococcus* ainda precisam de maior respaldo científico para serem consideradas como tal. Apesar de presentes em diversas matrizes alimentares (CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA; ZADERNOWSKA; ŁANIEWSKA-TROKENHEIM, 2016; HAMMAD; SHIMAMOTO; SHIMAMOTO, 2014; PESAVENTO et al., 2014; PIENIZ et al., 2015; YOON; KIM; HWANG, 2008), algumas espécies estão envolvidas em processos patológicos (BARBOSA-RIBEIRO et al., 2016; DONOHUE; SALMINEN, 1996; YANG et al., 2015).

Uma vez elucidada a importância desses micro-organismos e comprovada a sua segurança, é possível que o isolado identificado como *E. faecalis*, nesse trabalho com a numeração 106, possa ser reincorporado ao leite pasteurizado dos BLH em todas as fases da lactação. Essa estirpe domentrou-se tecnologicamente mais interessante perante as demais devido a algumas características especiais: ela é não β -hemolítica, é gelatinase negativa, teve a sensibilidade a antibióticos reduzida após a liofilização, é resistente ao suco gástrico e a sais biliares, produziu em L(+)-ácido láctico em quantidade superior à forma D(-) e assim como as outras, foi capaz de combater patógenos indicadores.

São necessários mais estudos que relacione a segurança desses micro-organismos à sua função no TGI dos hospedeiros (BEGOVIĆ et al., 2013; PERUMAL; VENKATESAN, 2017). Especula-se que tais espécies são parte da estratégia do sistema imunológico do neonato para que sejam reconhecidos padrões moleculares de bactérias específicas com o objetivo de responder adequadamente a organismos patogênicos e comensais (PEREZ et al., 2007).

4 CONCLUSÃO

Nenhuma das estirpes testadas pode imediatamente ser utilizada como suplemento em BLH sem antes passar por testes de segurança mais rigorosos. Diante dos resultados, pode-se concluir que embora nenhuma estirpe tenha demonstrado adequação ao que considera-se seguro, pode-se inferir que as características observadas atenderiam às necessidades de cada uma das crianças consumidoras do leite dos quais essas bactérias foram isoladas. A personalização das características das estirpes presentes nos LH ainda necessita de estudos para entender a equação: segurança x fenótipos x TGI do neonato.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMADOVA, A. et al. Antimicrobial and antifungal activities of *Lactobacillus curvatus* strain isolated from homemade Azerbaijani cheese. **Anaerobe**, v. 20, p. 42–49, abr. 2013.

AL-NABULSI, A. A. et al. Effects of osmotic pressure, acid, or cold stresses on antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes*. **Food Microbiology**, v. 46, p. 154–160, abr. 2015.

ANANDHARAJ, M.; SIVASANKARI, B. Isolation of potential probiotic *Lactobacillus oris* HMI68 from mother's milk with cholesterol-reducing property. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 118, n. 2, p. 153–159, 2014.

ANVISA. **Banco de Leite Humano: Funcionamento, Prevenção e Controle de Riscos**. Brasília-DF: Agencia Nacional de Vigilância Sanitária, 2008.

ASHAYERIZADEH, O. et al. Study on the chemical and microbial composition and probiotic characteristics of dominant lactic acid bacteria in fermented poultry slaughterhouse waste. **Waste Management**, v. 65, p. 178–185, 2017.

ASM. Gastric Juice. In: **Manual of methods for general bacteriology**. Washington: American Society for Microbiology - United States Pharmacopeia, 1981. p. 208–220.

BALLARD, O.; MORROW, A. L. Human Milk Composition. Nutrients and Bioactive Factors. **Pediatric Clinics of North America**, v. 60, n. 1, p. 49–74, 2013.

BAO, Y. et al. Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products. **Food Control**, v. 21, n. 5, p. 695–701, 2010.

BARBOSA-RIBEIRO, M. et al. Antimicrobial susceptibility and characterization of virulence genes of *Enterococcus faecalis* isolates from teeth with failure of the endodontic treatment. **Journal of Endodontics**, v. 42, n. 7, p. 1022–1028, 2016.

BAUMGARTNER, A. et al. Relatedness of *Lactobacillus rhamnosus* Strains Isolated from Clinical Specimens and Such from Food-stuffs, Humans and Technology. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 31, n. 5, p. 489–494, 1998.

BEGOVIĆ, J. et al. Genotypic diversity and virulent factors of *Staphylococcus epidermidis* isolated from human breast milk. **Microbiological Research**, v. 168, n. 2, p. 77–83, 2013.

BEN OMAR, N. et al. Functional and safety aspects of *Enterococci* isolated from different Spanish foods. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 118–130, 2004.

BISWAS, S. R. et al. Influence of Growth Conditions on the Production of a bacteriocin prediocin Ach, by *Pediococcus acidilactici* H. **Applied Environmental Microbiology**, v. 57, n. 4, p. 1265–1267, 1991.

BRANDTZAEG, P. Induction of secretory immunity and memory at mucosal surfaces. **Vaccine**, v. 25, n. 30, p. 5467–5484, 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Resolução - RDC nº 2, de 7 de janeiro de 2002 - Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde. . 2002, p. 191, nº 6, Seção 1.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária RDC nº171, de 4 de setembro de 2006. Dispõe sobre Regulamento Técnico para o funcionamento de Bancos de Leite Humano. 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007 - Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. 2007.

CALICIOGLU, M. et al. Inactivation of acid-adapted and nonadapted *Escherichia coli* O157:H7 during drying and storage of beef jerky treated with different marinades. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 9, p. 1394–405, 2002.

CANIÇA, M. et al. Current perspectives on the dynamics of antibiotic resistance in different reservoirs. **Research in Microbiology**, v. 166, n. 7, p. 594–600, 2015.

CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA, W.; ZADERNOWSKA, A.; ŁANIEWSKA-TROKENHEIM, Ł. Virulence factors, antimicrobial resistance and biofilm formation in *Enterococcus spp.* isolated from retail shrimps. **LWT - Food Science and Technology**, v. 69, p. 117–122, 2016.

CLEMENTI, F.; AQUILANTI, L. Recent investigations and updated criteria for the assessment of antibiotic resistance in food lactic acid bacteria. **Anaerobe**, v. 17, n. 6, p. 394–398, 2011.

CLSI/NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 26th. ed. Wayne, Pennsylvania - USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2016. v. 36

COLLADO, M. C.; DELGADO, S.; MALDONADO, A. Assessment of the bacterial diversity of breast milk of healthy women by quantitative real-time PCR. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, p. 523–528, 2009.

COSTA, V. M. et al. Produções de ácido acético, etanol e dos isômeros óticos do ácido láctico por linhagens de *Lactovacillus* isoladas de fermentações alcoólicas industriais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 2, p. 503–509, 2008.

CUNHA, L. R. DA et al. Characterization of *Lactobacillus gasseri* isolates from a breast-fed infant. **Gut Microbes**, v. 3, n. 1, p. 15–24, 2012.

DE LA COCHETIÈRE, M.-F. et al. Effect of antibiotic therapy on human fecal microbiota and the relation to the development of *Clostridium difficile*. **Microbial**

Ecology, v. 56, n. 3, p. 395–402, 2008.

DE MAN, J. C.; ROGOSA, M.; SHAPE, M. E. A medium for the cultivation of *Lactocacilli*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 23, n. 1, p. 130–135, 1960.

DOMINGOS-LOPES, M. F. P. et al. Genetic diversity, safety and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese. **Food Microbiology**, v. 63, p. 178–190, 2017.

DONOHUE, D. C.; SALMINEN, S. Safety of probiotic bacteria. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 5, p. 25–28, 1996.

FAO. **Probiotics in food: Health and nutritional properties and guidelines for evaluation**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2006. v. 85

FAO/WHO. Toxicological evaluation of some antimicrobials, antioxidants, emulsifiers, stabilizers, flour-treatment agents, acids and bases. **FAO Nutrition Meetings**, n. 40, 1967.

FLEMING, H. P.; ETCHELLS, J. L.; COSTILOW, R. N. Microbial inhibition by an isolate of *Pediococcus* from cucumber brines. **Applied Microbiology**, v. 30, n. 6, p. 1040–1042, 1975.

FRAQUEZA, M. J. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from dry-fermented sausages. **International Journal of Food Microbiology**, v. 212, p. 76–88, nov. 2015.

GARTNER, L. M. et al. Breastfeeding and the use of human milk. **Pediatrics**, v. 115, n. 2, p. 496–506, 2005.

GARVIE, E. I. Bacterial lactate dehydrogenases. **Microbiological Reviews**, v. 44, n. 1, p. 106–139, 1980.

GILLILAND, S. E.; STALEY, T. E.; BUSH, L. J. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. **Journal of Dairy Science**, v. 67, n. 12, p. 3045–3051, 1984.

GOFFIN, P. et al. Lactate Racemization as a Rescue Pathway for Supplying D-Lactate to the Cell Wall Biosynthesis Machinery in *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 19, p. 6750–6761, 2005.

GOMES, B. C. et al. Prevalence and characterization of *Enterococcus spp.* isolated from Brazilian foods. **Food Microbiology**, v. 25, n. 5, p. 668–675, 2008.

GRZEŚKOWIAK, Ł. et al. The impact of perinatal probiotic intervention on gut microbiota: double-blind placebo-controlled trials in Finland and Germany. **Anaerobe**, v. 18, n. 1, p. 7–13, 2012.

