

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

Gabriela Merker Breyer

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS
ISOLADAS DE LEITE DE BÚFALA**

Porto Alegre
2020

Gabriela Merker Breyer

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS
ISOLADAS DE LEITE DE BÚFALA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Amanda de Souza da Motta

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Franciele Maboni Siqueira

Porto Alegre

2020

"I have no special talent. I'm only passionately curious"

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

A meus pais, Rogério e Fabiana, por sempre me encorajarem a seguir meus objetivos e apoiarem minhas decisões. Obrigada por se orgulharem de cada conquista.

A meu namorado, Vitor, por ser o apoio que preciso nos momentos difíceis. Obrigada por ouvir com interesse minhas aventuras no laboratório e também por ser capaz de me distrair delas.

A minha orientadora, Amanda, pela orientação, dedicação e amizade. Obrigada por confiar e incentivar meu trabalho.

A minha coorientadora, Fran, pela orientação e constante incentivo. Obrigada por estar sempre presente na minha carreira acadêmica.

Aos colegas do Laboratório 222C do ICBS – Alberto, Júlia, Juliana, Letícia, Luana, Nathasha, Rosana, Tiela e Vanise –, por serem companheiros na bancada e na vida, sempre trocando ideias e compartilhando conhecimentos. Obrigada por me mostrarem que ciência não é um ambiente de competição, mas sim de troca de experiências e conhecimento.

Às meninas do LABACVET, que me receberam muito bem, me acolhendo no grupo tão rapidamente.

A meus amigos – Carol, Karina, Laís e Solon –, que sempre estão presentes na minha vida e a tornam muita mais feliz e leve.

Aos professores e colegas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, que usam o conhecimento como sua melhor forma de resistência.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo ensino de qualidade e referência, e ao apoio financeiro da CAPES.

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS ISOLADAS DE LEITE DE BÚFALA¹

Autor: Gabriela Merker Breyer

Orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Amanda de Souza da Motta

Coorientadora: Prof.^a. Dr.^a. Franciele Maboni Siqueira

RESUMO

Bactérias ácido-lácticas (BALs) são microrganismos de grande importância para a indústria de alimentos, visto que estão geralmente associados à atividade funcional, como culturas potencialmente probióticas ou *starters*. O crescente interesse por alimentos funcionais faz com que se busquem novas linhagens com tal potencial. Concomitantemente, a produção bubalina no Brasil vem aumentando significativamente nas últimas décadas, bem como o consumo de derivados do leite de búfala; entretanto há uma escassez de informação sobre o potencial probiótico de BALs provenientes do leite desses animais. Portanto, neste trabalho, a diversidade de BALs em amostras de leite cru de búfala de dois laticínios gaúchos foi avaliada por cultivo seguido de MALDI-TOF/MS e sequenciamento parcial do gene 16S rDNA. Onze isolados foram selecionados como possíveis candidatos a probiótico, e a inocuidade dos mesmos foi analisada através da avaliação de atividade hidrolítica, susceptibilidade a antimicrobianos por disco difusão, e presença de genes de virulência por reações em cadeia da polimerase (PCR). Tais testes permitiram a identificação de seis cepas inócuas. Destas, dois isolados – *L. rhamnosus* LB1.5 e *L. paracasei* LB6.4 –, foram selecionados para avaliação do seu potencial probiótico em testes *in vitro*, para determinação de sua capacidade de adesão, agregação e tolerância às condições adversas do trato gastrointestinal (TGI). Ambas as cepas demonstraram características que sugerem seu potencial probiótico. Além disso, foi possível determinar o efeito do estresse ácido na expressão de genes alvo de *L. rhamnosus* LB1.5 e *L. paracasei* LB6.4, para melhor compreender a resposta transcricional destas bactérias frente às condições adversas do TGI humano.

¹ Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (54 p.) Março, 2020.

PROBIOTIC POTENTIAL ASSESSMENT OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM RAW BUFFALO MILK¹

Author: Gabriela Merker Breyer

Advisor: Prof. Dr. Amanda de Souza da Motta

Co-Advisor: Prof. Dr. Franciele Maboni Siqueira

ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB) are important microorganisms for the food industry, as they are generally associated with functional activity, such as probiotic and starter cultures. The crescent interest for functional food has led industry to search for novel probiotic candidates. Meanwhile, buffalo production is growing significantly for the last decades in Brazil, as well as bubaline milk and derivatives consumption; however there is still a gap on probiotic potential of LAB isolated from raw buffalo milk. Therefore, we analyzed the LAB diversity in fresh milk samples from two dairy industries by culture followed by MALDI-TOF/MS and partial 16S rDNA sequencing. We selected 11 strains as probiotic candidates. An innocuity assessment was performed by hydrolytic activity tests, susceptibility to antibiotics by disc diffusion method, and presence of virulence factors by polymerase chain reactions (PCR) assay. This screening allowed the identification of six innocuous strains, and two with advantageous features were selected for further probiotic potential analyses: *L. rhamnosus* LB1.5 e *L. paracasei* LB6.4. Their adhesion and aggregation abilities were assessed, as well as their tolerance to the conditions of the gastrointestinal tract. Both demonstrated features that suggest their probiotic potential. Furthermore, the relative expression of target genes in acid stress was analyzed, so we can better understand the transcriptional response of those isolates to the human gastrointestinal conditions.

¹ Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (54 p.) March, 2020.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	2
2.1 Objetivo Geral.....	2
2.2 Objetivos Específicos	2
3. REVISÃO DA LITERATURA	3
3.1 Leite bubalino: características e contexto microbiológico	3
3.2 Microrganismos probióticos e seus benefícios	4
3.3 Avaliação do potencial probiótico de um microrganismo	5
3.4 Mecanismos envolvidos na tolerância ao TGI	6
4. MATERIAL E MÉTODOS	8
4.1 Caracterização preliminar dos isolados de BALs de leite de búfala	8
4.2 Identificação por MALDI-TOF/MS.....	8
4.3 Sequenciamento parcial do gene 16S rDNA e análise filogenética.....	8
4.4 Avaliação da inocuidade das BALs.....	9
4.4.1 Susceptibilidade a antimicrobianos	9
4.4.2 Avaliação da atividade hemolítica	10
4.4.3 Avaliação da atividade de gelatinase	10
4.4.4 Presença de genes de virulência	10
4.5 Produção de exopolissacarídeos.....	11
4.6 Avaliação do potencial probiótico das BALs <i>in vitro</i>	12
4.6.1 Seleção das BALs de interesse	12
4.6.1 Avaliação da capacidade de adesão.....	12
4.6.2 Avaliação da capacidade de auto e coagregação.....	13
4.6.3 Tolerância ao trato gastrointestinal simulado	14
4.7 Análise da expressão relativa de genes alvo frente às condições do TGI.....	15
4.7.1 Seleção de genes alvo e desenho de oligonucleotídeos.....	15
4.7.2 Extração de RNA e síntese de cDNA.....	16
4.7.3 PCR quantitativo	17
5. RESULTADOS	19
5.1 Caracterização e identificação dos isolados por MALDI-TOF/MS	19
5.2 Sequenciamento 16S rDNA e análise filogenética	22

5.3	Avaliação da inocuidade das BALs.....	24
5.3.1	Susceptibilidade a antimicrobianos	24
5.3.2	Atividade hidrolítica	25
5.3.3	Perfil de virulência	26
5.4	Produção de exopolissacarídeos.....	26
5.5	Avaliação do potencial probiótico das BALs <i>in vitro</i>	27
5.5.1	Capacidade de adesão	27
5.5.2	Capacidade de agregação	28
5.5.3	Tolerância ao trato gastrointestinal simulado	31
5.6	Análise da expressão relativa de genes alvo frente às condições do TGI.....	32
5.6.1	Extração de RNA e síntese de cDNA.....	32
5.6.2	PCR quantitativo	33
6.	DISCUSSÃO	38
7.	CONCLUSÃO	47
8.	REFERÊNCIAS	48

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1	11
Tabela 2	14
Tabela 3	16
Tabela 4	20
Tabela 5	25
Tabela 6	28
Tabela 7	29
Tabela 8	30

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1	19
Figura 2	22
Figura 3	23
Figura 4	24
Figura 5	26
Figura 6	26
Figura 7	27
Figura 8	29
Figura 9	30
Figura 10	32
Figura 11	33
Figura 12	34
Figura 13	35
Figura 14	35
Figura 15	36
Figura 16	36
Figura 17	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BAL	bactéria ácido-láctica
BrCast	<i>Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
Caco-2	células de adenocarcinoma colorretal humano
CLA	ácido linoleico conjugado (do inglês <i>conjugated linoleic acid</i>)
cDNA	DNA complementar
CMI	concentração mínima inibitória
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>desoxirribonucleic acid</i>)
DNase	desoxirribonuclease
dNTP	desoxirribonucleotídeos trifosfato (do inglês <i>deoxyribonucleotide triphosphate</i>)
DTT	Ditiotreitol
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
EPS	exopolissacarídeo
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (do inglês <i>Food and Agricultural Organization of United Nations</i>)
g	força G
ITS	<i>Internal Transcribed Spacers Elements</i>
LDL	<i>low-density lipoprotein</i>
MALDI	Desorção/ionização de matriz assistida por laser (do inglês <i>matrix assisted laser desorption/ionization</i>)
MH	meio de cultivo Mueller Hinton
mRNA	RNA mensageiro
MRS	meio de cultivo Man Rogosa Sharpe

MS	Espectroscopia de massas (do inglês <i>Mass spectroscopy</i>)
NBRC	NITE <i>Biological Resource Center</i>
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NRTC	<i>no reverse transcriptase control</i>
NTC	<i>no template control</i>
PA	para análise
pb	pares de base
PBS	tampão fosfato-salino (do inglês <i>phosphate buffered saline</i>)
PCA	meio de cultivo <i>Plate Count Agar</i>
PCR	reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>polymerase chain reaction</i>)
pH	potencial de hidrogênio
qPCR	PCR quantitativo
rDNA	DNA ribossômico
RNA	ácido ribonucleico (do inglês <i>ribonucleic acid</i>)
RT	transcrição reversa (do inglês <i>reverse transcription</i>)
rep	<i>Repetitive DNA Element</i>
rpm	rotações por minuto
RRM	meio de cultivo <i>Ruthenium Red Milk</i>
SGS	suco gástrico simulado
SIS	suco intestinal simulado
TGI	trato gastrintestinal
Tm	temperatura de Melting
UFC	unidades formadoras de colônia
WHO	Organização Mundial da Saúde (do inglês <i>World Health Organization</i>)

1. INTRODUÇÃO

O leite bubalino é um produto alimentar altamente nutritivo, possuindo elevado teor de gordura, proteínas e minerais em sua composição, tendo portanto um maior rendimento na produção de derivados. Além disso, sua produção vem aumentando ao longo das últimas décadas e atraindo um crescente nicho de mercado. No entanto, apesar do maior interesse comercial, este ainda é um produto pouco explorado quanto a suas propriedades probióticas.

O potencial probiótico de um alimento está relacionado com a presença de microrganismos, tais como bactérias ácido-lácticas (BALs). Tais bactérias são amplamente estudadas, porém ensaios específicos são necessários para determinação de seu potencial de tolerância ao trato gastrointestinal (TGI) para que cheguem à microbiota do hospedeiro e desempenhem suas funções como probióticos. De modo geral, bactérias probióticas estimulam o sistema imunológico, reduzem os níveis de colesterol total e de lipoproteínas plasmáticas de baixa densidade (LDL), corroboram para digestão de proteínas, e aumentam a absorção de vitaminas e minerais. Estes benefícios fazem com que a indústria de alimentos explore cada vez mais o potencial probiótico de microrganismos. Ademais, atualmente a população mundial busca por um estilo de vida mais saudável, o que aumenta a procura por alimentos com propriedades funcionais que beneficiem sua saúde e melhorem sua qualidade de vida.

Portanto, avaliar a presença de BALs e seu potencial probiótico em leite bubalino é extremamente relevante, visto que se trata de um produto pouco explorado neste sentido. Dito isso, o presente estudo buscou expandir os conhecimentos quanto à diversidade de BALs em leite de búfala, identificando e caracterizando tais bactérias quanto a seu potencial probiótico.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Identificar e caracterizar a diversidade de bactérias ácido-lácticas isoladas de amostras de leite bubalino cru de dois laticínios de Glorinha e Cassino – RS, visando a prospecção de isolados com potencial probiótico.

2.2 Objetivos Específicos

- 2.2.1** Identificar os gêneros e espécies de bactérias previamente isoladas de amostras de leite bubalino cru;
- 2.2.2** Avaliar *in vitro* o potencial probiótico de isolados selecionados, considerando sua inocuidade, capacidade de adesão e agregação, e tolerância às condições do trato gastrointestinal;
- 2.2.3** Determinar os níveis de expressão relativa de genes de interesse, em condições que mimetizam o TGI humano, como exposição à pH ácido e presença de sais biliares.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Leite bubalino: características e contexto microbiológico

No Brasil, a produção de búfalos teve início na década de 1990, em pequenas e médias propriedades rurais, e desde então os produtos de origem bubalina vêm ganhando espaço no mercado e despertando o interesse de produtores, pesquisadores, nutricionistas, e da população em geral (Neto *et al.* 2005). Atualmente, o rebanho brasileiro é o maior do Ocidente, totalizando aproximadamente três milhões de animais, e estando principalmente localizado na região norte do país (ABCB, 2019).

Quando comparado a outros tipos de leite, como o de vaca, o leite bubalino é uma opção mais nutritiva, tendo elevado teor de vitaminas (A, D e B2), proteínas e minerais, bem como baixo índice de colesterol (Amaral *et al.* 2005; Andrade *et al.* 2011). Além disso, possui alto teor de lactose, sólidos totais e gordura (Andrade *et al.* 2009). As características físico-químicas do leite bubalino variam de acordo com a raça do animal, sua alimentação e com seu período de lactação (Teixeira *et al.* 2005). Em geral, o leite de búfala apresenta densidade de 1,025 a 1,047 g/mL, acidez de 14^o a 20^o D, elevado teor de proteínas, (principalmente caseína), sólidos totais de 15,64 a 17,95 %, e sais minerais de 0,79 a 0,83 % (principalmente cálcio). Tais características tornam o leite bubalino uma matéria-prima ideal para a produção de diversos derivados, como requeijão, ricota, queijo quark, queijo azul e *mozzarella*.

Além disso, a partir do leite é possível isolar microrganismos funcionais que podem ser empregados como culturas probióticas ou *starters*, capazes de acelerar o processo fermentativo, podendo ser utilizadas na produção de derivados, como manteiga, iogurte, queijo, doce de leite e bebidas lácteas (Capitani *et al.* 2014). Diversas pesquisas envolvendo a identificação e caracterização de novos microrganismos com potencial probiótico em amostras de leite vem sendo desenvolvidas (Liu *et al.* 2013; Guan *et al.* 2017; Pellegrino *et al.* 2019). Tais pesquisas têm como principal objeto de estudo o leite bovino, enquanto que estudos com leite bubalino ainda permanecem escassos. Portanto, investigar o leite de búfala por uma abordagem microbiológica é essencial para melhor entender o potencial de aplicação dos microrganismos presentes.