HADJI-SFAXI, I. et al. Antimicrobial activity and safety of use of *Enterococcus faecium* PC4.1 isolated from Mongol yogurt. **Food Control**, v. 22, n. 12, p. 2020–2027, dez. 2011.

HAMMAD, A. M.; SHIMAMOTO, T.; SHIMAMOTO, T. Genetic characterization of antibiotic resistance and virulence factors in *Enterococcus spp.* from Japanese retail ready-to-eat raw fish. **Food Microbiology**, v. 38, p. 62–66, 2014.

HOSSEINI, S. V. et al. Molecular and probiotic characterization of bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* strains isolated from nonfermented animal foods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 4, p. 1392–1403, 2009.

HUSAIN, S. Effect of Ferric Iron on Siderophore Production and Pyrene Degradation by *Pseudomonas fluorescens* 29L. **Current Microbiology**, v. 57, n. 4, p. 331–334, 2008.

IBM, S. **SPSS 17.0 IBM**, Chicago, 2008. Disponível em: <www.spss.com>

JAGANNATH, A.; RAJU, P. S.; BAWA, A. S. Comparative evaluation of bacterial cellulose (nata) as a cryoprotectant and carrier support during the freeze drying process of probiotic lactic acid bacteria. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 8, p. 1197–1203, 2010.

JIMÉNEZ, E. et al. Assessment of the bacterial diversity of human colostrum and screening of *Staphylococcal* and *Enterococcal* populations for potential virulence factors. **Research in Microbiology**, v. 159, n. 9–10, p. 595–601, 2008.

KANEMITSU, K. et al. Quantitative determination of gelatinase activity among *Enterococci*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 47, n. 1, p. 11–16, 2001.

KRAMER, M. S.; KAKUMA, R. **The optimal duration of exclusive breastfeeding: A systematic review**. Geneva: WHO - World Health Organization, 2002.

LIU, Y. et al. Investigation of a multiresistance gene *cfp* that fails to mediate resistance to phenicols and oxazolidinones in *Enterococcus faecalis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 4, p. 892–898, 2014.

LU, Y. et al. Optimization of a cryoprotective medium to increase the viability of freeze-dried *Streptococcus thermophilus* by response surface methodology. **LWT - Food Science and Technology**, v. 80, p. 92–97, 2017.

MAHMOUDI, I. et al. Functional in vitro screening of *Lactobacillus* strains isolated from Tunisian camel raw milk toward their selection as probiotic. **Small Ruminant Research**, v. 137, p. 91–98, 2016.

MANOME, A. et al. The ratio of L-form to D-form of lactic acid as a criteria for the identification of lactic acid bacteria. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 44, p. 371–374, 1998.

MARTINS, V.; TUMA, L.; FALCÃO, M. C. Composição do leite humano : o alimento ideal Human milk composition : the ideal nutrition for infants. **Revista de Medicina (São Paulo)**, v. 82, n. 1, p. 1–10, 2003.

MATAMOROS, S. et al. Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health. **Trends in Microbiology**, v. 21, n. 4, p. 167–73, abr. 2013.

MEDEIROS, A. W. et al. Molecular detection of virulence factors among food and clinical *Enterococcus faecalis* strains in South Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 327–332, 2014.

MURRAY, B. E. The life and times of the *Enterococcus*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 3, n. 1, p. 46–65, jan. 1990.

OUWEHAND, A. C.; SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. Probiotics: an overview of beneficial effects. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 82, n. 1–4, p. 279–89, 2002.

PALMER, C. et al. Development of the human infant intestinal microbiota. **PLoS Biology**, v. 5, n. 7, p. 1556–1573, 2007.

PERALTA, G. H. et al. Spray-dried adjunct cultures of autochthonous non-starter lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 255, n. May, p. 17–24, 2017.

PEREZ, P. F. et al. Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? **Pediatrics**, v. 119, n. 3, p. e724–e732, 2007.

PERUMAL, V.; VENKATESAN, A. Antimicrobial, cytotoxic effect and purification of bacteriocin from vancomycin susceptible *Enterococcus faecalis* and its safety evaluation for probiotization. **LWT - Food Science and Technology**, v. 78, p. 303–310, 2017.

PESAVENTO, G. et al. Prevalence and antibiotic resistance of *Enterococcus spp.* isolated from retail cheese, ready-to-eat salads, ham, and raw meat. **Food Microbiology**, v. 41, p. 1–7, ago. 2014.

PIENIZ, S. et al. Probiotic potential, antimicrobial and antioxidant activities of *Enterococcus durans* strain LAB18s. **Food Control**, v. 37, n. 1, p. 251–256, 2014.

PIENIZ, S. et al. Evaluation of resistance genes and virulence factors in a food isolated *Enterococcus durans* with potential probiotic effect. **Food Control**, v. 51, p. 49–54, maio 2015.

QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. D590–D596, 2013.

REDDY, L. V. et al. L-Lactic acid production by combined utilization of agricultural bioresources as renewable and economical substrates through batch and repeated-

batch fermentation of *Enterococcus faecalis* RKY1. **Bioresource Technology**, v. 209, p. 187–194, 2016.

RIBOLDI, G. P.; FRAZZON, J.; FRAZZON, A. P. G. Antimicrobial Resistance Profile of *Enterococcus spp* Isolated From Food in Southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 125–128, 2009.

ROGOSA, M.; MITCHELL, J. A.; WISEMAN, R. F. A selective medium for the isolation and enumeration of oral and fecal *Lactobacilli*. **Journal of Bacteriology**, v. 62, p. 132–133, 1951.

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

SAARELA, M. et al. Influence of fermentation time, cryoprotectant and neutralization of cell concentrate on freeze-drying survival, storage stability, and acid and bile exposure of *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* cells produced without milk-based ingredients. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, n. 6, p. 1330–1339, 2005.

SÁNCHEZ, J. et al. Antimicrobial and safety aspects, and biotechnological potential of bacteriocinogenic *Enterococci* isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). **International Journal of Food Microbiology**, v. 117, n. 3, p. 295–305, 2007.

SANDES, S. et al. Selection of new lactic acid bacteria strains bearing probiotic features from mucosal microbiota of healthy calves: Looking for immunobiotics through in vitro and in vivo approaches for immunoprophylaxis applications. **Microbiological Research**, v. 200, p. 1–13, 2017.

SAVINO, F.; LIGUORI, S. A.; LUPICA, M. M. Adipokines in breast milk and preterm infants. **Early Human Development**, v. 86, n. SUPPL. 1, p. 77–80, 2010.

SEMEDO, T. et al. Comparative study using type strains and clinical and food isolates to examine hemolytic activity and occurrence of the *cyl* operon in *Enterococci*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 6, p. 2569–2576, 2003.

SHEKH, S. L.; DAVE, J. M.; VYAS, B. R. M. Characterization of *Lactobacillus plantarum* strains for functionality, safety and γ -amino butyric acid production. **LWT - Food Science and Technology**, v. 74, p. 234–241, 2016.

SU, Y. A. et al. Nucleotide sequence of the gelatinase gene (*gelE*) from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 1, p. 415–420, 1991.

TERAGUCHI, S. et al. Enumeration of *Bifidobacteria* in dairy products. **Japanese Journal of Bacteriology**, v. 33, p. 753–761, 1978.

TESHIMA, E. **Seleção de bactérias bífidas isoladas de lactentes e modulação da microbiota intestinal por meio de probióticos, prebióticos e simbióticos**. Viçosa-MG, Universidade Federal de Viçosa, 2001.

TULUMOĞLU, Ş.; KAYA, H. I.; ŞİMŞEK, Ö. Probiotic characteristics of *Lactobacillus fermentum* strains isolated from tulum cheese. **Anaerobe**, v. 30, p. 120–125, 2014.

VAMANU, E. Effect of gastric and small intestinal digestion on lactic acid bacteria activity in a GIS1 simulator. **Saudi Journal of Biological Sciences**, n. July, p. 1–5, 2015.

VAN TYNE, D.; MARTIN, M.; GILMORE, M. Structure, Function, and Biology of the *Enterococcus faecalis* Cytolysin. **Toxins**, v. 5, n. 5, p. 895–911, 2013.

VERÓN, H. E. et al. Isolation and selection of potential probiotic lactic acid bacteria from *Opuntia ficus-indica* fruits that grow in Northwest Argentina. **LWT - Food Science and Technology**, v. 84, p. 231–240, 2017.

VESTERLUND, S. et al. Safety assessment of *Lactobacillus* strains: Presence of putative risk factors in faecal, blood and probiotic isolates. **International Journal of Food Microbiology**, v. 116, n. 3, p. 325–331, 2007.

VINDEROLA, G. et al. Preservation of functionality of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1 after incorporation of freeze-dried cells into different food matrices. **Food Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 274–280, 2012.

YANG, J. et al. Molecular characterization of resistance, virulence and clonality in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*: A hospital-based study in Beijing, China. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 33, n. May, p. 253–60, 2015.

YOON, M. Y.; KIM, Y. J.; HWANG, H.-J. Properties and safety aspects of *Enterococcus faecium* strains isolated from Chungkukjang, a fermented soy product. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, n. 5, p. 925–933, 2008.

YUKSEL, F. N.; AKCELIK, N.; AKCELIK, M. Incidence of antibiotic resistance and virulence determinants in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* strains, isolated from traditional cheeses in Turkey. **Molecular Genetics, Microbiology and Virology**, v. 30, n. 4, p. 206–215, 2015.

YUN, J.-S.; WEE, Y.-J.; RYU, H.-W. Production of optically pure l(+)-lactic acid from various carbohydrates by batch fermentation of *Enterococcus faecalis* RKY1. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 4, p. 416–423, 2003.

ZAGO, M. et al. Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. **Food Microbiology**, v. 28, n. 5, p. 1033–1040, 2011.

ZENG, Z. et al. Screening for potential novel probiotic *Lactobacillus* strains based on high dipeptidyl peptidase IV and α -glucosidase inhibitory activity. **Journal of Functional Foods**, v. 20, n. 17, p. 486–495, 2016.

ZHANG, B. et al. Enhanced isomer purity of lactic acid from the non-sterile fermentation of kitchen wastes. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 4, p. 855–862,

2008.

ZWIELEHNER, J. et al. Combined PCR-DGGE fingerprinting and quantitative-PCR indicates shifts in fecal population sizes and diversity of Bacteroides, bifidobacteria and Clostridium cluster IV in institutionalized elderly. **Experimental gerontology**, v. 44, n. 6–7, p. 440–6, 2009.

MATERIAL SUPLEMENTAR

TABELA S1 – Média (em mm) dos diâmetros dos halos formados no teste de antibiograma com *Enterococcus faecalis* (n=6) e *Lactobacillus fermentum* (n=6) isoladas de leite humano antes e após liofilização.

	Classes	AG		M		GP		Beta lactâmicos								
								Penicilinas			IL	Cafalosporina			CB	
		Amostras	AMI	GEN	ERI	SUL	VAN	AMP	OXA	PEN	AMO	CRO	CIP	CFE	CFL	MER
Antes da liofilização	<i>E. faecalis</i>	25	0■	0■	5■	0■	5■	10■	0■	4■	10■	0■	0■	5■	13■	4■
		93	0■	0■	5■	0■	8■	10■	0■	9■	9■	0■	0■	6■	13■	5■
		96	0■	0■	5■	0■	8■	9■	0■	9■	9■	0■	0■	6■	12■	4■
		106	0■	0■	5■	0■	8■	10■	0■	10■	10■	0■	0■	6■	13■	3■
		175	0■	0■	6■	0■	6■	11■	0■	5■	10■	0■	0■	6■	16♦	5■
		381	0■	0■	6■	0■	9■	11■	0■	10■	10■	0■	0■	7■	17♦	4■
	<i>L. fermentum</i>	464	5■	0■	19♦	0■	0■	29*	15*	25■	30■	15♦	0■	17♦	24*	28*
		465	6■	0■	21♦	0■	0■	34*	14*	29*	33■	18♦	0■	18■	23*	32*
		496	6■	0■	17♦	0■	0■	29*	16*	23■	32■	16♦	0■	16♦	22*	27*
		497	1■	0■	20♦	0■	0■	33*	17*	29*	33■	19♦	0■	19■	26*	33*
		499	4■	0■	22♦	0■	0■	35*	16*	32*	33■	19♦	0■	19■	27*	33*
		500	3■	0■	17♦	0■	0■	32*	15*	26■	30■	17♦	0■	17■	23*	31*
Depois da liofilização	<i>E. faecalis</i>	25	0■	0■	12■	0■	6■	15♦	7■	14■	14■	9■	0■	11■	20*	12■
		93	12■	0■	11■	0■	6■	18*	6■	15■	17■	9■	0■	10■	18*	15♦
		96	13■	0■	11■	0■	8■	17*	5■	13■	17■	10■	0■	11■	18*	15♦
		106	2■	0■	17♦	0■	8■	25*	6■	19■	24*	11■	0■	9■	16♦	21*
		175	6■	0■	19♦	0■	0■	31*	14*	26■	29*	12■	0■	12■	22*	27*
		381	1■	0■	12■	0■	8■	18*	3■	14■	20*	10■	0■	11■	20*	15♦
	<i>L. fermentum</i>	464	4■	0■	20♦	0■	3■	31*	16*	25■	29*	17♦	0■	19*	21*	23*
		465	3■	0■	18♦	0■	0■	33*	13*	22■	31*	21*	0■	15♦	23*	26*
		496	3■	0■	20♦	0■	0■	33*	16*	29*	32*	18♦	0■	19*	25*	32*
		497	4■	0■	20♦	0■	0■	32*	13*	28■	31*	18♦	0■	16♦	17♦	31*
		499	5■	0■	21♦	0■	0■	34*	17*	29*	34*	19♦	0■	20*	24*	33*
		500	3■	0■	20♦	0■	0■	33*	17*	28■	31*	18♦	0■	19*	27*	32*

Legendas: AG=Aminoglicosídeos; M=Macrolídeos; GP=Glicopeptídeos; IL=Inibidor de lactamase; CB=Carbapenem; *=Sensível; ♦=Intermediário; ■=Resistente. Classificação de acordo com CLSI/NCCLS, 2016. Nomenclatura e concentração dos antibióticos: AMI=Amicacina (10µg), GEN=Gentamicina (10µg), ERI=Eritromicina (15µg), SUL=Sulfonamidas (300µg), VAN=Vancomicina (30µg) AMP=Ampicilina (30µg), OXA=Oxacilina (1µg), PEN=Penicilina (10µg), AMO=Amoxicilina (10µg), CRO=Ceftriaxona (30µg), CIP=Ciprofloxacina (5µg), CFE=Cefalexina (30µg), CFL=Cefalotina (30µg) e MER=Meropenem (10µg) Origem: SENSIFAR® (Cefar Diagnóstica, São Paulo, Brasil).

TABELA S2 – Produção ácido láctico (D, L e total) de *Enterococcus faecalis* (n=6) e *Lactobacillus fermentum* (n=6) isolados de leite humano antes e depois de liofilizados. Valores de média e desvio padrão em g L⁻¹ de caldo MRS.

Amostra	Antes da liofilização			Depois da liofilização		
	D-ácido láctico	L-ácido láctico	Ácido láctico total	D-ácido láctico	L-ácido láctico	Ácido láctico total
25	7,82±1,47 ^a	12,13±0,34 ^A	19,95±1,81	2,01±0,5 ^a	16,02±2,39 ^A	18,03±2,88
93	17,49±3,37 ^a	5,22±2,38 ^A	22,71±1,00*	1,55±0,94 ^b	17,34±0,27 ^B	18,89±0,67*
96	19,69±0,64 ^a	2,17±0,64 ^A	21,85±0,00	18,55±4,42 ^a	5,55±2,54 ^A	24,10±1,58
106	0,71±0,29 ^a	18,74±0,66 ^A	19,44±1,68	2,24±0,12 ^a	17,38±1,80 ^A	19,62±1,68
175	0,78±0,69 ^a	19,13±0,16 ^A	19,92±0,55	12,85±0,91 ^b	8,78±1,04 ^B	21,63±0,13
381	0,70±0,34 ^a	17,03±0,84 ^A	17,73±1,18	0,98±0,64 ^b	22,93±1,51 ^A	15,94±2,14
464	12,28±2,37 ^a	9,12±1,55 ^A	21,40±0,82	13,11±0,41 ^a	9,17±0,18 ^A	22,28±0,59
465	12,72±1,34 ^a	8,48±0,76 ^A	21,20±0,57	16,76±1,46 ^a	6,25±0,99 ^A	23,01±0,47
496	15,00±0,59 ^a	7,05±0,34 ^A	19,70±4,16	15,53±0,72 ^a	7,22±0,33 ^A	22,75±1,05
497	11,76±1,53 ^a	9,54±2,32 ^A	21,30±0,79	15,19±6,75 ^a	7,43±4,05 ^A	22,62±2,70
499	11,02±1,33 ^a	8,76±0,78 ^A	19,78±0,56	19,43±0,35 ^b	3,57±0,22 ^A	23,00±0,57
500	13,75±0,58 ^a	7,67±0,67 ^A	21,42±0,10	16,43±1,76 ^a	6,19±2,05 ^A	22,62±0,28

Resultados derivados da comparação de médias de três repetições comparados antes e depois da liofilização. Médias na mesma linha seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Bonferroni. *Diferença estatisticamente significativa ao nível de 5% de significância pelo teste de Bonferroni. Amostras 25, 93, 96, 106, 175 e 381 = *Enterococcus faecalis*, 464, 465, 496, 497, 499 e 500 = *Lactobacillus fermentum*

TABELA S3 - Antagonismo de bactérias isoladas de leite humano frente a patógenos indicadores antes e após liofilização. Média e desvio padrão dos diâmetros dos halos de inibição (em cm).