3.2 Microrganismos probióticos e seus benefícios

A Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) define probióticos como sendo os microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios para a saúde do hospedeiro (FAO, 2016). Tais benefícios vêm sendo cada vez mais estudados e estão relacionados principalmente à manutenção da microbiota intestinal.

BALs são fortemente estudadas como microrganismos com potencial probiótico, por demonstrarem tolerância às condições do TGI e por realizarem fermentação láctica, gerando ácido láctico como principal produto (Jeronymo-Ceneviva *et al.* 2014). Estas bactérias são classificadas como Gram-positivas e catalase negativas, tendo características morfológicas de cocos ou bacilos (Wood e Holzapfel 1995), e estando geralmente associadas a plantas, carnes, leite e seus derivados (Silva *et al.* 2015), e sendo também encontradas na microbiota natural de mamíferos (Heeney *et al.* 2016). Estas bactérias têm como pH ótimo de crescimento de 4,0 a 4,5 e são mesófilas ou termófilas, tendo temperatura ótima entre 30 a 42 °C, respectivamente (Sabo *et al.* 2014). BALs são frequentemente aplicadas na indústria de alimentos, uma vez que podem desempenhar propriedades tecnológicas, como cepas *starters* capazes de atuar na fermentação de alimentos e contribuir para as propriedades organolépticas dos produtos gerados, bem como funcionais, através de cepas probióticas (Madera *et al.* 2003). Alguns dos gêneros de BALs relevantes para tal fim são: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissela*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus* e *Bifidobacterium* (Klein *et al.* 1998).

Quanto aos benefícios que estes microrganismos podem trazer ao hospedeiro, já foi demonstrado que os probióticos podem atuar no sistema imunológico, reduzir os níveis de colesterol total e LDL, reduzir a pressão arterial, auxiliar na digestão de proteínas, aumentar a absorção de vitaminas e minerais, e apresentar atividade anticancerígena. Estas funções corroboram para a aplicação terapêutica destes microrganismos, como prevenção de diarreia, doenças urogenitais, osteoporose, alergias alimentares e doenças atópicas, bem como alívio de constipação e hipercolesterolemia, controle de doenças inflamatórias intestinais e proteção contra câncer de cólon e bexiga (Tripathi e Giri 2014). Estas funcionalidades fazem dos alimentos que contém probióticos alvos do interesse do público que busca uma vida mais saudável e melhor qualidade de vida, o que

estimula o investimento em pesquisa na área de microbiologia de alimentos.

3.3 Avaliação do potencial probiótico de um microrganismo

Atualmente, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) reconhece como bactérias probióticas as seguintes espécies: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus casei rhamnosus*, *Lactobacillus casei defensis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis* (incluindo a subespécie *Bifidobacterium lactis*), *Bifidobacterium longum* e *Enterococcus faecium*. Porém, com o crescente número de pesquisas nesta área, diversos estudos vêm sugerindo potencial probiótico de outras espécies bacterianas (Amara e Shibl, 2015), como: *Lactobacillus sporogenes*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus crispatus*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium thermophilus*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium lactis*, *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides*.

O potencial probiótico de um microrganismo pode ser avaliado através de ensaios, como a capacidade de sobrevivência ao TGI do hospedeiro – considerando tolerância ao suco gástrico e sais biliares –, e a capacidade de adesão à mucosa intestinal (Vijaya Kumar *et al.* 2015). Além disso, para que um novo isolado seja considerado probiótico no Brasil, a ANVISA determina que o microrganismo deva ser avaliado quanto a sua identidade, segurança e efeito benéfico, de acordo com a Resolução RDC Anvisa nº 241 do Ministério da Saúde (2018).

De acordo com esta resolução, a identificação correta do microrganismo candidato é essencial para a avaliação das suas propriedades, sendo necessário informar dados referentes à origem do isolado, bem como a identificação do mesmo por mais de uma abordagem, combinando métodos fenotípicos e genotípicos (FAO/WHO 2002). Para tanto, características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas devem ser consideradas, bem como se recomenda o sequenciamento 16S rDNA do isolado em análise (FAO/WHO 2006).

A segurança do microrganismo candidato deve ser comprovada por testes

in vitro e *in vivo*. Considerando os testes *in vitro*, as análises mínimas requeridas devem demonstrar que o isolado não possui genes específicos de resistência ou fatores de virulência, que possam causar danos ao hospedeiro. Além disso, é preciso avaliar o perfil de resistência a antimicrobianos de importância clínica e determinar se trata-se de resistência adquirida ou intrínseca. Tal informação é relevante, pois se presume que a resistência intrínseca apresenta potencial mínimo de disseminação horizontal, enquanto que genes localizados em elementos móveis são mais facilmente transferidos entre microrganismos (EFSA 2012). Para isso, recomenda-se determinar a Concentração Mínima Inibitória (CMI) para ampicilina, vancomicina, gentamicina, canamicina, estreptomicina, eritromicina, clindamicina, tetraciclina, cloranfenicol e, em casos específicos, tilosina, apramicina, ácido nalidíxico, sulfonamida e trimetoprim. Métodos qualitativos, como o método de disco difusão, geralmente não podem ser considerados no dossiê científico a ser apresentado para a ANVISA, porém pode ser usado para um *screening* inicial (EFSA 2012). O *European Food Safety Authority* (EFSA) sugere que seja requisito que microrganismos probióticos sejam suscetíveis a pelo menos dois antimicrobianos clinicamente relevantes, para que em caso de infecções haja tratamento eficaz. Por fim, os fatores de virulência que são investigados incluem presença de toxinas e enzimas hidrolíticas, como hemolisinas e gelatinases, que podem degradar sangue e mucosas, respectivamente, sendo, portanto deletérias para o hospedeiro.

3.4 Mecanismos envolvidos na tolerância ao TGI

Considerando o contexto do TGI humano, há diversos fatores que podem afetar a viabilidade do microrganismo no decorrer do trânsito, tais como: o ambiente extremamente ácido do suco gástrico devido à presença de ácido clorídrico, a competição por nutrientes com outros microrganismos, bem como o ambiente alcalino e a presença de sais biliares no suco intestinal. Mesmo organismos caracterizados como probióticos podem ter respostas diferentes quando expostos às condições adversas presentes no estômago, uma vez que a viabilidade celular depende do pH do meio, tempo de exposição a ele e também da capacidade de tolerância do microrganismo. Em seguida, no intestino, o maior obstáculo para a sobrevivência do microrganismo probiótico são os sais biliares, dependendo da concentração dos mesmos e do tempo de exposição a eles (Bezkorovainy 2001). Apesar disso, diversos estudos *in vivo* demonstraram que isolados probióticos

conseguem tolerar estas condições e passar pelo TGI, chegando ao cólon em quantidades suficientes para modificar seu microambiente (Pochart *et al.* 1992; Marteau *et al.* 1997).

A interação com as condições adversas do TGI exige que estes microrganismos, assim como qualquer outra bactéria em estresse, se adaptem para manter o funcionamento da fisiologia celular em condições de estresse e impedir que sejam degradadas (Gottesman 1984). Isso implica na indução da regulação gênica nestes microrganismos, gerando resposta em nível de expressão gênica. Ademais, no contexto do trânsito do TGI humano, é essencial que bactérias probióticas sejam capazes de modular seu perfil transcricional para que possam sobreviver e competir com os outros microrganismos da microbiota do hospedeiro, e conseqüentemente desempenhar suas funções benéficas. Alguns trabalhos já avaliaram a resposta de BALs frente a estresses, como estresse ácido (Broadbent *et al.* 2010, Wu *et al.* 2011) e estresse osmótico, causado pela exposição a sais biliares (Piuri *et al.* 2003; Piuri *et al.* 2005). Tais estudos focaram principalmente na avaliação do perfil de expressão de genes de interesse através de microarranjo e expressão de proteínas frente a estas condições, determinando, portanto, as vias metabólicas mais afetadas pela exposição às condições adversas do TGI. Estas vias estão principalmente relacionadas à proteção celular, modificação de membranas, tolerância à estresse e componentes centrais do metabolismo, tais como a síntese proteica (Papadimitriou *et al.* 2016).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização preliminar dos isolados de BALs de leite de búfala

Os 65 isolados de BALs analisados neste trabalho foram previamente coletados a partir de amostras de leite cru de búfala proveniente de tanques de refrigeração de dois laticínios localizados nos municípios de Glorinha e Cassino, Rio Grande do Sul, entre o período de 2007 e 2011. Após isolamento em meio de cultura Man Rogosa e Sharpe (MRS) (Man *et al.* 1960), os isolados foram conservados em MRS com glicerol 10 % a -20 °C, e reativados em caldo MRS através de incubação a 37 °C por até 48 h.

Após reativação, a caracterização preliminar dos isolados foi realizada através de coloração de Gram e atividade de catalase.

4.2 Identificação por MALDI-TOF/MS

Os 65 isolados foram identificados através da técnica de *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight Mass Spectroscopy* (MALDI-TOF/MS), como descrito na literatura (Bessède *et al.* 2011), utilizando o método de extração química, conforme o protocolo do fabricante. Os isolados foram cultivados em meio MRS a 37 °C por 24 h e aproximadamente 5-10 mg de material foram utilizados nesta análise. Este procedimento foi realizado no Instituto de Ciências Básicas da Saúde/UFRGS pelo equipamento MALDI Bioyper 4.0 *software* MBT OC.

Os critérios de identificação empregados se basearam na literatura atual (Bizzini *et al.* 2010; Neville *et al.* 2011). A identificação em nível de gênero foi considerada para valor de confiança $\geq 1,7$ e identificação em nível de espécie foi considerada para valor de confiança $\geq 2,0$.

4.3 Sequenciamento parcial do gene 16S rDNA e análise filogenética

As BALs selecionadas tiveram sua identificação confirmada através do sequenciamento parcial do gene 16S rDNA, através de sequenciamento automatizado de Sanger AB 3500 (Thermo Fisher Scientific), de acordo com o protocolo do fabricante. O DNA genômico dos isolados selecionados foi extraído pela metodologia de lise rápida alcalina após cultivo a 37 °C por 24 h, de acordo com metodologia de Depardieu *et al.* 2004. O DNA foi usado como molde em reações em cadeia da polimerase (PCR) empregando os oligonucleotídeos 27F e 530R já descritos na literatura (Lane 1991). As reações de PCR foram realizadas

utilizando 1 U Taq DNA polimerase Platinum™ (Thermo Fischer Scientific), 2 mM dNTP, 50 mM MgCl₂, tampão 10X e 10 pmol de cada oligonucleotídeo, totalizando 25 µL de reação. As condições das reações de PCR foram: desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento de oligonucleotídeos a 58 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 1 min, finalizando com uma extensão final a 72 °C por 10 min. Os fragmentos de DNA amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1 % e enviados para sequenciamento em empresa terceirizada. As sequências geradas foram analisadas pelo *software* MEGA-X e BLAST (NCBI), e então submetidas para o banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

Baseado nos alinhamentos das sequências parciais do gene 16S rDNA gerados pelo Clustal W, uma árvore filogenética foi construída pelo método de *Neighbor-joining* (Saitou e Nei 1987) com teste *bootstrap*, pelo *software* MEGA-X. Para isso, além das sequências das BALs analisadas neste trabalho, outras oito sequências foram utilizadas para a construção da árvore filogenética, sendo elas: quatro sequências de BALs isoladas do ambiente no Brasil – *Lactobacillus paracasei* SJRP141, *Leuconostoc mesenteroides* SJRP55 (Paula *et al.* 2015), *L. rhamnosus* FT218 e *Lactococcus lactis* FT609 (Tulini *et al.* 2016) –, e quatro sequências de BALs de referência – *Lactobacillus paracasei* ATCC 25302, *Lactobacillus rhamnosus* NBRC 34525, *Lactococcus lactis* NBRC 100933 e *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293.

4.4 Avaliação da inocuidade das BALs

4.4.1 Susceptibilidade a antimicrobianos

As BALs selecionadas foram analisadas quanto a sua susceptibilidade frente a antimicrobianos através do teste de disco difusão (Bauer *et al.* 1966). A cepa comercial *Lactobacillus rhamnosus* FAGRON™ também foi analisada, como referência para este teste. Dez antimicrobianos foram testados, sendo eles: clindamicina (30 µg), ceftriaxona (2 µg), cloranfenicol (30 µg), vancomicina (30 µg), tetraciclina (30 µg), ciprofloxacina (15 µg), gentamicina (10 µg), eritromicina (15 µg), ampicilina (10 µg) e penicilina G (10 µg).

Os isolados foram cultivados em ágar MRS a 37 °C por 24 h e então diluídos em salina 0,85 % NaCl até atingirem 0,5 na escala MacFarland. Em seguida, as suspensões bacterianas foram inoculadas na superfície de meio ágar Mueller Hinton

(MH) com o auxílio de suabes. Os discos de antibiótico foram então posicionados manualmente sobre a superfície do meio de cultivo, e incubados a 37 °C por 18 a 24 h, dependendo do antimicrobiano. Os resultados foram determinados com base no diâmetro dos halos de inibição formados após a incubação, sendo classificados como resistentes (R), parcialmente suscetíveis (PS) ou suscetíveis (S), ao antimicrobiano testado, de acordo com os parâmetros estabelecidos pelo *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (BrCast 2019).

4.4.2 Avaliação da atividade hemolítica

Para avaliar a atividade hemolítica das BALs selecionadas, os isolados foram inoculados em ágar *Columbia Blood Base* suplementado com 5 % de sangue de carneiro, e incubados a 37 °C por até 48 h. A atividade hemolítica foi determinada pela formação ou não de halos ao redor das colônias, indicando hemólise dos eritrócitos (Maragkoudakis *et al.* 2006). A cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi utilizada como controle positivo.

4.4.3 Avaliação da atividade de gelatinase

Para avaliar a atividade de gelatinase das BALs selecionadas, os isolados foram inoculados em picada em tubos contendo gelatina, e incubados a 37 °C por 24 h e então refrigerados a 4 °C por 20 min. A determinação da atividade de gelatinase foi realizada pela visualização de hidrólise ou não da gelatina após resfriamento. A presença de meio liquefeito indica a produção de gelatinase pelo isolado (Marra *et al.* 2007). A cepa *S. aureus* ATCC 25923 foi utilizada como controle positivo.

4.4.4 Presença de genes de virulência

As BALs selecionadas foram analisadas quanto a seu perfil de virulência, baseado na detecção de genes de fatores de virulência através de reações de PCR. A cepa comercial *L. rhamnosus* FAGRON™ também foi analisada neste ensaio. Os genes alvo desta análise foram: *ace* (adesão), *sprE* (serina protease), *cpd* (feromônio sexual), *cylA* (citolisina) *agg* e *asa1* (agregação). Tais alvos foram selecionados de acordo com a literatura, já tendo sido empregados em trabalho anterior para *Lactobacillus* spp. (Souza *et al.* 2018) (Tabela 1).