Isolado	Patógenos indicadores						
	<i>S. aureus</i>	<i>Salmonella</i>	<i>E. coli</i>	<i>Listeria</i>	<i>Cronobacter</i>	<i>C. difficile</i>	
Antes da liofilização	25	1,13±0,21	0,93±0,06	1,80±0,20	1,10±0,17	0,30±0,00	1,00±0,26
	93	2,23±0,06	2,23±0,06	2,77±0,06	2,03±0,23	1,33±0,15	1,97±0,12
	96	2,27±0,25	2,27±0,06	1,70±0,10	2,53±0,12	1,60±0,20	1,50±0,26
	106	1,07±0,15	0,60±0,10	1,10±0,26	1,23±0,06	0,47±0,12	0,43±0,12
	175	0,73±0,15	0,90±0,10	1,07±0,12	0,77±0,06	0,50±0,20	0,37±0,15
	381	1,25±0,05	0,87±0,06	0,43±0,15	0,87±0,06	0,47±0,15	0,43±0,06
	464	1,83±0,21	1,37±0,06	0,63±0,06	1,67±0,06	0,63±0,12	1,53±0,15
	465	1,63±0,10	1,30±0,20	1,37±0,12	1,43±0,06	0,93±0,06	0,97±0,20
	496	1,80±0,20	0,90±0,10	1,70±0,10	1,10±0,17	1,00±0,20	1,30±0,00
	497	1,50±0,20	0,47±0,21	0,67±0,15	1,17±0,21	0,47±0,15	1,13±0,06
	499	1,83±0,06	1,23±0,06	1,30±0,17	0,77±0,06	1,03±0,15	1,23±0,06
500	1,53±0,15	0,87±0,06	0,70±0,10	1,03±0,21	1,10±0,17	0,97±0,06	
Depois da liofilização	25	1,03±0,21	1,07±0,12	1,60±0,20	1,13±0,15	0,50±0,10	0,97±0,06
	93	0,87±0,23	1,93±0,06	2,50±0,17	1,90±0,10	0,73±0,15	2,00±0,10
	96	2,07±0,06	2,23±0,21	0,73±0,06	2,37±0,06	1,30±0,06	0,43±0,06
	106	1,27±0,06	0,70±0,00	1,67±0,40	1,20±0,17	1,07±0,10	0,37±0,12
	175	0,90±0,10	1,00±0,10	1,03±0,15	1,23±0,21	0,83±0,06	0,70±0,10
	381	1,23±0,15	0,87±0,12	2,10±0,17	1,00±0,10	1,07±0,06	1,03±0,06
	464	1,97±0,12	1,13±0,06	2,10±0,10	1,60±0,10	0,80±0,00	1,03±0,15
	465	1,40±0,20	1,27±0,06	1,17±0,12	1,43±0,15	0,87±0,06	0,57±0,06
	496	1,40±0,17	1,27±0,06	1,7±0,06	1,43±0,06	0,87±0,06	0,57±0,12
	497	1,40±0,20	0,63±0,06	1,43±0,06	1,23±0,06	0,63±0,06	0,77±0,12
	499	1,57±0,12	1,13±0,15	2,00±0,10	1,90±0,10	1,10±0,10	1,10±0,10
500	1,47±0,21	0,90±0,10	1,27±0,55	1,13±0,15	1,30±0,10	0,77±0,06	

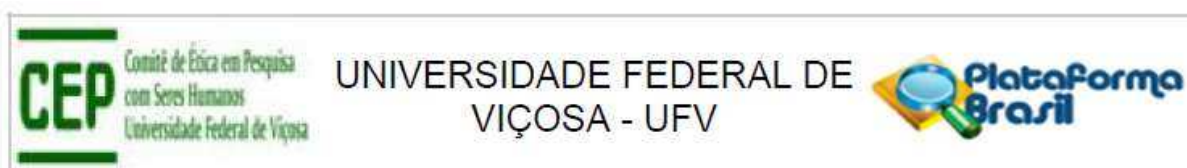
Resultados derivados da comparação de médias de três replicatas comparados antes e depois da liofilização. Amostras 25, 93, 96, 106, 175 e 381 = *Enterococcus faecalis*, 464, 465, 496, 497, 499 e 500 = *Lactobacillus fermentum*. Patógenos: *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43895, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 *Cronobacter sakazakii* ATCC 51329 e *Clostridium difficile* ATCC 43596

CONCLUSÃO GERAL

Uma hipótese putativa do real papel dos diferentes micro-organismos no LH ainda permeia a comunidade científica mas o fato é que esses micro-organismos estão presentes nessa matriz alimentar e que pela periodicidade de presença em diferentes estágios além da considerável concentração, a sua função não deve ser ignorada. Conhecer as espécies predominantes e mais adaptadas a cada fase da lactação além de complementar a necessidade do RN, aproxima ainda mais do natural o leite de BLH que eventualmente venha a ser suplementado com esses micro-organismos. Diante dos dados apresentados é possível concluir que *E. faecalis* e *L. fermentum* podem ser considerados representantes do grupo das bactérias lácticas predominantes no LH em diferentes fases da lactação.

Nenhuma das estirpes testadas pode imediatamente ser utilizada como suplemento em BLH sem antes passar por testes de segurança mais rigorosos. Diante dos resultados, pode-se concluir que embora nenhuma estirpe tenha demonstrado adequação ao que considera-se seguro, pode-se inferir que as características observadas atenderiam às necessidades de cada uma das crianças consumidoras do leite dos quais essas bactérias foram isoladas. A personalização das características das estirpes presentes nos LH ainda necessita de estudos para entender a equação: segurança x fenótipos x TGI do neonato.

ANEXO A - Parecer do comitê de ética em pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Características Probióticas E De Segurança De Bactérias Do Ácido Láctico Isoladas De Leite Humano

Pesquisador: Célia Lúcia de Lucas Fortes Ferreira

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 28002414.1.0000.5153

Instituição Proponente: Departamento de Tecnologia de Alimentos

Patrocinador Principal: Departamento de Tecnologia de Alimentos

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 663.168

Data da Relatoria: 03/06/2014

Apresentação do Projeto:

A partir de isolados de bactérias do ácido láctico do leite humano, será verificada a segurança destes isolados pelo teste de resistência ao soro humano. Para tanto, será necessário realizar a coleta de 300 mL de sangue de indivíduos saudáveis para obtenção do soro, que será o material de estudo.

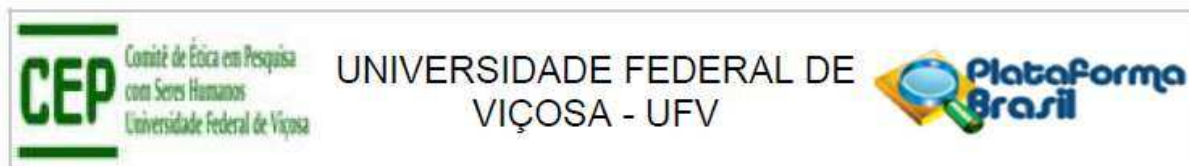
Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar os aspectos funcionais e de segurança de bactérias lácticas (BAL) isoladas do leite humano em diferentes fases de maturação.

Objetivo Secundário:

A. Selecionar BAL isoladas do leite humano em diferentes fases de lactação. B. Determinar a segurança das BAL selecionadas e potencialmente probióticas por meio dos testes da atividade hemolítica, gelatinase e resistência ao soro humano. C. Determinar a funcionalidade das BAL selecionadas por meio da avaliação de resistência a sais biliares, suco gástrico e antagonismo a patógeno.



Continuação do Parecer: 663.168

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Adequadamente descritos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Atende aos critérios do CEP.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Atende aos critérios do CEP.

Recomendações:

Nenhuma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nenhuma pendência.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

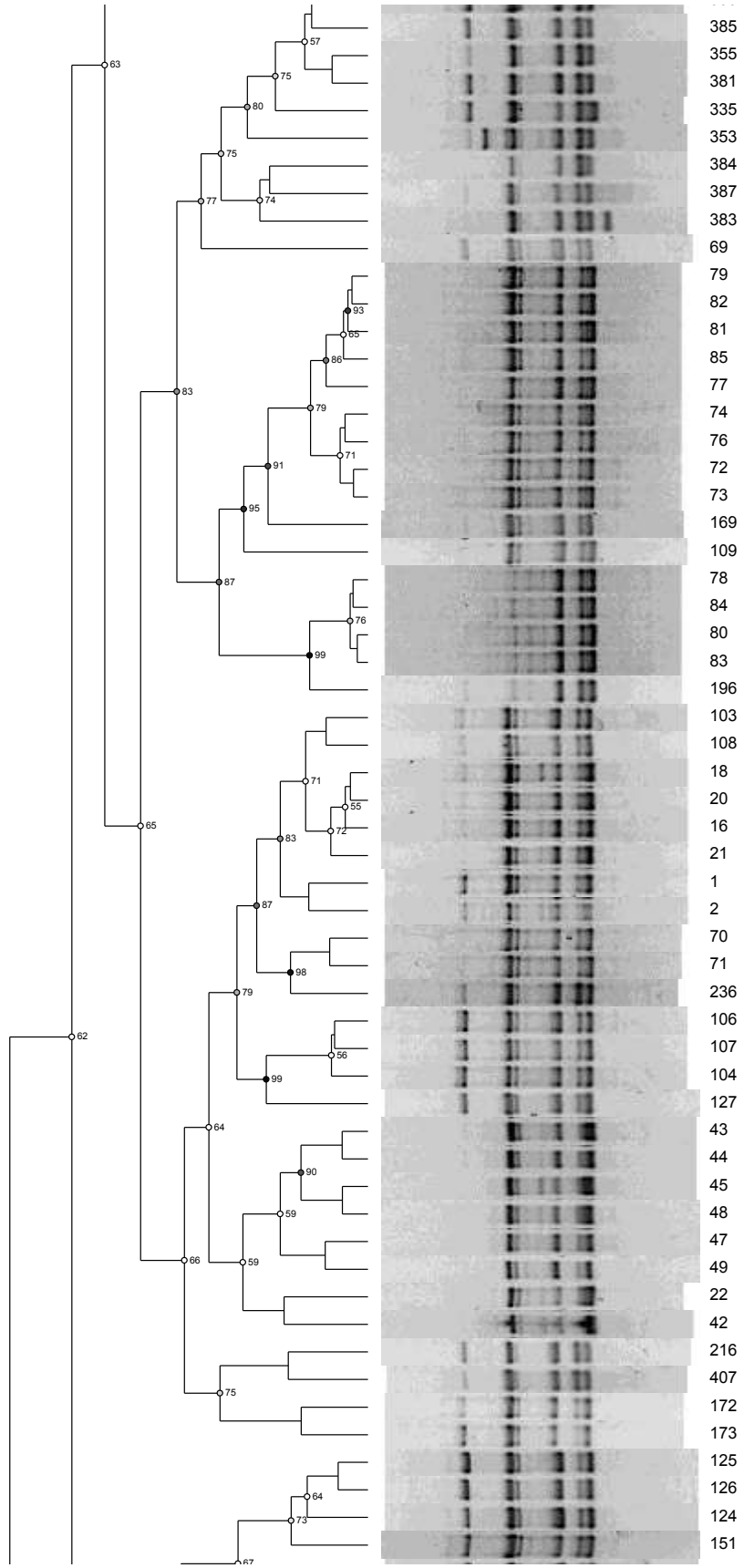
Ao término da pesquisa é necessária a apresentação do Relatório Final e após a aprovação desse, deve ser encaminhado o Comunicado de Término dos Estudos.

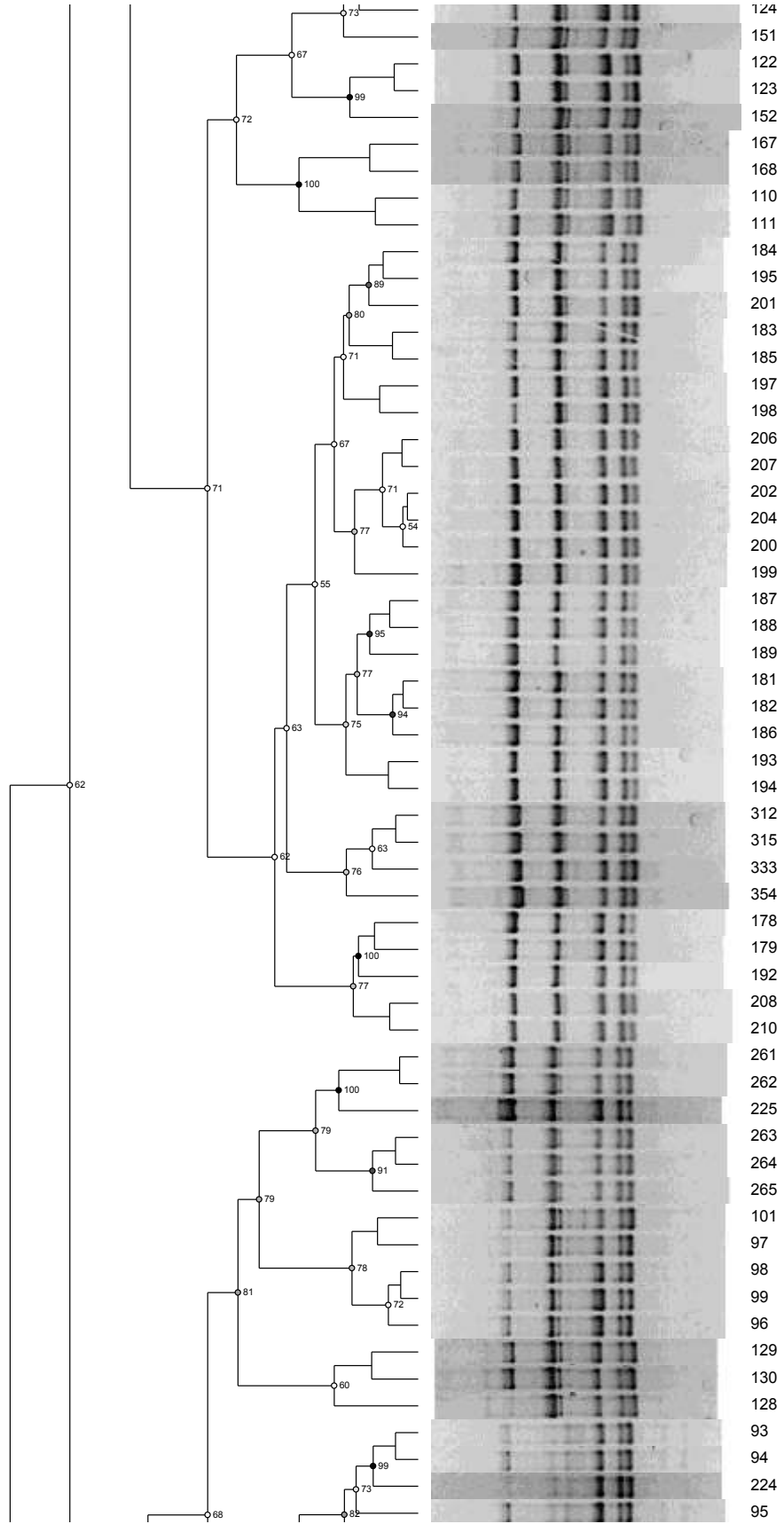
Projeto analisado durante a 3ª reunião de 2014.