Tabela 1. Relação de oligonucleotídeos para análise do perfil de virulência das BALs selecionadas

Alvo	ID	Sequência (5'-3')	Tm (°C)	Fragmento (pb)	Referência
<i>ace</i>	ace_F	GAATTGAGCAAAAAGTTCAATCG	53	1008	Omar <i>et al.</i> 2003
	ace_R	GTCTGTCTTTTCACTTGTTTC			
<i>agg</i>	agg_F	AAGAAAAAGAAGTAGACCAAC	60	1553	Eaton e Gasson 2001
	agg_R	AAACGGCAAGACAAGTAAATA			
<i>asa1</i>	asa1_R	GCACGCTATTACGAACTATGA	52	375	Vankerckhoven <i>et al.</i> 2004
	asa1_R	TAAGAAAGAACATCACCACGA			
<i>cylA</i>	cylA_R	ACTCGGGGATTGATAGGC	53	688	Vankerckhoven <i>et al.</i> 2004
	cylA_R	GCTGCTAAAGCTGCGCTT			
<i>cpd</i>	cpd_R	TGGTGGGTTATTTTTCAATTC	53	782	Eaton eGasson 2001
	cpd_R	TACGGCTCTGGCTTACTA			
<i>sprE</i>	sprE_R	TTGAGCTCCGTTCTGCCGAAAAGTCATTC	56	591	Lopes <i>et al.</i> 2006
	sprE_R	TTGGTACCGATTGGGGAACCCAGATTGACC			

Temperatura de Melting (Tm) e pares de base (pb)

As reações de PCR foram realizadas utilizando 1 U Taq DNA polimerase Platinum™ (Thermo Fischer Scientific), 2 mM dNTP, 50 mM MgCl₂, tampão 10X e 10 pmol de cada oligonucleotídeo, totalizando 25 µL de reação. As condições das reações de PCR foram: desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento de nucleotídeos por 1 min (temperatura de acordo com a Tabela 1) e extensão a 72 °C por 1 min, finalizando com uma extensão final a 72 °C por 5 min. Os controles positivos para estas reações foram determinados previamente na padronização das reações, sendo: os isolados ambientais *E. faecalis* 1269 para *sprE*, *Enterococcus faecalis* C12 para *ace*, *Enterococcus faecalis* M2.15 para *agg*, e a cepa de referência *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 para *cpd*, *cylA*, e *asa1*. Os isolados ambientais utilizados como controle positivo foram cedidos por laboratório parceiro. Os fragmentos de DNA amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5 %.

4.5 Produção de exopolissacarídeos

Para avaliar a produção de exopolissacarídeos (EPS), os isolados selecionados foram cultivados em *Ruthenium Red Milk* (RRM) (Mora *et al.* 2002), a 37 °C por até 72 h. A coloração das colônias foi verificada em 24, 48 e 72 h. O corante vermelho de rutênio, presente no meio de cultivo, é capaz de corar de vermelho a parede celular bacteriana de colônias não-produtoras de EPS, enquanto que colônias produtoras mantêm uma coloração esbranquiçada (Stingle *et al.* 1996). A cepa comercial *L. rhamnosus* FAGRON™ foi usada como controle positivo.

4.6 Avaliação do potencial probiótico das BALs *in vitro*

4.6.1 Seleção das BALs de interesse

Considerando o desempenho das BALs nos testes de inocuidade empregados neste trabalho, bem como suas condições de crescimento (tempo de incubação e temperatura), duas BALs foram selecionadas para seguirem em análise para avaliação do seu potencial probiótico: *Lactobacillus rhamnosus* LB1.5 e *Lactobacillus paracasei* LB6.4. Além de inócuos, tais isolados demonstraram atingir $OD_{600} \geq 1.4$, equivalente a concentração 10^8 UFC/mL, em 18 h de incubação a 37 °C.

4.6.2 Avaliação da capacidade de adesão

Para avaliar a capacidade de adesão das duas BALs selecionadas e da cepa comercial *L. rhamnosus* FAGRON™, os isolados foram cultivados na presença de células Caco-2 (Todorov e Dicks 2008). Inicialmente, os isolados foram cultivados em caldo MRS a 37 °C por 24 h e centrifugados a 10.000 rpm por 10 min, para obtenção do precipitado de células. Foram realizadas duas lavagens com solução PBS 1X (pH 7,0), para retirar qualquer resíduo de meio de cultivo. Os isolados foram então ressuspensos em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), e inoculados na concentração de 10^8 UFC/mL em placas de 96 poços já contendo 2×10^5 de células Caco-2, previamente cultivadas DMEM. As placas com o co-cultivo foram então incubadas a 37 °C por 3 h. Após a incubação, foram realizadas novamente duas lavagens com solução PBS 1X (pH 7,0), para retirada das células bacterianas não aderidas às células Caco-2. Em seguida, foi adicionado 200 µL de TRITON X-100 0,5 % em cada poço, e incubado a temperatura ambiente por 10 min, para liberação das células bacterianas aderidas. Para avaliação da capacidade de adesão de cada isolado, foram retiradas alíquotas antes e após o período de incubação, para realização de contagem celular por diluição seriada e inoculação em meio *Plate Count Agar* (PCA). Este experimento foi realizado em duplicata biológica e triplicata técnica.

A partir destes dados se estimou a viabilidade celular das BALs pela diferença entre as contagens antes e após a incubação, e se estimou o número de células bacterianas por célula eucariótica através da razão entre as concentrações celulares, de acordo com a fórmula a seguir:

$$\text{Razão} = \left(\frac{\text{Concentração de células bacterianas}}{\text{Concentração de células Caco2}} \right)$$

Em seguida, o percentual de aderência foi calculado de acordo com a fórmula abaixo, onde R0 é a razão antes e Rt é a razão após o período de incubação:

$$\text{Adesão (\%)} = \left(\frac{R0}{Rt} \right) \times 100$$

4.6.3 Avaliação da capacidade de auto e coagregação

A capacidade de agregação das duas BALs selecionadas e da cepa comercial *L. rhamnosus* FAGRON™ foi analisada através da metodologia de Del Re *et al.* (2000) com modificações. Inicialmente, os isolados foram cultivados em caldo MRS a 37 °C por 24 h e centrifugados a 8.000 rpm por 15 min, para obtenção do precipitado de células. Foram realizadas duas lavagens com PBS 1X (pH 7,0), para retirar qualquer resíduo de meio de cultivo. Os precipitados foram então ressuspensos em um volume de PBS 1X (pH 7,0), homogeneizados em vórtex, e incubados a temperatura ambiente por 5 h.

Para avaliar a capacidade de autoagregação das BALs, os isolados foram analisados individualmente durante o período de incubação da suspensão celular. Foram retiradas alíquotas de 100 µL nos tempos: inicial (t₀), 1 h (t₁), 2 h (t₂), 3 h (t₃), 4 h (t₄) e 5 h (t₅). Cada alíquota foi transferida para um tubo contendo 3,9 mL de PBS 1X (pH 7.0), e analisada em espectrofotômetro Hitachi U-1100, para determinação da densidade óptica a 660 nm (OD₆₆₀).

A capacidade de autoagregação foi determinada pelo cálculo a seguir, onde At representa a absorbância em t₁, t₂, t₃, t₄ e t₅, e A0 representa o tempo inicial:

$$\text{Autoagregação (\%)} = 1 - \left(\frac{A0}{At} \right) \times 100$$

Para determinar a capacidade de coagregação das BALs de interesse, as suspensões bacterianas foram analisadas de forma associada, como mostrado na Tabela 2. Além das BALs de interesse e da cepa comercial, também foi analisada a capacidade de agregação destes isolados com cepas referência (*Escherichia coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 25923). Para isso, 2 mL de cada suspensão celular

foram associados em um tubo, totalizando 4 mL, homogêneos em vórtex, e incubados a 37 °C por 5 h. A densidade óptica dos isolados foi analisada em espectrofotômetro Hitachi U-1100 (OD₆₆₀), nos tempos inicial (t₀) e final (t₅).

Tabela 2. Combinações para análise de capacidade de coagregação entre as BALs e cepas de referência

	<i>L. rhamnosus</i> LB1.5	<i>L. paracasei</i> LB6.4	<i>L. rhamnosus</i> FAGRON™	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
<i>L. rhamnosus</i> LB1.5		X	X	X	X
<i>L. paracasei</i> LB6.4			X	X	X
<i>L. rhamnosus</i> FAGRON™				X	X

A capacidade de coagregação foi expressa pelo cálculo a seguir, onde Ax e Ay representam a média das absorbâncias dos microrganismos sozinhos em t=0, e Axy representa a absorbância do *pool* de microrganismos em t=5 (Zuo *et al.* 2019):

$$\text{Coagregação (\%)} = \left(\frac{(Ax + Ay) - 2(Axy)}{Ax + Ay} \right) \times 100$$

4.6.4 Tolerância ao trato gastrointestinal simulado

Para avaliar a tolerância das duas BALs selecionadas às condições do TGI, a viabilidade dos isolados foi determinada através de contagem celular por microdiluição em três condições: antes da exposição ao TGI, após exposição ao suco gástrico simulado (SGS) e após exposição ao suco intestinal simulado (SIS) (Iraporda *et al.* 2019). A cepa comercial *L. rhamnosus* FAGRON™ também foi analisada, bem como duas cepas de referência, *Listeria monocytogenes* ATCC 7566 e *E. coli* ATCC 10536, foram usadas como controle.

Os isolados foram cultivados em caldo MRS a 37 °C por 24 h e uma alíquota de 100 µL foi separada para contagem celular antes da exposição à simulação do TGI. Os cultivos foram centrifugados a 7.000 g por 10 min para obtenção do precipitado de células, e foram realizadas duas lavagens com PBS 1X (pH 7,0) para retirada de qualquer resíduo do meio de cultura. Para avaliar a tolerância dos isolados às condições do estômago, foi preparada a solução SGS (125 mM NaCl, 7 mM KCl, 45 mM NaHCO₃, pH 2,0, suplementado com 3 g/L de pepsina), com a qual os precipitados foram ressuspensos. Os cultivos em SGS foram então incubados a

37 °C por 90 min, mimetizando as condições do TGI humano. Após, uma alíquota de 100 µL foi separada para contagem celular após exposição à simulação do estômago. Em seguida, os isolados foram centrifugados a 7.000 g por 10 min para obtenção do precipitado de células, e novamente foram realizadas duas lavagens com PBS 1X (pH 7,0) para retirada de qualquer resíduo de SGS. Para avaliar a tolerância às condições do intestino humano, foi preparada a solução SIS (22 mM NaCl, 3.2 mM KCl, 7.6 mM NaHCO₃, pH 8,0, suplementado com 0,1 % pancreatina e 0,15 % sais biliares), com a qual os precipitados foram ressuspensos. Os cultivos em SIS foram incubados a 37 °C por 150 min, mimetizando as condições do TGI humano. Por fim, uma alíquota de 100 µL foi separada para contagem celular após exposição à simulação do estômago. Este experimento foi realizado em triplicata.

4.7 Análise da expressão relativa de genes alvo frente às condições do TGI

4.7.1 Seleção de genes alvo e desenho de oligonucleotídeos

Com base na literatura, foram selecionados como alvos genes envolvidos em rotas importantes para as BALs sobreviverem às condições do TGI humano, tais como capacidade de adesão e agregação, tolerância a pH ácido, tolerância a sais biliares, resposta a estresse e reparo de DNA (Kapse *et al.* 2019; Souza *et al.* 2019; Fortina *et al.* 2008; Zhao *et al.* 2019). As sequências dos genes alvos de cepas de referência de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 e *Lactobacillus paracasei* ATCC 334 foram alinhadas através do *software* MEGA-X, usando ClustalW. Os oligonucleotídeos foram desenhados manualmente com base nas regiões de similaridade dos alinhamentos através do *software* Geneious Prime R9, e a qualidade dos mesmos foi analisada através dos *softwares* Primer BLAST e Oligo Analyzer (IDT), para confirmar sua especificidade, bem como temperatura de anelamento (T_m) e possibilidade de formação de dímeros e *hairpins*. Os oligonucleotídeos projetados estão relacionados na Tabela 3.

Tabela 3. Relação de oligonucleotídeos empregados na reação de RT-qPCR

Alvo	Função	ID	Sequência (5'-3')	Tm (°C)	Fragmento (pb)
<i>pyrG*</i>	Síntese nucleica	pyrG_F	TTCCGAACCAACATCACG	59	159
		pyrG_R	CCCCACATCACCAACAT		
<i>tuf</i>	Síntese proteica	tuf_F	AGTTCTACTTCCACACCAC	60	170
		tuf_R	GGCACCAACAGTACGGC		
<i>argH</i>	Tolerância a pH ácido	argH_F	ACGCATGACTTCAGCAAT	59	146
		argH_R	TCGCTTAATGGCATTTCCT		
<i>fbp</i>	Adesão/agregação	fbp_F	TGATGGGTCCGGCACAG	60	146
		fbp_R	TTTATCTTGCTTAGGCGG		
<i>atpD</i>	Tolerância a pH ácido	atpD_F	GTAGCCTTCCCAATCAATG	60	178
		atpD_R	CAGTATCTTCAACCGCCAT		
<i>usp</i>	Estresse geral	usp_F	AAAGTCAGTTTCAGTATTGAGTA	59	161
		usp_R	GCGTTTCGGGTGACATATTC		
<i>gapdh</i>	Glicólise	gapdh_F	TGACATCCAGTTGTTGC	61	163
		gapdh_R	TTGCGGTTCTGCGTAGAC		
<i>recF</i>	Reparo de DNA	recF_F	GTCAATGATAAGGATGTTGC	57	171
		recF_R	TAAATGGGTCTGGCGA		

Temperatura de Melting (Tm) e pares de base (pb).
O gene normalizador utilizado está indicado por (*).

4.7.2 Extração de RNA e síntese de cDNA

As duas BALs selecionadas e a cepa comercial *L. rhamnosus* FAGRON™ foram cultivadas a 37 °C por 24h e a simulação do TGI foi realizada, como descrito previamente no item 4.6.4. A cada etapa da simulação, uma alíquota de 1 mL de cultivo/suspensão bacteriana foi coletada e utilizada para a extração do RNA bacteriano total, com o emprego de Trizol™ (Invitrogen), totalizando três extrações por isolado: antes da simulação, após SGS e após SIS. A qualidade do RNA extraído foi determinada por eletroforese em gel de agarose 1 %. O material foi quantificado e a razão A_{260}/A_{280} determinada por Nanodrop. As extrações de RNA foram realizadas em duplicatas biológicas.

Posteriormente, 2 µg de cada RNA foi tratado com 70 U de DNaseI (Thermo Fischer Scientific). A reação foi incubada a 37 °C por 30 min, e em seguida 2 µL de EDTA foi adicionado e incubado a 65 °C por 10 min, para inativação da enzima. Para confirmar o tratamento e consequente ausência de DNA nas amostras, foram realizadas reações de PCR empregando os oligonucleotídeos 27F (Lane 1991) e 1492R (Turner 1999). As reações de PCR foram realizadas utilizando 1 U DNA polimerase GoTaq™ (Thermo Fischer Scientific), 2 mM dNTP, 50 mM MgCl₂, tampão 10X e 10 pmol de cada oligonucleotídeo, totalizando 25 µL de reação. As

condições das reações de PCR foram: desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento de oligonucleotídeos a 52 °C por 45 s, e extensão a 72 °C por 80 s, finalizando com uma extensão final a 72 °C por 10 min. O DNA da cepa comercial *L. rhamnosus* FAGRON™ foi utilizado como controle positivo desta reação. Os resultados foram verificados em géis de agarose 1 %. A qualidade do RNA tratado foi aferida novamente através de Nanodrop, pela razão A_{260}/A_{280} .

A síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada através de reações de transcrição reversa (RT) para cada RNA extraído. Para cada reação, com volume final de 20 µL, foi utilizada 500 ng de RNA total, 150 ng de *primer* randômico e 10 mM de dNTPs, incubados a 65 °C por 5 min e imediatamente incubado no gelo, para evitar a formação de estruturas secundárias no RNA. Posteriormente, foi adicionado 5 X Tampão *First Strand*, e 0,1 M de DTT. Foi adicionado 200 U da enzima MMLV-RT (*Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*) (Invitrogen), e incubadas a 25 °C por 10 min, 37 °C por 50 min e 70 °C por 15 min. Os controles negativos das reações de síntese foram realizados em paralelo, porém sem a adição de MMLV-RT. Os cDNAs foram diluídos 1:5 com água DEPC, totalizando 100 µL, e armazenados a -20°C. Para confirmar a síntese de fita dupla foi realizada uma reação de PCR, utilizando como molde cada cDNA sintetizado. Para estas reações foram empregados os oligonucleotídeos do gene *gapdH* (Tabela 3). As reações de PCR foram realizadas utilizando 1 U Taq DNA polimerase GoTaq™ (Thermo Fischer Scientific), 2 mM dNTP, tampão 5 X e 10 pmol de cada oligonucleotídeo, totalizando 25 µL de reação. As condições das reações de PCR foram: desnaturação inicial a 95 °C por 2 min, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 1 min, anelamento de nucleotídeos a 60 °C por 45 s e extensão a 72 °C por 45 s, finalizando com uma extensão final a 72 °C por 5 min. O DNA da cepa comercial *L. rhamnosus* FAGRON™ foi utilizado como controle positivo da reação. Os resultados foram verificados em géis de agarose 1 %.

4.7.3 PCR quantitativo

Os níveis de expressão dos genes alvo foram determinados através de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR), utilizando o equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) e o sistema Platinum™ SYBR™ Green qPCR Super Mix-UDG (Invitrogen). Cada reação foi composta de 1 µL de cDNA

diluído, 10 pmol de cada oligonucleotídeo, 7,5 µL de Platinum™ SYBR™, e 1 µL do reagente ROX (0,1 X), totalizando um volume final de 15 µL. As condições utilizadas para amplificação foram: uma etapa de desnaturação a 90 °C por 2 min, seguida de 10 min a 95 °C e 40 ciclos de 95 °C por 15 s, e 60 °C por 1 min. As reações foram realizadas juntamente com os seguintes controles do método: reações sem cDNA (NTC), como controle da placa, e reações com os cDNAs negativos de cada extração (NRTC), como controle da RT realizada previamente. A análise foi realizada em triplicatas técnicas.

O valor de corte (*threshold*) foi determinado manualmente para cada alvo, e o cálculo de expressão relativa dos mRNAs foi realizado através do método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK *et al.* 2001). Os valores de expressão dos genes alvo foram normalizados em relação ao valor de expressão do gene *pyrG*, que apresentou nível de expressão constante nas condições analisadas, e já havia sido empregado como normalizador em trabalho anterior (Landete *et al.* 2010). As análises estatísticas da expressão relativa dos genes alvo foram realizadas através do *software* GraphPad Prism 6, utilizando o teste *Student t* pareado ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização e identificação dos isolados por MALDI-TOF/MS

Todos os 65 isolados de BALs reativados foram classificados como Gram positivos pela metodologia de coloração de Gram e apresentaram morfologias de cocos (Figura 1A) ou bacilos (Figura 1B), quando observados em microscópio. Quanto à atividade de catalase, 63 isolados (96,9%) apresentaram o resultado negativo para a prova de catalase (Tabela 4).

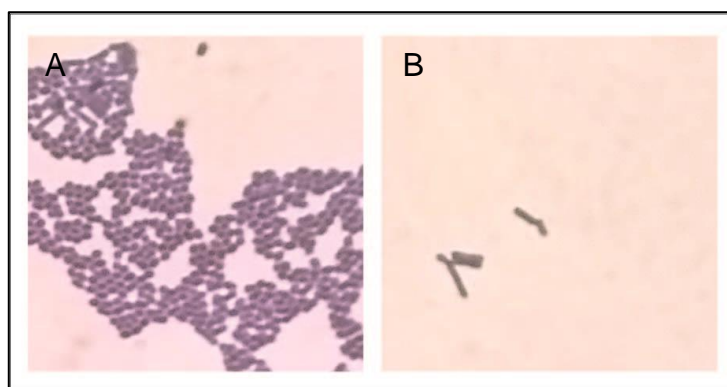


Figura 1. Microscopia ótica de BALs após coloração de Gram, ilustrando as morfologias mais encontradas nos isolados analisados. A) Morfologia de cocos encontrada no isolado *Lactococcus lactis* L4A8, e B) Morfologia de bacilos encontrada no isolado *Lactobacillus paracasei* LB6.4.

Todos isolados foram identificados através de MALDI-TOF/MS, o que permitiu a determinação de cinco gêneros, com valor de confiança $\geq 1,7$: *Enterococcus* sp., *Lactobacillus* sp., *Lactococcus* sp., *Leuconostoc* sp. e *Staphylococcus* sp. Além disso, para identificação em nível de espécie foi considerado um *cut-off* de valor de confiança $\geq 2,0$ baseado em estudos anteriores de identificação de cultivos puros (Bizzini *et al.* 2010; Neville *et al.* 2011), o que permitiu a identificação de 52 isolados em nove espécies: *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Staphylococcus capitis* (Tabela 4).

Tabela 4. Caracterização preliminar e identificação por MALDI-TOF/MS dos isolados de leite de búfala

Isolado	Morfologia	Catalase	MALDI-TOF/MS	Valor de confiança	16S rDNA	Acesso NCBI *	Laticínio
L1A7	cocos	-	<i>Enterococcus faecium</i>	2.135	ND		1
L1A8	cocos	-	<i>Enterococcus</i> sp.	1.882	ND		1
L1A14	cocos	-	<i>Enterococcus faecium</i>	2.051	ND		1
L1A18	cocos	-	<i>Enterococcus</i> sp.	1.941	ND		1
L3A7	bacilos	-	<i>Lactobacillus paracasei</i>	2.383	<i>Lactobacillus</i> sp.	MK452224	1
L3A14	cocos	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.359	ND		1
L3A15	cocos	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.445	ND		1
L3A16	cocos	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.463	ND		1
L4A5	cocos	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.386	ND		1
L4A8	cocos	-	<i>Lactococcus lactis</i>	2.298	<i>Lactococcus lactis</i>	MK452222	1
L5A1	cocos	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.500	ND		1
L6A5	cocos	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.343	ND		1
L6A11	cocos	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.378	ND		1
L1AN18	cocos	-	<i>Enterococcus</i> sp.	1.941	ND		1
L2AN17	bacilos	-	<i>Lactobacillus paracasei</i>	2.269	ND		1
L2AN23	cocos	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.245	ND		1
L3AN11	cocos	-	<i>Enterococcus faecium</i>	2.122	ND		1
L4AN1	cocos	-	<i>Lactococcus lactis</i>	2.342	<i>Lactococcus lactis</i>	MK452225	1
L4AN4	cocos	-	<i>Lactococcus lactis</i>	2.025	ND		1
L4AN9	cocos	-	<i>Lactococcus lactis</i>	2.193	ND		1
L4AN17	cocos	-	<i>Lactococcus lactis</i>	2.351	<i>Lactococcus lactis</i>	MK452221	1
L5AN2	cocos	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.408	ND		1
L5AN3	cocos	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.414	ND		1
L5AN11	cocos	-	<i>Enterococcus faecium</i>	2.102	ND		1
L5AN13	cocos	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.328	ND		1
L5AN14	cocos	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.464	ND		1
L6AN4	cocos	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.363	ND		1
L6AN7	cocos	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.370	ND		1
L6AN10	cocos	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.189	ND		1
M1A1	cocos	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.203	ND		1
M1A3	bacilos	-	<i>Lactobacillus</i> sp.	1.952	<i>Lactobacillus paracasei</i>	MK527228	1
M1A2	cocos	-	<i>Enterococcus</i> sp.	1.977	ND		1
M1A2a	cocos	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.029	ND		1
M1A7	cocos	-	<i>Enterococcus faecium</i>	2.272	ND		1
M2A3	cocos	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.405	ND		1
M2A4	cocos	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.407	ND		1
M5A5	cocos	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.160	ND		1
M5A6	cocos	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.317	ND		1
M6A10	cocos	-	<i>Enterococcus faecium</i>	2.206	ND		1
M1AN6	cocos	-	<i>Enterococcus faecium</i>	2.060	ND		1
M1AN9	cocos	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.334	ND		1
M1AN117	cocos	-	<i>Enterococcus faecium</i>	2.249	ND		1

Tabela 4 (continuação). Caracterização preliminar e identificação por MALDI-TOF/MS dos isolados de leite de búfala.

Isolado	Morfologia	Catalase	MALDI-TOF/MS	Valor de confiança	16S rDNA	Acesso NCBI *	Laticínio
M2AN5	cocos	-	<i>Enterococcus faecium</i>	2.277	ND		1
M2AN7	cocos	-	<i>Enterococcus faecium</i>	2.264	ND		1
M2AN7A	cocos	-	<i>Enterococcus faecium</i>	2.283	ND		1
M2AN10	cocos	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.404	ND		1
M2AN13	cocos	-	<i>Enterococcus faecium</i>	2.277	ND		1
M6AN16	cocos	-	<i>Enterococcus faecium</i>	2.223	ND		1
M7AN7	cocos	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.213	ND		1
M7AN7-1	cocos	-	<i>Enterococcus faecium</i>	2.240	ND		1
M7AN10	cocos	-	<i>Enterococcus faecium</i>	2.182	ND		1
LB1.4	bacilos	-	<i>Lactobacillus</i> sp.	1.975	<i>Lactobacillus paracasei</i>	MK452217	2
LB1.5	bacilos	-	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	2.255	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	MK452223	2
LB3.2	cocos	-	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	2.140	ND		2
LB3.3	cocos	-	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	2.198	ND		2
LB4.1	cocos	-	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	2.155	ND		2
LB5.5	cocos	-	<i>Leuconostoc</i> sp.	1.851	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	MK452216	2
LB6.4	bacilos	-	<i>Lactobacillus paracasei</i>	2.292	<i>Lactobacillus paracasei</i>	MK452219	2
LB6.8	cocos	-	<i>Enterococcus durans</i>	2.327	ND		2
LB8.5	cocos	+	<i>Staphylococcus capitis</i>	2.217	ND		2
LB9.1	bacilos	-	ND	-	ND		2
LB9.10	cocos	-	ND	-	ND		2
LB10.1	cocos	+	ND	-	ND		2
LB10.3	cocos	-	<i>Lactococcus</i> sp.	1.750	<i>Lactococcus lactis</i>	MK452218	2
LB10.4	cocos	-	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	2.221	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	MK452220	2

A presença de atividade de catalase foi demonstrada por (+), enquanto ausência por (-). Alguns isolados não foram analisados em alguma das metodologias, sendo indicados por ND (não determinado). Isolados do laticínio de Glorinha – RS estão indicados por 1, e os do laticínio de Cassino – RS por 2.

* Número de acesso da sequência parcial do gene 16S depositada no banco de dados NCBI.

A diversidade de BALs identificadas, em nível de espécie pela metodologia de MALDI-TOF/MS está demonstrada graficamente na Figura 2, onde pode-se observar que *E. faecalis* e *E. faecium* foram as espécies encontradas majoritariamente, tendo 24 (36,9 %) e 15 (23,1 %) isolados identificados, respectivamente. Em seguida, cinco isolados foram identificados como *L. lactis* (7,7 %), três como *L. paracasei* (4,6 %), três como *E. casseliflavus* (4,6 %), e um isolado como *E. durans* (1,5 %), *L. mesenteroides* (1,5 %), *L. rhamnosus* (1,5 %) e *S. capitis* (1,5 %). Para um total de 8 isolados (12,3 %), não foi possível determinar a espécie a que pertenciam, sendo, portanto identificados apenas em nível de gênero.

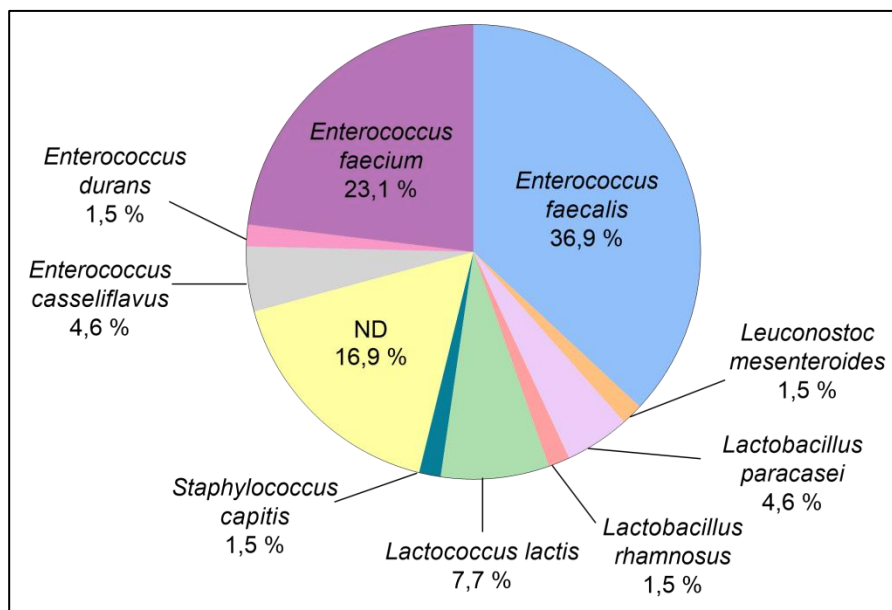


Figura 2. BALs identificadas por MALDI-TOF/MS nas amostras de leite de búfala analisadas. Os isolados que não foram identificados em nível de espécie por esta técnica estão indicados por não determinado (ND).

Baseado na caracterização preliminar dos isolados e na identificação por MALDI-TOF/MS, foram selecionados 11 isolados cuja espécie consta na lista da ANVISA como potenciais probióticos, foram eles: *Leuconostoc* sp. LB5.5, *Leuconostoc mesenteroides* LB10.4, *Lactobacillus* sp. LB1.4, *Lactobacillus* sp. M1A3, *Lactobacillus paracasei* LB6.4, *Lactobacillus rhamnosus* LB1.5, *Lactobacillus paracasei* L3A7, *Lactococcus lactis* LB10.3, *Lactococcus lactis* L4A8, *Lactococcus lactis* L4AN17 e *Lactococcus lactis* L4AN1. Estes 11 isolados foram considerados potenciais candidatos a probióticos e seguiram para as próximas análises.

5.2 Sequenciamento 16S rDNA e análise filogenética

O sequenciamento parcial do gene 16S rDNA permitiu a confirmação da identificação de 10 das 11 BALs selecionadas (Tabela 4). Apenas o isolado *Lactobacillus* sp. L3A7 não foi identificado em nível de espécie, tendo apresentado similaridade tanto com isolados de *L. paracasei* e *L. casei*, de acordo com o BLASTn. De modo geral, não houve discrepâncias entre os resultados gerados pelo MALDI-TOF/MS e pelo sequenciamento.