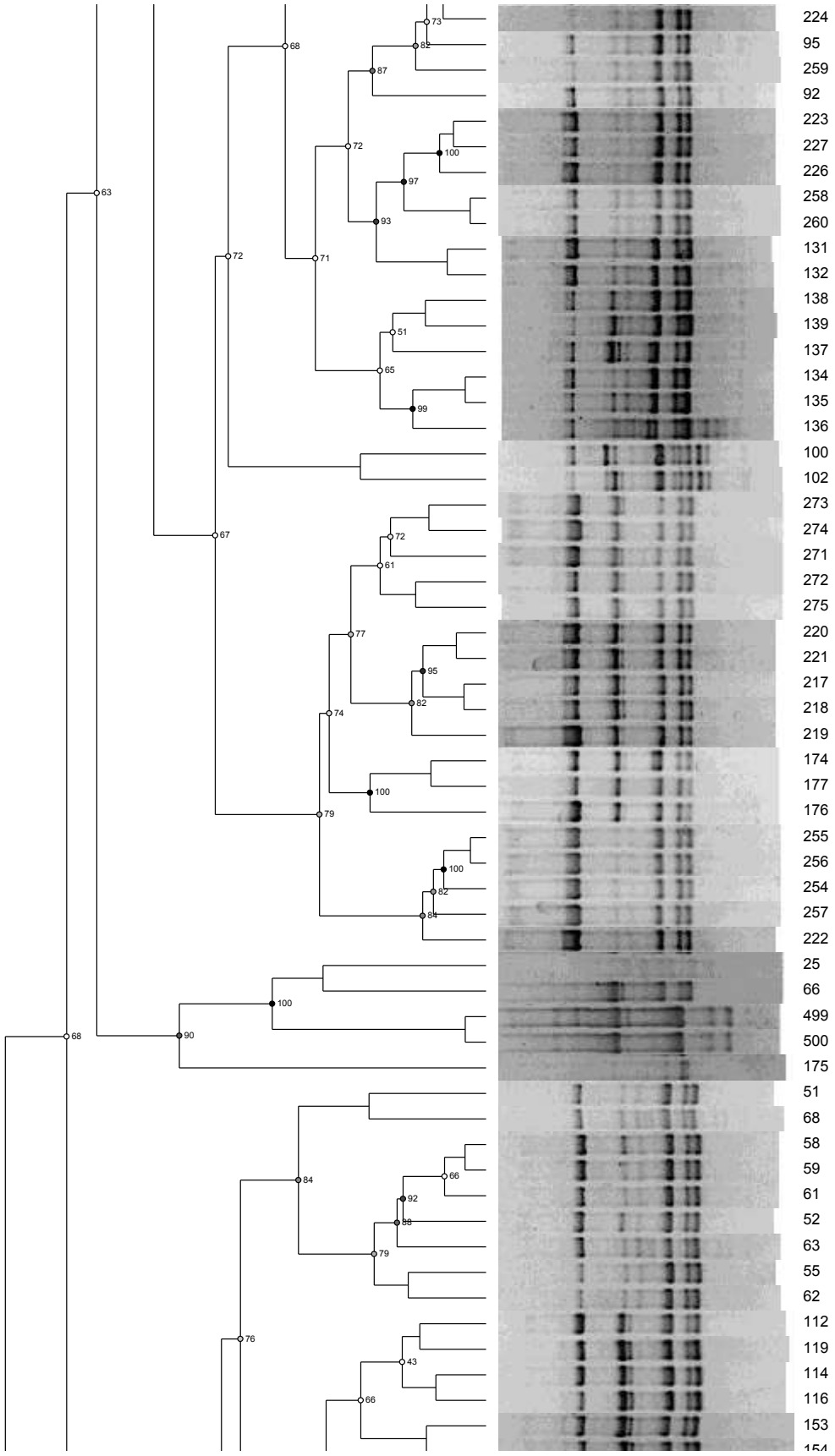
VICOSA, 27 de Maio de 2014

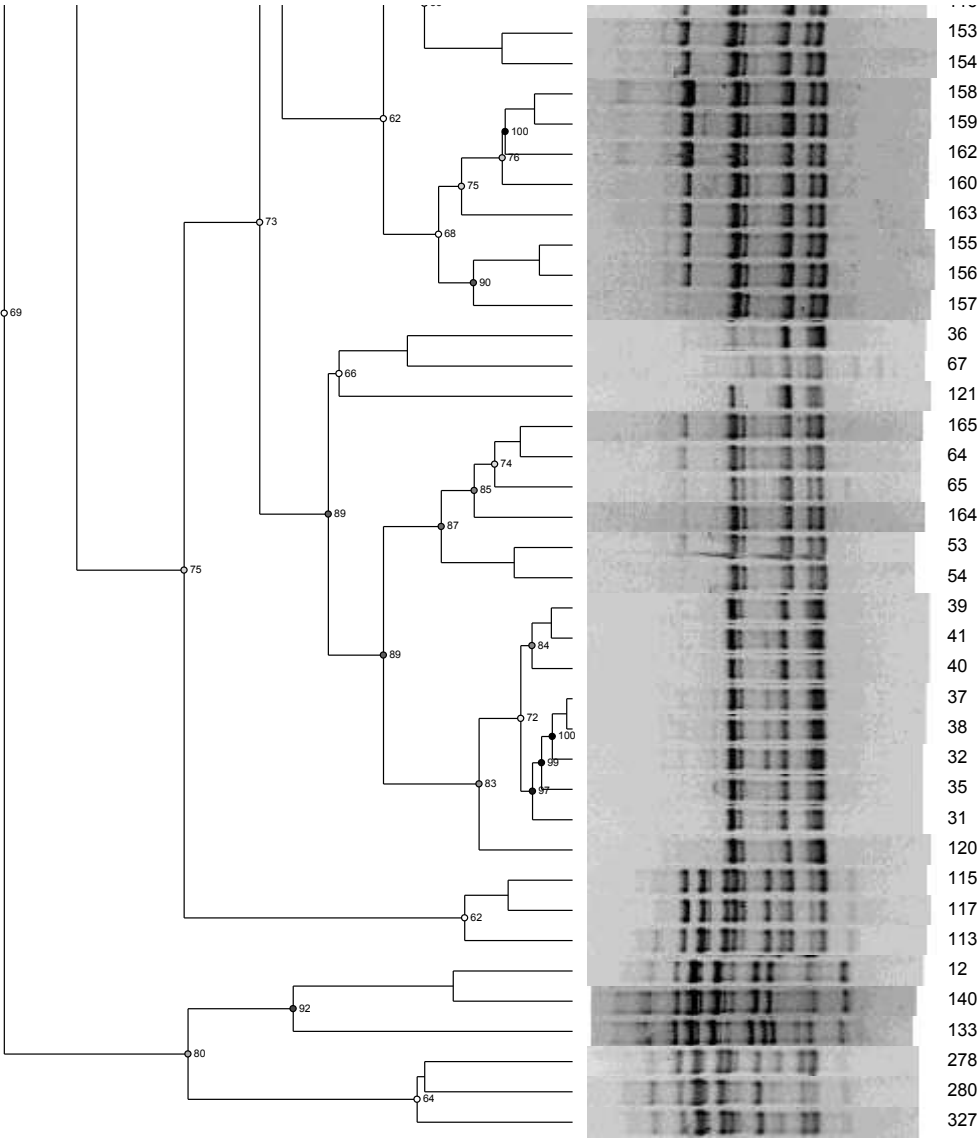
Assinado por:
Patrícia Aurélia Del Nero
(Coordenador)

Endereço: Universidade Federal de Viçosa, prédio Arthur Bernardes, piso inferior
 Bairro: campus Viçosa CEP: 36.570-000
 UF: MG Município: VICOSA
 Telefone: (31)3899-2492 Fax: (31)3899-2492 E-mail: cep@ufv.br









APENDICE 2 – Agrupamento de bactérias isoladas do leite humano em diferentes fases da lactação com 97% de similaridade

Taxonomia	Isolado representante	Sequências presentes na OTU
<i>Bacteria</i> <i>Firmicutes</i> <i>Bacilli</i> <i>Lactobacillales</i> <i>Enterococcaceae</i> <i>Enterococcus</i>	25	25,216,381,89,92,140,174,22,2,66,15,36,122,43,10,113,123,184,196,133,58,190,112,145,102,109,101,231,69,10,197,11,14,46,228,87,273,136,153,229,327,115,280,79,220,223,238,330,230,39,176,138,78,165,333,225,258,255,354,67,250,51,353,19,103,167,172,253,100,261,68,278,150,121,312,384,387,407
<i>Bacteria</i> <i>Firmicutes</i> <i>Bacilli</i> <i>Lactobacillales</i> <i>Lactobacillaceae</i> <i>Lactobacillus</i>	464	464.496.465.497.499
<i>Bacteria</i> <i>Firmicutes</i> <i>Bacilli</i> <i>Lactobacillales</i> <i>Enterococcaceae</i> <i>Enterococcus</i>	96	96
<i>Bacteria</i> <i>Firmicutes</i> <i>Bacilli</i> <i>Lactobacillales</i> <i>Enterococcaceae</i> <i>Enterococcus</i>	93	93
<i>Bacteria</i> <i>Firmicutes</i> <i>Bacilli</i> <i>Lactobacillales</i> <i>Enterococcaceae</i> <i>Enterococcus</i>	106	106
<i>Bacteria</i> <i>Firmicutes</i> <i>Bacilli</i> <i>Lactobacillales</i> <i>Enterococcaceae</i> <i>Enterococcus</i>	175	175

APENDICE 3 – Sequencias representativas da OTU do agrupamento de bactérias isoladas do leite humano em diferentes fases da lactação com 97% de similaridade

25

TTAGGCGGCTGGCTCCAAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGG
TGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATG
CAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAAGTGAAGAGATTTGCATGACCTCGCGGTCTAGCG
ACTCGTTGACTTCCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCGATGATGATTTGACGTCATCCC
CACCTTCCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCGCTAGAGTGCCCAACTAAATGATGGCAACTAACAATAAGGG
TTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACT
TTGTCCCCGAAGGAAAAGCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTT
GCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCTTTGAGTTTCAACCTTGCGG
TCGTAATCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTTGTGTCAGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTAG
CACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCCCCACGCTTTTCGAGCCTCAGCG
TCAGTTACAGACCAGAGAGCCGCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATATCTACGCATTTACCCGCTACACAT
GGAATTCACCTCTCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCT
TTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGCTCGCTTTACGCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTAC
GTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGATACCGTCAGGGGACGTTTCAGTTA
CTAACGTCTTGTCTTCTCTAACAACAGAGTTTTACGATCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTC
GGTCAGACTTTCGTCCATTGCCGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCCTAGGAGTCTGGGCGGTGTCTCAGTC
CCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTGGCTATGCATCGTGGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTA
GCTAATGCACCGCGGGTCCATCCATCAGCGACACCCGAAAGCGCCTTTCACCTTATGCCATGCGGCATAAAA
CTGTTATGCGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTATCCCCCTCTGATGGGTAGGTTACCCACGTGTTACTCA
CCGTCGCCCACTCCTCTTTCCAATTGAGCTGCAAGCACTCGGGAGGAAAGAAGCGTTTCGAC

464

AGGCGGCTGGCTCCTAAAAGGTTACCCACCGACTTTGGGTGTTACAAACTCTCATGGTGTGACGGGCGGT
GTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCGTGC
AGGCGAGTTGCAGCCTGCAGTCCGAAGTGAAGAGATTTGCTTGCCCTCGCGAGTTCCGCA
CTCGTTGTACCGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCGATGATGATCTGACGTGTCCTCC
ACCTTCCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCACTAGAGTGCCCAACTTAATGCTGGCAACTAGTAACAAGGGT
TGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACGACCATGCACCACCTGTNCATT
GCGTTCCCGAAGGAAACGCCCTATCTCTAGGGTTGGCGCAAGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTA
GCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCTTTGAGTTTCAACCTTGCGG
TCGTAATCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTCCGGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACCTAG
CACTCATCGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTACCCATGCTTTTCGAGTCTCAGCGT
CAGTTGCAGACCAGGTAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATATCTACGCATTCCACCGCTACACAT
GGAGTTCCACTACCCTCTTCTGCACTCAAGTTATCCAGTTTCCGATGCACTTCTCCGGTTAAGCCGAAGGCTT
TCACATCAGACTTAGAAAACCGCCTGCACTCTCTTTACGCCAATAAATCCGGATAACGCTTGCCACCTACGT
ATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGACTTTCTGGTTAAATACCGTCAACGTATGAACAGTTACTC
TCATACGTGTTCTTCTTTAACAACAGAGCTTTACGAGCCGAAACCCTTCTTCACTCACGCGGTGTTGCTCCAT
CAGGCTTGCGCCCATTTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCCTAGGAGTATGGGCGGTGTCTCAGTCCC
ATTGTGCGCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGCCTTGGTAGGCCGTTACCCACCAACAAGCT
AATGCACCGCAGGTCCATCCAGAAGTGATAGCGAGAAGCCATCTTTTAAGCGTTGTTTCATGCGAACAACGTT
GTTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAATGTTGTCCCCGCTTCTGGGCAGGTTACCTACGTGTTACTCACC
CGTCCGCCCACTCGTTGGCGACCAAAATCAATCAGGTGCAAGCACCATCAATCAATTGGGCCAACGCGTTGCA
CTTGCA

96

CGAACGCTTCTTTCTCCCGAGTGCTTGCCTCAATTGGAAAGAGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGT
 GGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCA
 TGGCATAAGAGTAAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGA
 GGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACACTGGGACTGAGAC
 ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAAC
 GCCGCGTGANGTGAAGNAAGGTTNTTCGGATCGTNAACNTCTGTTGTTAGAGAAGAACNAAGNGACGNT
 TAGTAACGNAACGTCCCCTGACGGTATCTAACAGAAANGCCACNGGCTAACTACGTGCCAGCAGNCCGC
 GGTAATACGTAGGTGGCNAAGCGTTGTCCGGATNTTATTGGGNCGTNAAAGCGAGCGCAGGCNGGTTTCTT
 AAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGAACTTGAGTGCAGAAG
 AGGANGAGTGGAAATNCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCG
 GCTCTCTGGTCTGTAACGACGCTGAGGCTCGAAAGCTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT
 CCACGCCGTAAACGATGAGTGTAAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGTGCAGCAAACGCATTAAGC
 ACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGNCCCGCACAAGCGGTG
 GAGCATGTGGGTTTAATTNCGAAGCAACGCGAAGAANCCTTTACCANGGTCTTGNACATCCTTTNCCACTC
 TAGAGATAGAGCTTCCCTTCGGGGACAAAGTACAGGTGGTGCATGGTAGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAG
 ATGTTGGGCTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTAGTTGGGCACTCTAGCG
 AGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTA
 CACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTCGCTAGACCGCGAGGTCATGAAAATGTCTAAAGCTTCTCT
 CAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCG
 CGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGG
 TGAGGTAACCTTTGGAGCCAGCCGCCTAA

93

GATTGAGGTGAAGGCGCTTTCAGGTGTCCGTAATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAAGTA
 ACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG
 CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCG
 CGTGAGTGAAGAAGGTTTTCCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACTGAACG
 TCCCCTGACGGTATNCTAACAGAAAGCCACGGNCTANACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGT
 GGCNAAGCGTTGTCCGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGNC
 CCCC GGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCAT
 GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACGA
 CGCTGAGGCTCGAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGT
 GCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCNTTCAGTGTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTAC
 GACCGCAAGGTTGAAANCTCAAAGGAATTGACGGGGNCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTN
 CGAANGCAACGCGAAGAANCCTTNACCAGGNTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTTNCCC
 TTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGATGTTGGGNTTAAGTCCC
 GCAACGANGCGCAACCCNTTATTGTTAGTTGCCATCATTAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTGACA
 AACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAAT
 GGGAAGTACAACGAGTCGCTAGACCGCGAGGTCATGTGAGAGTTTGTCTGTCTCTCAGTTCGGATTGCAG
 GCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCC
 CGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGGGGTAACCTTTT
 GGAGCCAGCCGCCTAA

106

GGGTGAGTAGCACGTGGCACCCCTACCCATCGGAGGGGGATAAACACTTGAAGCAGGTGTTTTGACCGCAG
 ACCACTTTATGCCGAAAGATAATTGAGTGAAAGGCGCTTTCCGGTGTCCCTAATGGATGGACCCGCGGTGCA
 TTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCAC
 ACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGT
 CTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGTTTTCCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGG
 ACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC
 GGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGNCGGTTTTCTTAAGT
 CTGATGTNGAAAGCCCCNNGNCTCAACCGGGNAGGGNTCATTGGNAACTGGGNAGACTTGAGTGCAG
 AANGAGGAGAGTGNAATTCCATGTGNTAGCGGNTGAAATGCGTAGATATATGGNAGGAACACCAGTGGNC
 GAAGGCGGNCTCTCTGGNTCTGTAACGACGCTGAGGCTCGAAAAGCGTGGGGGAGCAAACAGGATTAGAT
 ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCA
 AACCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGC
 ACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCAAGCAACCGCAAGAACCTTACCAGGCTTGACATCCTTTGACC
 ACTCTAGAGATAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCT
 GAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTCTA
 GCGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGG
 CTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTCGCTAGACCGCGAGGTCATGTAAATCTCTTAACGCTTC
 TCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCAG
 CCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCCGAAGT
 CGGTGAGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCTAAGG

175

TGTGACGGGACGGTGTGTACAACGCCCGGGTAACCTATTCACCGCAGCGTGATAATCCTCGATTACAAGCG
 ATTCCAGCTTCATGCAGGCTAGTTGCAACGTGCAATCAGAAGCTTTAAGACATTTACATGAGCT
 CCCGCTCTACCGACTCTTTGACTTCCCATTGTACCACGTGTGTACCCCATGTCATAACGAGCAGGATGATTT
 AACGTCCTCCCCGCTTCTCCGGTTTGTACCGTCTACTCGCTGCAGTGCCAGCTAANTGATGGCAACT
 ANCAATAAGGGTTGCNCTCGTTGCGGGACTTAACCAACNTNTCAGGACANGAGCTGACNACNACCATGCA
 CCACCTGTCACTTTGTCCCCGAAGGGAAAGCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAG
 GTTCTTCGCGTTGCTTCAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTT
 CAACCTTGCGGTGCTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTTGTGCAGCACTGAAGGGCGGAAACCC
 CCAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCCCCACGCTTTG
 AGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGCCGCTTCCGCACTGGTGTTCCTCCATATATCTACGCATTTCA
 CCGCTACACATGGAATTCACCTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGA
 GCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGCTCGCTTACGCCCAATAAATCCGGACAACGCT
 TGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCAGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGATACCGTCAGGGG
 ACGTTCAGTTACTAACGTCCTTGTCTTCTAACAACAGAGTTTTACGATCCGAAAACCTTCTTCACTCACGC
 GCGGTTGCTCGGTCAGACTTTCGTCCATTGCCGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCC
 GTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTATGCATCGTGGCCTTGGTGAGCCGTTAC
 CTCACCAACTAGCTAATGCACCGCGGGTCCATCCATCAGCGACACCCGAAAGCGCCTTTCCTTATGCCA
 TGCGGCATAAACTGTTATGCGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTATCCCCCTCTGATGGGTAGGTTACCCA
 CGTGTACTCACCCGTCCGCCACTCCTCTTCCAATTGAGTGCAAGCACTCGGGAGGAAAGAAGCGTTCGAC
 TGCA

APENDICE 4 – Identificação, nomenclatura na Coleção de Culturas da Universidade Federal de Viçosa, origem e Assession number das bactérias isoladas do leite humano em diferentes fases da lactação

Nº do isolado	Identificação	Nº UFVCC	Origem	Assession number
2	<i>Enterococcus faecalis</i>	1202	Tempo: 5 Mãe: 1 Meio: MRS	MF286740
10	<i>Enterococcus faecalis</i>	1203	Tempo: 5 Mãe: 2 Meio: MRS	MF327151
11	<i>Enterococcus faecalis</i>	1204	Tempo: 5 Mãe: 3 Meio: MRS	MF327159
12	<i>Enterococcus faecalis</i>	1205	Tempo: 5 Mãe: 3 Meio: MRS	MF327155
14	<i>Enterococcus faecalis</i>	1206	Tempo: 5 Mãe: 3 Meio: MRS	MF327153
15	<i>Enterococcus faecalis</i>	1207	Tempo: 5 Mãe: 3 Meio: MRS	MF327168
19	<i>Enterococcus faecalis</i>	1208	Tempo: 5 Mãe: 4 Meio: MRS	MF327154
22	<i>Enterococcus faecalis</i>	1209	Tempo: 5 Mãe: 5 Meio: MRS	MF327158
25	<i>Enterococcus faecalis</i>	1210	Tempo: 5 Mãe: 5 Meio: MRS	MF327157
36	<i>Enterococcus faecalis</i>	1211	Tempo: 5 Mãe: 8 Meio: MRS	MF327156
39	<i>Enterococcus faecalis</i>	1212	Tempo: 5 Mãe: 8 Meio: MRS	MF327152
43	<i>Enterococcus faecalis</i>	1213	Tempo: 5 Mãe: 9 Meio: MRS	MF327167
46	<i>Enterococcus faecalis</i>	1214	Tempo: 5 Mãe: 10 Meio: MRS	MF327165
51	<i>Enterococcus faecalis</i>	1215	Tempo: 5 Mãe: 11 Meio: MRS	MF327161
58	<i>Enterococcus faecalis</i>	1216	Tempo: 15 Mãe: 1 Meio: MRS	MF327181
66	<i>Enterococcus faecalis</i>	1217	Tempo: 15 Mãe: 3 Meio: MRS	MF327160
67	<i>Enterococcus faecalis</i>	1218	Tempo: 15 Mãe: 3 Meio: MRS	MF327164
68	<i>Enterococcus faecalis</i>	1219	Tempo: 15 Mãe: 3 Meio: MRS	MF327162
69	<i>Enterococcus faecalis</i>	1220	Tempo: 15 Mãe: 3 Meio: MRS	MF327163
78	<i>Enterococcus faecalis</i>	1221	Tempo: 15 Mãe: 5 Meio: MRS	MF327166
79	<i>Enterococcus faecalis</i>	1222	Tempo: 15 Mãe: 5 Meio: MRS	MF327169
87	<i>Enterococcus faecalis</i>	1223	Tempo: 15 Mãe: 7 Meio: MRS	MF327171
89	<i>Enterococcus faecalis</i>	1224	Tempo: 15 Mãe: 7 Meio: MRS	MF327173
92	<i>Enterococcus faecalis</i>	1225	Tempo: 15 Mãe: 8 Meio: MRS	MF327170
93	<i>Enterococcus faecalis</i>	1226	Tempo: 15 Mãe: 8 Meio: MRS	MF289990
96	<i>Enterococcus faecalis</i>	1227	Tempo: 15 Mãe: 9 Meio: MRS	MF290423
100	<i>Enterococcus faecalis</i>	1228	Tempo: 15 Mãe: 9 Meio: MRS	MF327178
101	<i>Enterococcus faecalis</i>	1229	Tempo: 15 Mãe: 10 Meio: MRS	MF327184
102	<i>Enterococcus faecalis</i>	1230	Tempo: 15 Mãe: 10 Meio: MRS	MF327182
103	<i>Enterococcus faecalis</i>	1231	Tempo: 15 Mãe: 10 Meio: MRS	MF327179
106	<i>Enterococcus faecalis</i>	1232	Tempo: 15 Mãe: 11 Meio: MRS	MF293787
109	<i>Enterococcus faecalis</i>	1233	Tempo: 15 Mãe: 11 Meio: MRS	MF327172
110	<i>Enterococcus faecalis</i>	1234	Tempo: 15 Mãe: 11 Meio: MRS	MF327176
112	<i>Enterococcus faecalis</i>	1235	Tempo: 30 Mãe: 1 Meio: MRS	MF327175
113	<i>Enterococcus faecalis</i>	1236	Tempo: 30 Mãe: 1 Meio: MRS	MF327183
115	<i>Enterococcus faecalis</i>	1237	Tempo: 30 Mãe: 1 Meio: MRS	MF327177
121	<i>Enterococcus faecalis</i>	1238	Tempo: 30 Mãe: 3 Meio: MRS	MF327186