Em seguida, os dados do sequenciamento foram utilizados para construir uma árvore filogenética baseada na sequência de um fragmento de 508 nucleotídeos gerado pela análise parcial do gene 16S rDNA. As sequências das 11 BALs selecionadas foram comparadas com sequências de 8 BALs previamente

depositadas no NCBI, sendo elas quatro isolados ambientais e quatro cepas de referência. Tal análise permitiu analisar a distância evolutiva entre os isolados analisados, demonstrando que os mesmos podem ser divididos em três *clusters*: *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* sp. e *Leuconostoc* sp. (Figura 3).

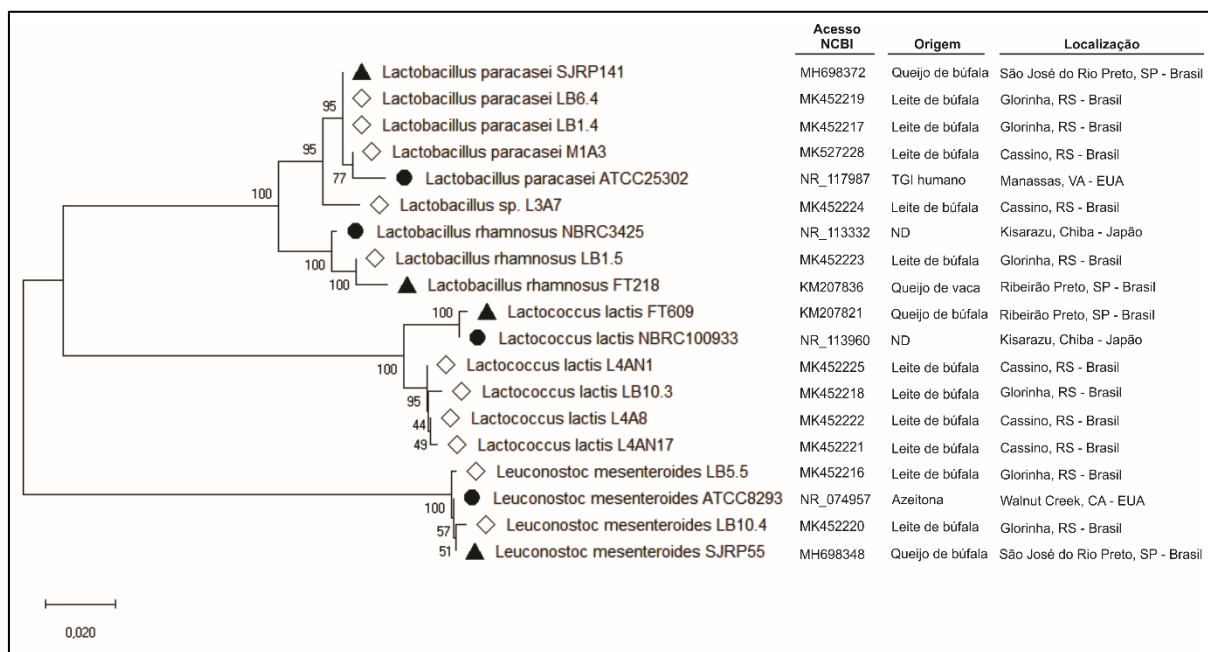


Figure 3. Análise filogenética dos isolados de BAL provenientes de leite de búfala, através de árvore *neighbor-joining* (*bootstrap*=500) com os 11 isolados do presente estudo (◇), quatro isolados ambientais (▲), e quatro isolados de referência (●). ND indica origem não determinada pelo autor.

Analisando o *cluster* dos *Lactobacillus* spp. é possível observar a formação de dois *subclusters*, separando *L. paracasei* de *L. rhamnosus*. Em detalhe, foi demonstrado que os dois isolados *L. paracasei* LB6.4 e LB1.4, de amostras do laticínio de Glorinha, têm maior similaridade entre si, sendo também próximos evolutivamente do isolado ambiental *L. paracasei* SJRP141, proveniente de amostra de queijo de búfala de São Paulo, Brasil. O isolado *L. paracasei* M1A3 do laticínio de Cassino é o mais próximo evolutivamente da cepa de referência; enquanto que o outro isolado de Cassino, (*Lactobacillus* sp. L3A7) encontra-se em ramo separado entre os *subclusters*, podendo indicar se tratar de outra espécie, visto que os resultados do sequenciamento não identificaram este isolado em nível de espécie. O isolado *L. rhamnosus* LB1.5 ficou em um *subcluster* separado.

No *cluster* *Lactococcus* sp. é possível observar que os isolados de Glorinha e Cassino (L4AN1, L4A8, L4AN17 e LB10.3) ficaram em um mesmo ramo, sendo mais próximos evolutivamente entre si, do que com o isolado ambiental e a cepa de

referência. No *cluster Leuconostoc* sp., os isolados *L. mesenteroides* LB5.5 e LB10.4 estão evolutivamente próximo entre si e também do isolado ambiental e da cepa de referência.

5.3 Avaliação da inocuidade das BALs

5.3.1 Susceptibilidade a antimicrobianos

Através da metodologia de disco difusão, foi possível determinar o perfil de susceptibilidade dos isolados testados frente aos 10 antimicrobianos analisados, através da medição do diâmetro dos halos de inibição formados e com base nos dados do BrCAST (2019), como ilustrado na Figura 4.

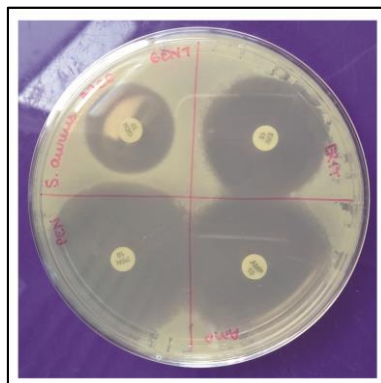


Figura 4. Teste de disco difusão para determinação do perfil de susceptibilidade das BALs analisadas. A imagem ilustra os halos de inibição do crescimento de *S. aureus* ATCC 25923 por quatro dos antimicrobianos testados.

Determinou-se que todos os 11 isolados testados foram resistentes ou parcialmente resistentes a pelo menos um dos antibióticos testados neste trabalho (Tabela 5). Entretanto, todas as 11 BALs analisadas foram suscetíveis a quatro dos antimicrobianos testados: cloranfenicol, eritromicina, ampicilina e penicilina G.

Os quatro isolados de *L. lactis* foram suscetíveis a vancomicina, porém demonstraram resistência a ciprofloxacina. Além disso, o isolado *L. lactis* L4AN1 também foi resistente à clindamicina e ceftriaxona, demonstrando multirresistência. O isolado *L. lactis* L4AN17 também foi resistente à tetraciclina, enquanto o isolado *L. lactis* LB10.3 foi resistente a gentamicina.

Quando aos dois isolados de *L. mesenteroides*, ambos foram resistentes apenas contra vancomicina e ceftriaxona, de modo semelhante aos isolados de *Lactobacillus*. Todos estes isolados, à exceção de *L. paracasei* LB1.4, foram suscetíveis aos demais antimicrobianos testados. O isolado *L. paracasei* LB1.4 demonstrou ser parcialmente suscetível à ciprofloxacina. A cepa comercial também

foi avaliada como referência, e teve perfil de susceptibilidade compatível com os demais isolados de *Lactobacillus* spp. analisados, sendo suscetível a todos os antibióticos testados, exceto à ceftriaxona e vancomicina.

Tabela 5. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das BALs por teste de disco difusão

Isolado	Cli [30]	Cef [2]	Clo [30]	Van [30]	Tet [30]	Cip [5]	Gen [10]	Eri [15]	Amp [10]	Pen [10]
<i>Lactococcus lactis</i> L4AN1	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S
<i>Lactococcus lactis</i> L4A8	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
<i>Lactococcus lactis</i> L4AN17	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S
<i>Lactococcus lactis</i> LB10.3	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> LB10.4	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> LB5.5	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LB1.5	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S
<i>Lactobacillus paracasei</i> LB6.4	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S
<i>Lactobacillus paracasei</i> LB1.4	S	R	S	R	S	PS	S	S	S	S
<i>Lactobacillus paracasei</i> M1A3	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S
<i>Lactobacillus</i> sp. L3A7	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> FAGRON™	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S

Os resultados estão representados por suscetível (S), parcialmente suscetível (PS) ou resistente (R). Os antibióticos estão listados de acordo com a sua abreviação comercial e sua concentração é representada entre colchetes em µg.

5.3.2 Atividade hidrolítica

Os 11 isolados selecionados foram analisados quanto à atividade hidrolítica, considerando hidrólise de sangue e gelatina. Tais características são indesejáveis para microrganismos que pretendem ser aplicados na indústria de alimentos, uma vez que não se mostram seguros para o consumo. De acordo com os resultados obtidos, nenhuma das BALs analisadas apresentou atividade de hemólise ou gelatinase. O mesmo resultado foi observado na análise a cepa comercial *L. rhamnosus* FAGRON™. Todas as análises foram feitas juntamente com *S. aureus* ATCC 25923, como controle positivo (Figura 5).

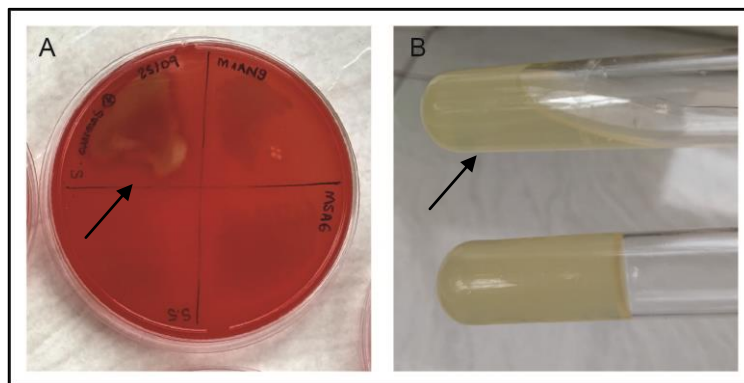


Figura 5. Testes fenotípicos para presença de atividade hidrolítica. A) Teste de atividade hemolítica em ágar *Columbia Blood Base*, e B) teste de atividade de gelatinase em gelatina. As flechas indicam o controle positivo dos testes, com *S. aureus* ATCC 25923.

5.3.3 Perfil de virulência

Para análise da presença de genes de virulência, foram realizadas reações de PCR para seis alvos. Os genes *ace*, *agg*, *asa1*, *cpd*, *cylA* e *sprE* não foram detectados em nenhum dos 11 isolados analisados. O mesmo resultado foi observado na análise da cepa comercial *L. rhamnosus* FAGRON™. Na Figura 6 é possível visualizar o resultado de uma das reações de PCR realizadas, empregando os oligonucleotídeos para o gene *sprE*.

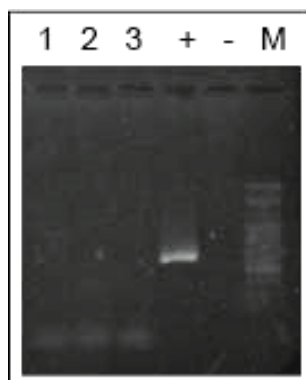


Figura 6. Reação de PCR para análise do perfil de virulência do gene *sprE*. As canaletas 1, 2 e 3 trazem os *amplicons* das BALs *L. rhamnosus* LB1.5, *L. paracasei* LB 6.4 e da cepa comercial *L. rhamnosus* FAGRON™, respectivamente. O controle positivo está indicado por (+), sendo o *amplicon* do isolado ambiental *E. faecalis* 1269. (-) representa o controle negativo da reação. (M) representa o marcador de peso molecular Ladder 100 pb (Ludwig).

5.4 Produção de exopolissacarídeo

Para a avaliação da produção de EPS pelas BALs selecionadas, foi realizado o cultivo em meio RRM, onde foi possível observar que *L. mesenteroides* LB10.4 e três isolados de *L. lactis* (LB10.3, L4A8 e L4AN1) apresentaram colônias brancas após 24 h de cultivo, sugerindo a produção de EPS de acordo com a

literatura (Mora *et al.* 2002). Entretanto, após 48 h de incubação, as colônias destes isolados tornaram-se rosadas, indicando instabilidade quanto à produção de EPS. Os outros sete isolados analisados foram considerados não-produtores, uma vez que as colônias apresentaram coloração vermelha em 24 h e 48 h. A cepa comercial *L. rhamnosus* FAGRON™ apresentou colônias brancas em todos os tempos analisados, sugerindo ser uma cepa estável quanto à produção de EPS (Figura 7).

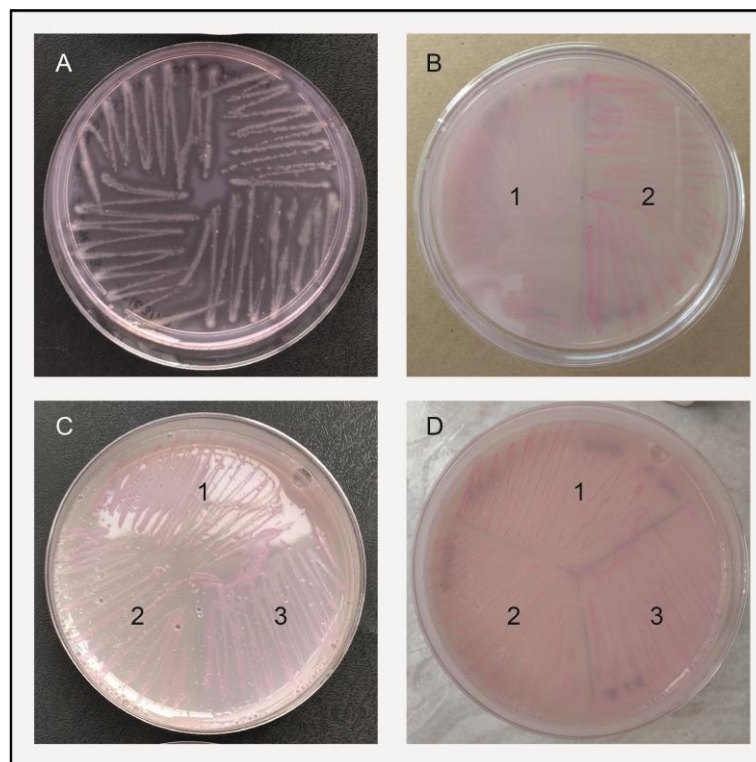


Figura 7. Avaliação da produção de EPS por cultivo em meio RRM. A) *L. rhamnosus* FAGRON™ após 72 h de cultivo. B) *L. mesenteroides* LB10.4 (1) e LB5.5 (2) após 24 h de cultivo. C) *L. lactis* L4AN1 (1), L4A8 (2) e LB10.3 (3) em 24 h e D) *L. lactis* L4AN1 (1), L4A8 (2) e LB10.3 (3) em 24 h em 72 h.

5.5 Avaliação do potencial probiótico das BALs *in vitro*

5.5.1 Capacidade de adesão

As duas BALs selecionadas foram avaliadas quanto a sua capacidade de adesão a células Caco-2, com o intuito de avaliar seu potencial de se aderir ao tecido do TGI, facilitando assim a colonização. Tal avaliação foi feita através da diferença entre as contagens celulares, antes e após a incubação dos isolados com as células Caco-2.

Como está demonstrada na Tabela 6, a viabilidade celular dos isolados analisados foi semelhante entre si, sendo que *L. rhamnosus* LB1.5 manteve 84,8 %

das células viáveis após a incubação com células Caco-2, e *L. paracasei* LB6.4 apresentou 85,9 % de viabilidade. Ambas BALs apresentaram maior viabilidade do que a cepa comercial *L. rhamnosus* FAGRON™, cuja viabilidade foi de 82,8 %. A estimativa de células bacterianas por célula eucariótica também foi determinada, demonstrando que *L. rhamnosus* LB1.5 e *L. paracasei* LB6.4 apresentaram 111,7 e 243,3 células aderidas por células Caco-2, respectivamente. Ambas BALs apresentaram maior quantidade de células aderidas por célula eucariótica do que a cepa comercial *L. rhamnosus* FAGRON™, que apresentou 89,0 células por célula Caco-2. Por fim, o cálculo da aderência demonstrou que, em *L. rhamnosus* LB1.5 e *L. paracasei* LB6.4, houve 5,1 e 6,4 % de taxa de aderência. Novamente, tais valores são superiores ao observados na cepa comercial *L. rhamnosus* FAGRON™, que demonstrou 3,2 % de aderência.

Tabela 6. Percentual de aderência das BALs a células Caco-2

Isolado	Viabilidade celular (%)	Célula bacteriana/Caco-2	Aderência (%)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LB1.5	84,8 ± 1,9	111,7 ± 18,9	5,1 ± 2,0
<i>Lactobacillus paracasei</i> LB 6.4	85,9 ± 2,6	243,3 ± 48,3	6,4 ± 4,2
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> FAGRON™	82,8 ± 1,0	89,0 ± 9,5	3,2 ± 0,7

Valores referentes à média das replicatas e seus respectivos desvios padrão.

5.5.2 Capacidade de agregação

Os isolados *L. rhamnosus* LB1.5 e *L. paracasei* LB6.4 tiveram seu potencial de auto e coagregação analisados, bem como a cepa comercial *L. rhamnosus* FAGRON™. Avaliar tais características é importante, pois indicam a capacidade dos isolados de se aderirem ao tecido do TGI, bem como indicam sua capacidade de impedir a aderência de bactérias patogênicas ao organismo hospedeiro.

A avaliação do potencial de autoagregação se deu por determinação das absorbâncias da suspensão bacteriana a cada hora de incubação. Porém, tal comportamento também pode ser visualizado pela sedimentação da suspensão bacteriana durante o período de análise (Del Re *et al.* 2000) como indicado na Figura 8.

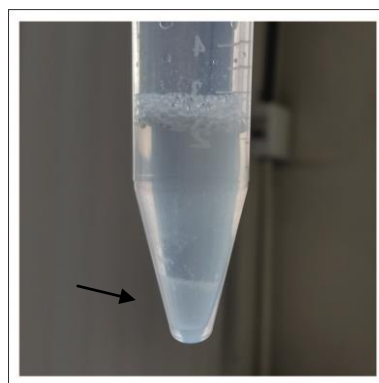


Figura 8. Autoagregação do isolado *L. rhamnosus* LB1.5 após 5 h de incubação a temperatura ambiente. A seta indica a sedimentação do cultivo após o período de incubação.

Na Tabela 7 é possível observar em detalhe as taxas de autoagregação de cada isolado no decorrer das 5 h de incubação. O isolado *L. rhamnosus* LB1.5 variou de 17,4 % \pm 5,3 após 1 h a 35,1 % \pm 1,4 após 5 h, e o isolado *L. paracasei* LB6.4 variou de 7,0 % \pm 2,4 após 1 h a 22,5 % \pm 3,5 após 5 h. Enquanto que a cepa comercial *L. rhamnosus* FAGRON™ variou de 13,3 % \pm 6,4 em 1h a 34,2 % \pm 9,0 em 5 h.

Tabela 7. Percentual de autoagregação das BALs após 5 h de incubação

Isolado	Auto-agregação (%)				
	t=1	t=2	t=3	t=4	t=5
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LB1.5	17,4 \pm 5,3	20,0 \pm 7,0	23,2 \pm 6,7	33,2 \pm 3,6	35,1 \pm 1,4
<i>Lactobacillus paracasei</i> LB 6.4	7,0 \pm 2,4	11,4 \pm 7,8	17,8 \pm 6,3	19,4 \pm 6,6	22,5 \pm 3,5
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> FAGRON™	13,3 \pm 6,4	24,4 \pm 12,8	29,3 \pm 9,6	29,3 \pm 5,3	34,2 \pm 9,0

Valor de aderência referente à média das replicatas e seus respectivos desvios padrão.

A comparação entre o comportamento dos cultivos ao longo das 5 h de incubação pode ser visualizada na Figura 9. Todos os isolados demonstraram aumentar sua autoagregação ao decorrer do período de incubação, sendo 5 h o tempo de maior autoagregação, como mostrado na Figura 9. De maneira geral, foi possível observar que o isolado *L. rhamnosus* LB1.5 teve um comportamento muito similar à cepa comercial *L. rhamnosus* FAGRON™ durante todos os tempos analisados, mas principalmente ao final das 5 h de incubação. Já o isolado *L. paracasei* LB6.4 teve uma taxa de autoagregação ligeiramente inferior durante todos os tempos analisados.

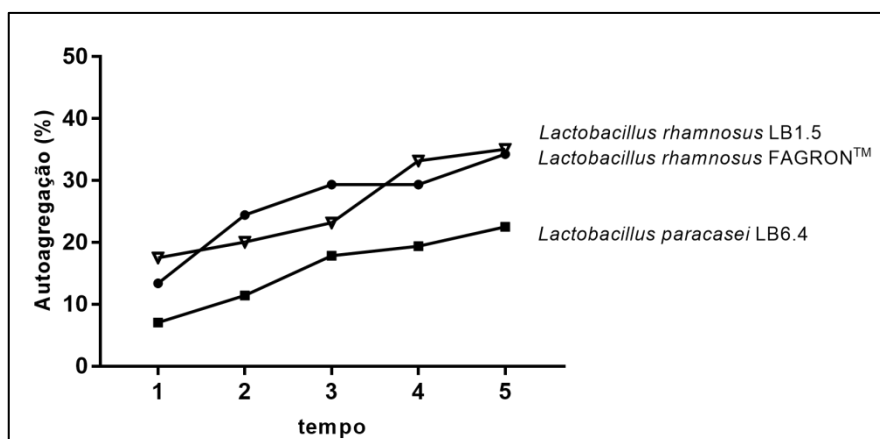


Figura 9. Comparação entre a taxa de autoagregação dos cultivos *L. rhamnosus* LB1.5 (▼), *L. paracasei* LB6.4 (■) e *L. rhamnosus* FAGRON™ (●) ao longo de 5 h. O percentual de autoagregação foi determinado a cada 1 h de incubação.

Considerando a coagregação das BALs, após incubação por 5h a temperatura ambiente, foi possível observar que *L. rhamnosus* LB1.5 e *L. paracasei* LB6.4 demonstraram taxa de $67,3 \pm 7,9$ % a $56,3 \pm 9,8$ % com *E. coli* ATCC 25922, respectivamente. Na presença de *S. aureus* ATCC 25923, *L. rhamnosus* LB1.5 e *L. paracasei* LB6.4 demonstraram taxa de $39,3 \pm 13,7$ % a $65,5 \pm 13,1$ %, respectivamente. Resultados semelhantes foram observados na cepa comercial *L. rhamnosus* FAGRON™, sendo que esta apresentou $67,0 \pm 2,0$ % de agregação com *E. coli* ATCC 25922, e $64,4 \pm 6,9$ % com *S. aureus* ATCC 25923 (Tabela 8).

Além disso, também foi realizada a análise da coagregação entre as BALs como um *pool*, uma vez que a indústria de alimentos geralmente emprega mais de um isolado bacteriano em um produto. O *pool* de *L. rhamnosus* LB1.5 e *L. paracasei* LB6.4 apresentou $73,1 \pm 9,8$ % de coagregação, enquanto que, com a cepa comercial *L. rhamnosus* FAGRON™, *L. rhamnosus* LB1.5 e *L. paracasei* LB6.4 demonstraram $84,1 \pm 6,8$ % e $67,2 \pm 9,1$ % de coagregação, respectivamente (Tabela 8).

Tabela 8. Percentual de coagregação das BALs entre si e com cepas de referência *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 25923

	<i>L. rhamnosus</i> LB1.5	<i>L. paracasei</i> LB6.4	<i>L. rhamnosus</i> FAGRON™	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
<i>L. rhamnosus</i> LB1.5		$73,1 \pm 9,8$	$84,1 \pm 6,8$	$67,3 \pm 7,9$	$39,3 \pm 13,7$
<i>L. paracasei</i> LB6.4			$67,2 \pm 9,1$	$56,3 \pm 9,8$	$65,5 \pm 13,1$
<i>L. rhamnosus</i> FAGRON™				$67,0 \pm 2,0$	$64,4 \pm 6,9$

Dados em porcentagem (%), com desvio padrão indicado.

5.5.3 Tolerância ao trato gastrointestinal simulado

A tolerância das BALs selecionadas frente às condições do TGI foi analisada através de simulação *in vitro*, com o objetivo de determinar a viabilidade celular dos isolados após a exposição às condições adversas encontradas no trânsito do TGI, sendo elas: pH ácido e presença de sais biliares. A cepa comercial *L. rhamnosus* FAGRON™ também foi analisada, bem como duas cepas de referência *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *E. coli* ATCC 10536.

Todos os isolados iniciaram a simulação com aproximadamente 10^8 UFC/mL. Tanto *L. rhamnosus* LB1.5 e *L. paracasei* LB6.4 se mantiveram estáveis, mantendo a concentração inicial, mesmo após exposição ao SGS e ao SIS, sugerindo tolerância às mesmas (Figura 10A e 10B). A cepa comercial *L. rhamnosus* FAGRON™ também demonstrou estabilidade (Figura 10C).

Quanto às cepas de referência, tanto *L. monocytogenes* ATCC 7644 quanto *E. coli* ATCC 10536 demonstraram diminuir sua viabilidade celular após a exposição ao SGS e ao SIS, sugerindo que as condições analisadas foram danosas a estas bactérias. Em detalhe, *L. monocytogenes* ATCC 7644 foi afetada drasticamente pela exposição ao pH ácido do SGS, atingindo 10^5 UFC/mL nesta condição; concentração esta que se manteve após exposição aos sais biliares do SIS (Figura 10D). Já *E. coli* ATCC 10536 demonstrou uma queda gradativa na viabilidade celular, atingindo 10^7 UFC/mL após exposição ao SGS, e 10^6 UFC/mL após exposição ao SIS (Figura 10E).

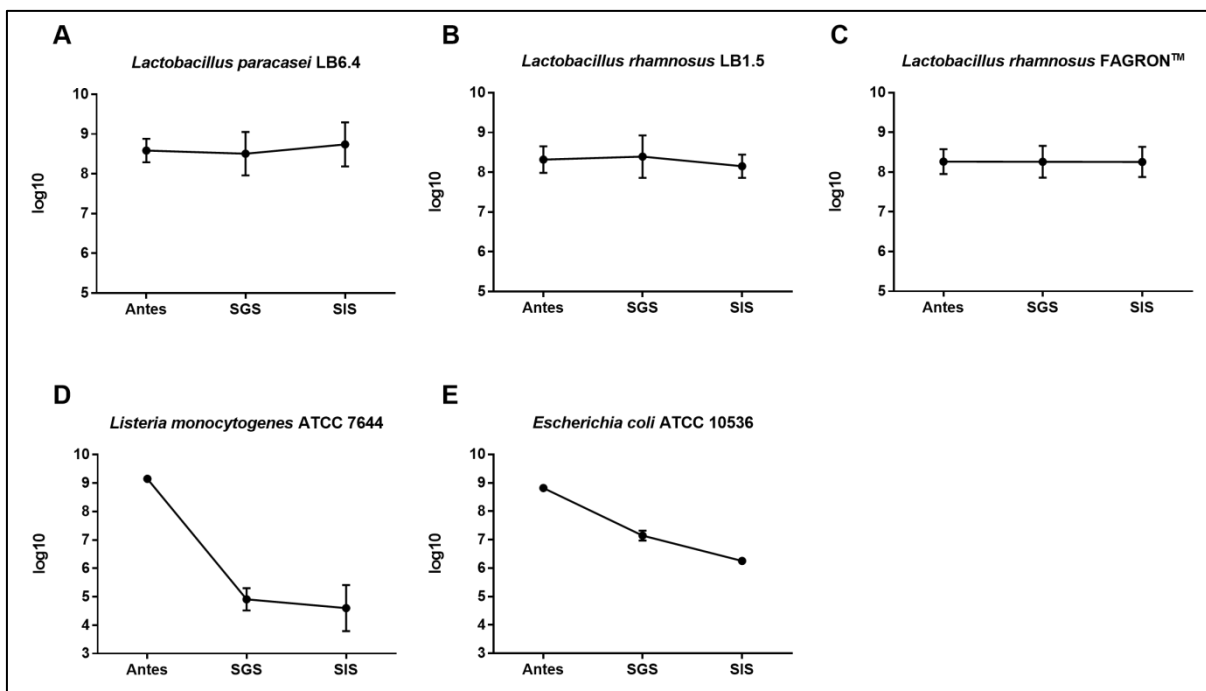


Figura 10. Concentração celular dos isolados após exposição às condições do trato gastrointestinal, sendo elas: antes da exposição, após suco gástrico simulado (SGS) e após suco intestinal simulado (SIS). Comportamento das BALs: A) *L. paracasei* LB6.4, B) *L. rhamnosus* LB1.5, e C) *L. rhamnosus* FAGRON™; e das cepas de referência: D) *L. monocytogenes* ATCC 7644, e E) *E. coli* ATCC 10536.

5.6 Análise da expressão relativa de genes envolvidos no TGI

5.6.1 Extração de RNA e síntese de cDNA

A extração de RNA foi realizada pelo método de extração orgânica empregando o reagente TRIZOL™ (Invitrogen), nas três condições a serem analisadas: antes (condição 1), após exposição ao SGS (condição 2) e após exposição ao SIS (condição 3). Os RNAs isolados podem ser vistos na Figura 11A. Infelizmente, mesmo após numerosas tentativas, não foi possível extrair RNA bacteriano na condição 3. Para esta condição, também foi testada extração empregando kit comercial, porém tal metodologia também não foi capaz de extrair RNA bacteriano de qualidade para ser empregado nas análises subsequentes, sugerindo que algum componente do SIS, como sais biliares (Urdaneta e Casadésus 2017), possa ter interferência com as metodologias empregadas. A qualidade e quantidade de RNA extraído foram aferidas por Nanodrop, onde a razão A_{260}/A_{280} variou de 1,79 a 3,36 e a concentração de 173,6 a 1.238,0 ng/μl. Os RNAs foram então tratados com DNase I, para retirada de DNAs contaminantes, sendo confirmado o tratamento através de reações de PCR (Figura 11B). A qualidade do RNA tratado foi aferida por Nanodrop, onde a razão A_{260}/A_{280} variou de 1,77 a 2,15.