122	<i>Enterococcus faecalis</i>	1239	Tempo: 30 Mãe: 3 Meio: MRS	MF327185
123	<i>Enterococcus faecalis</i>	1240	Tempo: 30 Mãe: 3 Meio: MRS	MF327174
128	<i>Enterococcus faecalis</i>	1241	Tempo: 30 Mãe: 4 Meio: MRS	MF327189
133	<i>Enterococcus faecalis</i>	1242	Tempo: 30 Mãe: 5 Meio: MRS	MF327180
136	<i>Enterococcus faecalis</i>	1243	Tempo: 30 Mãe: 6 Meio: MRS	MF327194
138	<i>Enterococcus faecalis</i>	1244	Tempo: 30 Mãe: 6 Meio: MRS	MF327191
140	<i>Enterococcus faecalis</i>	1245	Tempo: 30 Mãe: 6 Meio: MRS	MF327190
145	<i>Enterococcus faecalis</i>	1246	Tempo: 30 Mãe: 7 Meio: MRS	MF327192
150	<i>Enterococcus faecalis</i>	1247	Tempo: 30 Mãe: 8 Meio: MRS	MF327204
153	<i>Enterococcus faecalis</i>	1248	Tempo: 30 Mãe: 8 Meio: MRS	MF327193
158	<i>Enterococcus faecalis</i>	1249	Tempo: 30 Mãe: 10 Meio: MRS	MF327187
165	<i>Enterococcus faecalis</i>	1250	Tempo: 30 Mãe: 11 Meio: MRS	MF327200
167	<i>Enterococcus faecalis</i>	1251	Tempo: 60 Mãe: 1 Meio: MRS	MF327197
172	<i>Enterococcus faecalis</i>	1252	Tempo: 60 Mãe: 2 Meio: MRS	MF327201
174	<i>Enterococcus faecalis</i>	1253	Tempo: 60 Mãe: 2 Meio: MRS	MF327198
175	<i>Enterococcus faecalis</i>	1254	Tempo: 60 Mãe: 2 Meio: MRS	MF318496
176	<i>Enterococcus faecalis</i>	1255	Tempo: 60 Mãe: 3 Meio: MRS	MF327195
178	<i>Enterococcus faecalis</i>	1256	Tempo: 60 Mãe: 3 Meio: MRS	MF327199
184	<i>Enterococcus faecalis</i>	1257	Tempo: 60 Mãe: 4 Meio: MRS	MF327202
190	<i>Enterococcus faecalis</i>	1258	Tempo: 60 Mãe: 5 Meio: MRS	MF327203
196	<i>Enterococcus faecalis</i>	1259	Tempo: 60 Mãe: 7 Meio: MRS	MF327196
197	<i>Enterococcus faecalis</i>	1260	Tempo: 60 Mãe: 7 Meio: MRS	MF327206
216	<i>Enterococcus faecalis</i>	1261	Tempo: 60 Mãe: 11 Meio: MRS	MF327207
220	<i>Enterococcus faecalis</i>	1262	Tempo: 60 Mãe: 11 Meio: MRS	MF327205
223	<i>Enterococcus faecalis</i>	1263	Tempo: 90 Mãe: 1 Meio: MRS	MF327208
225	<i>Enterococcus faecalis</i>	1264	Tempo: 90 Mãe: 1 Meio: MRS	MF327211
228	<i>Enterococcus faecalis</i>	1265	Tempo: 90 Mãe: 2 Meio: MRS	MF327210
229	<i>Enterococcus faecalis</i>	1266	Tempo: 90 Mãe: 2 Meio: MRS	MF327209
230	<i>Enterococcus faecalis</i>	1267	Tempo: 90 Mãe: 3 Meio: MRS	MF327213
231	<i>Enterococcus faecalis</i>	1268	Tempo: 90 Mãe: 3 Meio: MRS	MF327222
238	<i>Enterococcus faecalis</i>	1269	Tempo: 90 Mãe: 4 Meio: MRS	MF327217
250	<i>Enterococcus faecalis</i>	1270	Tempo: 90 Mãe: 6 Meio: MRS	MF327221
253	<i>Enterococcus faecalis</i>	1271	Tempo: 90 Mãe: 7 Meio: MRS	MF327218
256	<i>Enterococcus faecalis</i>	1272	Tempo: 90 Mãe: 8 Meio: MRS	MF327212
258	<i>Enterococcus faecalis</i>	1273	Tempo: 90 Mãe: 8 Meio: MRS	MF327214
261	<i>Enterococcus faecalis</i>	1274	Tempo: 90 Mãe: 9 Meio: MRS	MF327216
273	<i>Enterococcus faecalis</i>	1275	Tempo: 90 Mãe: 11 Meio: MRS	MF327219
278	<i>Enterococcus faecalis</i>	1276	Tempo: 5 Mãe: 1 Meio: Rogosa	MF327220
280	<i>Enterococcus faecalis</i>	1277	Tempo: 5 Mãe: 1 Meio: Rogosa	MF327228
312	<i>Enterococcus faecalis</i>	1278	Tempo: 5 Mãe: 8 Meio: Rogosa	MF327215
327	<i>Enterococcus faecalis</i>	1279	Tempo: 5 Mãe: 11 Meio: Rogosa	MF327224
330	<i>Enterococcus faecalis</i>	1280	Tempo: 5 Mãe: 11 Meio: Rogosa	MF327231
333	<i>Enterococcus faecalis</i>	1281	Tempo: 15 Mãe: 1 Meio: Rogosa	MF327223

353	<i>Enterococcus faecalis</i>	1282	Tempo: 15 Mãe: 5 Meio: Rogosa	MF327229
354	<i>Enterococcus faecalis</i>	1283	Tempo: 15 Mãe: 5 Meio: Rogosa	MF327227
381	<i>Enterococcus faecalis</i>	1284	Tempo: 15 Mãe: 11 Meio: Rogosa	MF327235
384	<i>Enterococcus faecalis</i>	1285	Tempo: 15 Mãe: 11 Meio: Rogosa	MF327237
387	<i>Enterococcus faecalis</i>	1286	Tempo: 30 Mãe: 1 Meio: Rogosa	MF327232
407	<i>Enterococcus faecalis</i>	1287	Tempo: 30 Mãe: 5 Meio: Rogosa	MF327230
444	<i>Enterococcus faecalis</i>	1288	Tempo: 60 Mãe: 1 Meio: Rogosa	MF327234
464	<i>Lactobacillus fermentum</i>	1289	Tempo: 60 Mãe: 5 Meio: Rogosa	MF320242
465	<i>Lactobacillus fermentum</i>	1290	Tempo: 60 Mãe: 5 Meio: Rogosa	MF327233
496	<i>Lactobacillus fermentum</i>	1291	Tempo: 90 Mãe: 1 Meio: Rogosa	MF327238
497	<i>Lactobacillus fermentum</i>	1292	Tempo: 90 Mãe: 1 Meio: Rogosa	MF327226
499	<i>Lactobacillus fermentum</i>	1293	Tempo: 90 Mãe: 1 Meio: Rogosa	MF327225
500	<i>Lactobacillus fermentum</i>	1294	Tempo: 90 Mãe: 1 Meio: Rogosa	MF327236