Em seguida, foi realizada a síntese de cDNA a partir de 500 ng de cada RNA tratado através de reações de transcrição reversa (RT). A síntese foi confirmada através de reações de PCR usando os cDNA sintetizados como molde (Figura 11C).

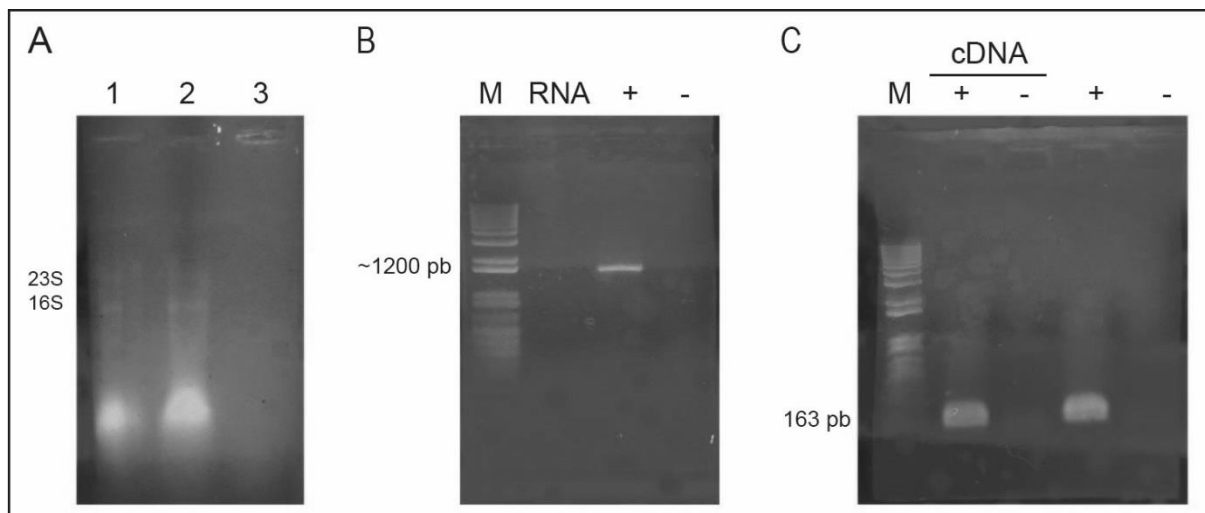


Figura 11. A) Extrações de RNA da cepa comercial *L. rhamnosus* FAGRON™ nas condições: antes da simulação (1), após exposição à SGS por 90 min a 37 °C (2) e após exposição à SIS por 150 min a 37 °C. B) reação de PCR para confirmação do tratamento com DNase I. As canaletas representam: marcador de peso molecular Ladder 100 pb (Ludwig) (M), RNA tratado com DNase (RNA), DNA *L. rhamnosus* FAGRON™ (+) e controle negativo da reação (-). C) PCR para confirmação da síntese de cDNA. As canaletas representam: marcador de peso molecular Ladder 100 pb (Ludwig) (M), cDNA positivo (+) e negativo da reação de RT (-), DNA *L. rhamnosus* FAGRON™ (+) e controle negativo da reação de PCR (-).

5.6.2 PCR quantitativo

Para compreender melhor a resposta transcricional das BALs selecionadas frente às condições do TGI a que foram expostas *in vitro*, foi realizada a análise da expressão relativa de genes envolvidos nos mecanismos de tolerância ao TGI, de acordo com a literatura. Tais genes estão associados à tolerância a pH ácido (*atpD* e *argH*), adesão e agregação (*fpb*), estresse geral (*usp*), reparo de DNA (*recF*), e vias centrais do metabolismo de bactérias (*gapdH* e *tuf*). A expressão destes alvos foi então analisada nas condições: 1) antes da exposição ao TGI (controle) e 2) após a exposição ao suco gástrico simulado (SGS).

Os níveis de expressão dos genes *atpD* e *argH*, relacionados à tolerância a pH ácido, não apresentaram diferença significativa entre a condição controle e após exposição ao SGS (Figura 12).

No caso de *atpD*, foi possível observar uma tendência de queda na expressão relativa do gene na condição SGS, em *L. rhamnosus* LB1.5 (Figura 12A). Já para o gene *argH*, foi possível observar uma tendência de aumento da expressão

na condição SGS, em *L. rhamnosus* LB1.5 e *L. paracasei* LB6.4 (Figura 12B). Porém, em ambos os casos, há grande variação entre as replicatas técnicas nesta condição, impedindo a inferência de regulação nestes casos.

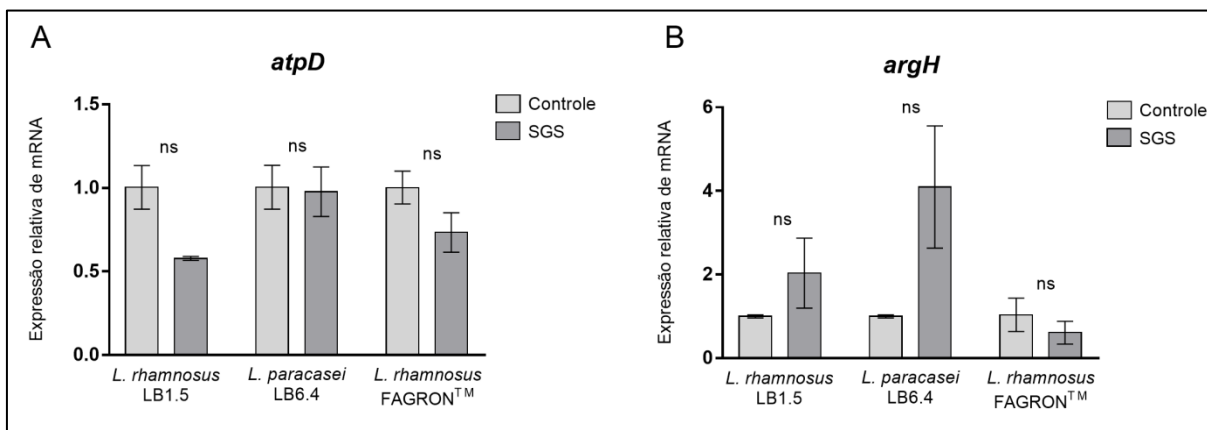


Figura 12. Expressão relativa dos genes A) *atpD*, e B) *argH*, associados à tolerância a pH ácido nas cepas *L. rhamnosus* LB1.5, *L. paracasei* LB6.4 e *L. rhamnosus* FAGRON™. Genes analisados nas condições controle e após exposição ao SGS. O grau de significância da expressão relativa do gene na condição SGS em relação à condição controle é de 95 % (*) ou não significativo (ns).

Quanto ao nível de expressão do gene *fbp*, cuja função está relacionada a adesão e agregação bacteriana, houve um comportamento divergente entre as cepas analisadas. *L. rhamnosus* LB1.5 apresentou diminuição significativa da expressão deste gene em SGS quando comparado ao controle ($p < 0,05$), enquanto que *L. rhamnosus* FAGRON™ apresentou aumento significativo da mesma após exposição ao SGS ($p < 0,05$) (Figura 13). Não houve mudança significativa na expressão deste gene nas condições analisadas em *L. paracasei* LB6.4.

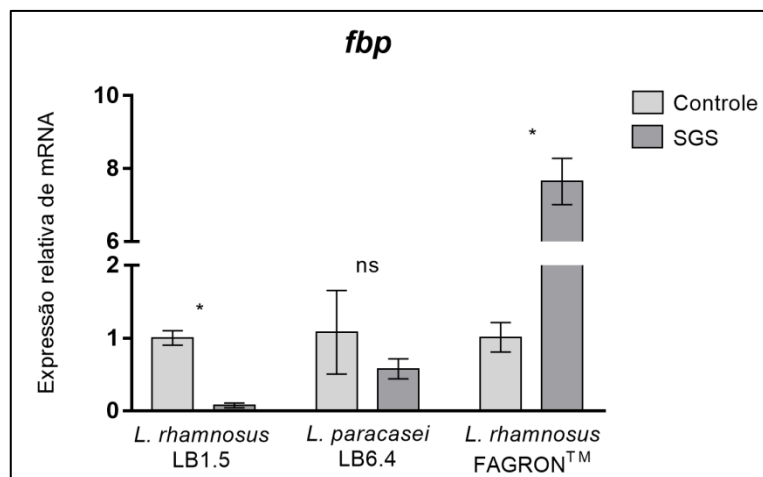


Figura 13. Expressão relativa do gene *fbp*, relacionado à adesão e agregação celular, nas cepas *L. rhamnosus* LB1.5, *L. paracasei* LB6.4 e *L. rhamnosus* FAGRON™. Genes analisados nas condições controle e após exposição ao SGS. O grau de significância da expressão relativa do gene na condição SGS em relação à condição controle é de 95 % (*) ou não significativo (ns).

O nível de expressão do gene *usp*, cujo produto foi descrito como envolvido na resposta a estresses em geral, não apresentou mudanças significativas nos níveis de expressão nas condições analisadas (Figura 14).

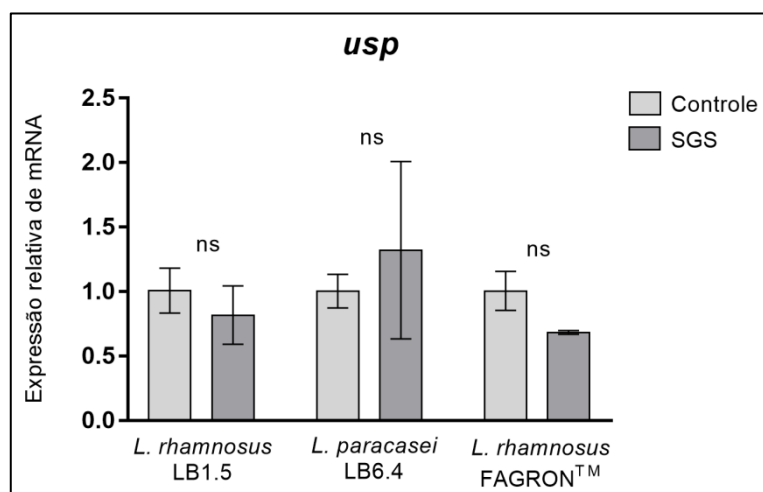


Figura 14. Expressão relativa do gene de estresse geral *usp* nas cepas *L. rhamnosus* LB1.5, *L. paracasei* LB6.4 e *L. rhamnosus* FAGRON™. Genes analisados nas condições controle e após exposição ao SGS. O grau de significância da expressão relativa do gene na condição SGS em relação à condição controle é de 95 % (*) ou não significativo (ns).

A expressão relativa do gene de reparo de DNA *recF* diminuiu significativamente após exposição ao SGS quando comparado ao controle, em *L. paracasei* LB6.4 ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre as condições analisadas nas cepas *L. rhamnosus* LB1.5 e FAGRON™, entretanto foi possível observar que ambas também tenderam a diminuir sua expressão em SGS, em comparação com o controle (Figura 15).

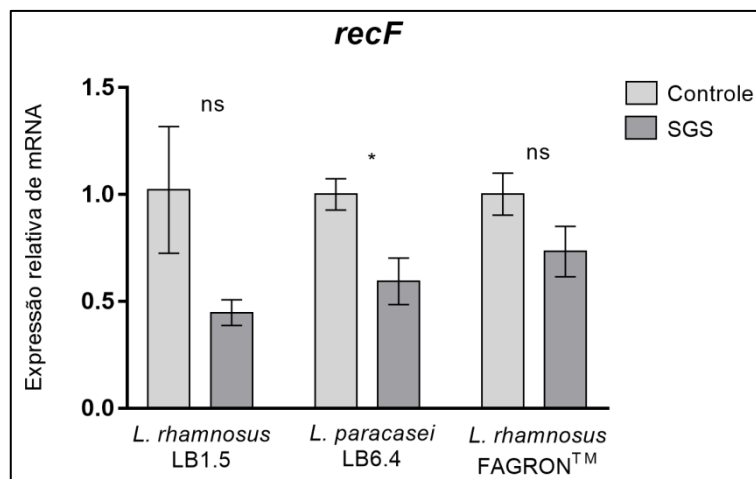


Figura 15. Expressão relativa do gene *recF*, envolvido no reparo de DNA, nas cepas *L. rhamnosus* LB1.5, *L. paracasei* LB6.4 e *L. rhamnosus* FAGRON™. Genes analisados nas condições controle e após exposição ao SGS. O grau de significância da expressão relativa do gene na condição SGS em relação à condição controle é de 95 % (*) ou não significativo (ns).

O nível de expressão do gene *gapdH*, relacionado ao ciclo da glicólise, não apresentou mudanças significativas nas condições analisadas (Figura 16). Entretanto, foi possível observar uma tendência de aumento de sua expressão após exposição ao SGS, nas cepas *L. rhamnosus* LB1.5 e *L. paracasei* LB6.4.

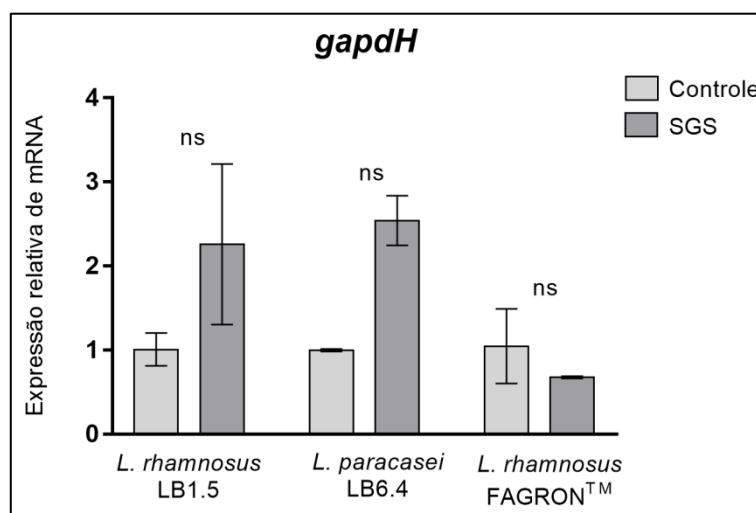


Figura 16. Expressão relativa do gene *gapdH*, envolvido na glicólise celular, nas cepas *L. rhamnosus* LB1.5, *L. paracasei* LB6.4 e *L. rhamnosus* FAGRON™. Genes analisados nas condições controle e após exposição ao SGS. O grau de significância da expressão relativa do gene na condição SGS em relação à condição controle é de 95 % (*) ou não significativo (ns).

Por fim, o nível de expressão de *tuf*, envolvido na síntese proteica, aumentou significativamente após exposição ao SGS quando comparada à condição controle, em *L. rhamnosus* LB1.5 ($p < 0,05$) (Figura 17). Não houve diferença significativa entre os níveis de expressão deste gene nas condições analisadas em *L. paracasei* LB6.4

e *L. rhamnosus* FAGRON™, porém foi possível observar uma tendência de aumento da expressão de *tuf* após exposição ao SGS na cepa *L. paracasei* LB6.4.

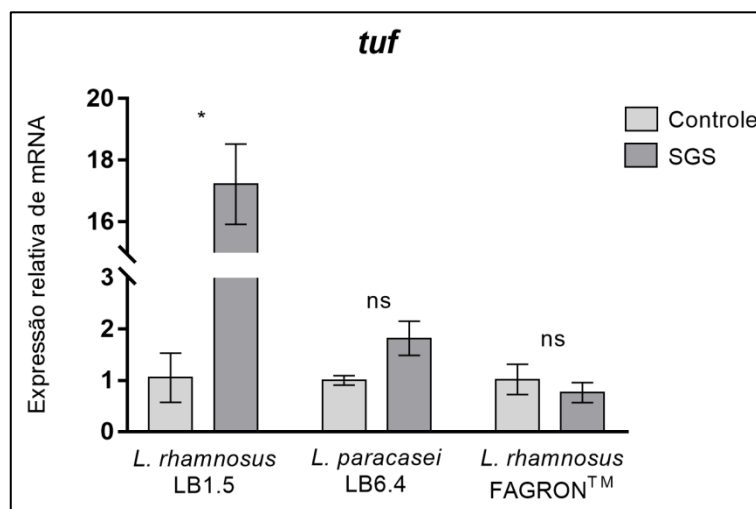


Figura 17. Expressão relativa do gene *tuf*, envolvido na síntese proteica, nas cepas *L. rhamnosus* LB1.5, *L. paracasei* LB6.4 e *L. rhamnosus* FAGRON™. Genes analisados nas condições controle e após exposição ao SGS. O grau de significância da expressão relativa do gene na condição SGS em relação à condição controle é de 95 % (*) ou não significativo (ns).

6. DISCUSSÃO

O leite bubalino tem sido cada vez mais explorado para a produção de derivados no Brasil, devido ao crescente aumento do consumo e interesse dos consumidores, principalmente pela *mozzarella* de búfala. Apesar disso, pouco se sabe sobre o potencial probiótico do leite bubalino cru. Portanto, este trabalho visou ampliar os conhecimentos nesta área, buscando novos isolados de BALs que demonstrem funcionalidade e possam ser aplicados na indústria de alimentos no futuro. Para tanto, se realizou uma caracterização preliminar através de coloração de Gram e teste de catalase. Os resultados obtidos através destas metodologias estão em congruência com a literatura, que define que BALs são Gram positivas com morfologias de cocos ou bacilos, e sem atividade de catalase (Axelsson 2004).

Concomitantemente, realizou-se a identificação dos isolados pela técnica de MALDI-TOF/MS, onde se determinou a presença de cinco gêneros nas amostras de leite analisadas (valor de confiança $\geq 1,7$) e nove espécies (valor de confiança $\geq 2,0$). O parâmetro utilizado para identificação em nível de espécie se baseou em artigos similares que fizeram a identificação de culturas puras, sem outros microrganismos contaminantes, como os citados a seguir. Bizzini *et al.* (2010) identificaram com acurácia 93,2 % dos 1.371 isolados clínicos analisados que foram previamente identificados por testes fenotípicos, através de MALDI-TOF/MS usando *score* $\geq 2,0$ para nível de espécie. Neville *et al.* (2011) também compararam a identificação de bactérias por metodologias convencionais com os resultados obtidos por MALDI Biotyper, usando *score* $\geq 1,7$ e $\geq 2,0$ para nível de espécie, sugerindo que para bactérias de cultivo simples, as recomendações do fabricante são muito restritivas, e indicando que *scores* entre 1,7 e 1,9 já permitem uma identificação confiável em nível de espécie, principalmente se acompanhado de análise da morfologia colonial.

A combinação de métodos fenotípicos e genotípicos é considerada essencial para uma identificação precisa de um isolado (Fontana *et al.* 2013), portanto os dados da caracterização preliminar dos isolados e os resultados obtidos através de MALDI-TOF/MS, permitiram uma boa caracterização da diversidade de BALs nas amostras de leite bubalino analisadas. Estes resultados serviram como base para a seleção dos isolados de interesse para prospecção de potencial probiótico.

A ANVISA mantém uma lista das espécies bacterianas que podem ser

aplicadas como probióticos na indústria de alimentos brasileira. Esta lista inclui as seguintes espécies: *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei* Shirota, *L. rhamnosus*, *L. defensis*, *L. paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. animalis*, *B. lactis* e *Enterococcus faecium*. Tais bactérias foram testadas quanto a sua genotoxicidade, mutagenicidade e toxicidade, sendo consideradas seguras para o consumo humano (ANVISA 2017). Além disso, a literatura atual vem estudando outras espécies de BALs que demonstram potencial probiótico, como *Leuconostoc mesenteroides* (Amara e Shibl 2015; Souza *et al.* 2019), por exemplo. Tendo em vista tais informações, este trabalho selecionou 11 BALs isoladas de leite cru de búfala, como sendo potenciais candidatos a probióticos, sendo elas: *L. mesenteroides* LB5.5, *L. mesenteroides* LB10.4, *L. paracasei* LB1.4, *L. paracasei* M1A3, *L. paracasei* LB6.4, *L. rhamnosus* LB1.5, *L. paracasei* L3A7, *L. lactis* LB10.3, *L. lactis* L4A8, *L. lactis* L4AN17, e *L. lactis* L4AN1.

Apesar de *E. faecium* estar listado na ANVISA como sendo probiótico e ter sido uma das espécies mais encontradas nos isolados analisados, os 15 isolados desta espécie foram desconsiderados para análises futuras, uma vez que *Enterococcus* spp. são considerados microrganismos ubíquos que podem facilmente transferir informação genética para outras bactérias. Além disso, alguns isolados podem ser virulentos e apresentar multirresistência a antimicrobianos, muitas vezes estando associados a infecções humanas (Wang *et al.* 2019).

Os 11 isolados selecionados tiveram sua identificação confirmada através do sequenciamento parcial do gene 16S rDNA, sendo esta uma das metodologias de identificação genotípica recomendadas pela ANVISA (2019) e pela FAO/WHO (2006). Tal análise pode confirmar a identidade, em nível de espécie, de 10 dos 11 isolados previamente identificados por MALDI-TOF/MS e testes fenotípicos. Apenas o sequenciamento do isolado *Lactobacillus* sp. L3A7 permitiu somente a identificação em nível de gênero, tendo apresentado similaridade com as espécies *L. paracasei* e *L. casei*, na análise por BLASTn. Isso vai de encontro com o fato de que, em alguns casos a identificação através do sequenciamento 16S rDNA tem uma resolução limitada, não sendo capaz de discriminar espécies estreitamente relacionadas, tais como espécies pertencentes ao grupo *Lactobacillus delbrueckii*, *L. plantarum* e *L. casei* (ANVISA 2019). Nestes casos, outras técnicas moleculares são indicadas, como *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP), *Repetitive DNA Element-PCR* (rep-PCR), bem como avaliação de outras sequências de genes

ribossomais (23S rDNA e *Internal Transcribed Spacers Elements* - ITS) ou de genes de cópia única (*pheS*, *atpA*, *rpoA*) (Vankerckhoven *et al.* 2008). A técnica de MALDI-TOF/MS também é uma alternativa nestes casos, tendo sido amplamente utilizada como método de identificação rápida para isolados de *Lactobacillus* provenientes de alimentos (Angelakis *et al.* 2011; Doan *et al.* 2012; Dušková *et al.* 2012; Nacef *et al.* 2017). Entretanto, neste trabalho, tal metodologia também não foi capaz de discriminar a espécie do isolado L3A7.

Os dados gerados pelo sequenciamento foram utilizados para a construção de uma árvore filogenética, usando o método de *neighbor-joining*, para determinação da distância evolutiva entre os isolados analisados neste trabalho, bem como sua relação com quatro sequências de isolados de referência e quatro sequências de isolados ambientais provenientes de amostras de leite ou queijo no Brasil (Paula *et al.* 2015; Tulini *et al.* 2016). Desta forma, foi possível determinar que os isolados de *L. paracasei* e os isolados de *L. lactis* analisados neste trabalho são mais similares entre si, do que com os isolados ambientais com que foram comparados, respectivamente. Além disso, como mencionado anteriormente, a identificação de *Lactobacillus* sp. L3A7 não permitiu sua discriminação em nível de espécie, permanecendo em um ramo separado da árvore filogenética. Isto se dá pela dificuldade de discriminar algumas espécies de *Lactobacillus* através do sequenciamento de 16s rDNA, devido a alta similaridade genética entre elas (> 99 %), o que já foi descrito anteriormente (Torriani *et al.* 2001; Koort *et al.* 2004; Watanabe *et al.* 2009; Huang *et al.* 2010; Huang e Lee 2011). Os isolados de *L. mesenteroides* foram os que apresentaram maior semelhança entre o isolado ambiental testado e a cepa de referência.

Em seguida, foi avaliada a inocuidade dos 11 isolados selecionados, tendo em vista que diversos testes que asseguram a segurança no consumo destes microrganismos são requeridos para autorizar a aplicação dos mesmos na indústria de alimentos. De acordo com a Guia para Instrução Processual de Petição de Avaliação de Probióticos para Uso em Alimentos (ANVISA 2019), linhagens potencialmente probióticas devem ser testadas tanto *in vitro* quanto *in vivo*, para obter aprovação científica para serem aplicadas para o uso pretendido. Os testes mínimos requeridos são os ensaios de susceptibilidade a antimicrobianos de importância clínica e a pesquisa por fatores de virulência, como hemolisinas e outras enzimas com capacidade deletéria. Dito isto, os 11 isolados foram analisados quanto

a sua susceptibilidade a antimicrobianos, atividade hidrolítica (hemólise e gelatinase), e presença de genes de virulência.

Primeiramente, as 11 BALs selecionadas foram analisadas contra 10 antimicrobianos através da metodologia de disco difusão, para investigar sua susceptibilidade a eles. Todas BALs demonstraram ser resistentes ou parcialmente resistentes a pelo menos um dos antibióticos testados. Todos os isolados de *Lactobacillus* e *Leuconostoc* testados neste trabalho foram resistentes à vancomicina, o que já é bem estabelecido na literatura como resistência intrínseca, sendo codificado por genes cromossômicos e não transferíveis para outras bactérias (Zhou *et al.* 2000; Harwood *et al.* 2001). Estes dois gêneros também demonstraram resistência à ceftriaxona, do grupo β -lactâmico. Estes resultados são corroborados pela literatura, visto que BALs geralmente têm resistência intrínseca contra os principais tipos de antibiótico, tais como β -lactâmicos, aminoglicosídeos, nitrofurantoina e fluoroquinolonas (Halami *et al.* 2000). Considerando o grupo dos *Lactobacillus*, Anisimova e Yarullina (2019), em análise do perfil de resistência de 11 isolados deste gênero, demonstraram resultados semelhantes empregando a metodologia de disco difusão: todos os isolados de *Lactobacillus* spp. foram suscetíveis a ampicilina e cloranfenicol, 95 % foram suscetíveis a tetraciclina e eritromicina, e 90 % a clindamicina, além disso a maioria foi resistente a vancomicina, ciprofloxacina, aminoglicosídeos e cefalosporinas.

Todos os isolados de *Lactococcus* sp. testados foram resistentes à ciprofloxacina. *Lactococcus lactis* L4AN1 também foi resistente à ceftriaxona e à clindamicina. A resistência frente a estes dois antimicrobianos já foi descrita em outras BALs com potencial probiótico, como *Bacillus coagulans* HS234 (Kapse *et al.* 2019). Ademais, de acordo com Todorov *et al.* (2007) e Todorov e Franco (2018) *L. lactis* foi suscetível a ceftriaxona, entretanto outros estudos demonstraram o contrário; Kaboré *et al.* (2018), por exemplo, observaram que 80 % dos isolados clínicos de *L. lactis* foram resistentes a este antimicrobiano. Resistência adquirida à clindamicina também já foi descrita em 6 % das BALs testadas por Nawaz *et al.* (2011), incluindo isolados de *Lactobacillus fermentum* e *L. plantarum*. Outro estudo determinou que um isolado de *L. lactis* foi resistente à clindamicina em concentrações baixas (2 μ g), porém suscetível a quantidades maiores (\geq 10 μ g), de acordo com testes de concentração mínima inibitória (CMI) (Yerlikaya 2018).

Em seguida, foi avaliada a presença de fatores de virulência nas 11 BALs

selecionadas. Nenhum dos isolados apresentou atividade hidrolíticas, de acordo com os testes realizados. Também se avaliou a presença de genes de virulência através de reações de PCR. A presença destes genes pode ser considerada preocupante, visto que a literatura já indicou que pode haver transferência horizontal destes genes entre bactérias em *Enterococcus* (Eaton e Gasson 2001) e outras BALs, como *Streptococcus* e *Lactobacillus* (Nawaz *et al.* 2011). A transferência de genes também pode ocorrer entre BALs e outros microrganismos, incluindo cepas patogênicas (Teuber *et al.* 1999; Gevers *et al.* 2003). Nenhum dos seis genes analisados foi detectado nos isolados analisados.

A capacidade de produzir EPS foi avaliada através de cultivo em meio RRM, o que permitiu a identificação de quatro isolados com esta habilidade: *L. mesenteroides* LB10.4, *L. lactis* LB10.3, *L. lactis* L4A8 e *L. lactis* L4AN1. Também foi possível observar que, em períodos mais longos de incubação (> 24 h), as colônias antes esbranquiçadas tornaram-se avermelhadas, demonstrando instabilidade, o que já foi descrito anteriormente (Stingele *et al.* 1996). Similarmente, Fusco *et al.* (2019) determinaram que um isolado de *L. mesenteroides* demonstrou a capacidade de produzir EPS em MRS suplementado com 5 % sacarose, e que oito isolados de *S. thermophilus* produziram EPS quando suplementados com lactose. A produção de EPS vem sendo amplamente estudada em BALs devido a sua potencial aplicação na indústria de alimentos, uma vez que podem ser usados para melhorar a textura de alimentos, aumentar sua estabilidade durante o congelamento e atuar como espessante (Bajpai *et al.* 2016). Ademais, diversos estudos vêm descrevendo o efeito prebiótico de EPS (Mahdhi *et al.* 2017; Ispirli *et al.* 2018).

Baseado nos resultados de inocuidade e também nas condições de crescimento dos onze isolados analisados, duas BALs foram selecionadas para a etapa de prospecção do potencial probiótico: *L. rhamnosus* LB1.5 e *L. paracasei* LB6.4. Tais isolados além de inócuos perante as análises realizadas, também tiveram maior taxa de crescimento a 37 °C do que os demais isolados, atingindo a concentração de 10⁸ UFC/mL após 18 h de incubação a 37 °C. Tal fato é importante para a aderência e manutenção do isolado quando no TGI do hospedeiro.

Para prospecção do potencial probiótico dos isolados, inicialmente as BALs selecionadas tiveram sua capacidade de adesão a células Caco-2 analisada. A razão entre o número de células bacterianas e o número de células Caco-2 variou de 111,7 a 243,3, quantidade superior ao visualizado no cultivo da cepa comercial.

Arellano *et al.* 2019 demonstraram em experimento similar, que quatro isolados de *L. plantarum* apresentaram entre 28 e 142 células bacterianas aderidas por célula eucariótica. Os percentuais de adesão observados nas BALs selecionadas foram de 5,1 e 6,4 % em *L. rhamnosus* LB1.5 e *L. paracasei* LB6.4, respectivamente. Similarmente, García-Ruiz *et al.* (2014) determinaram que isolados de BALs provenientes de amostras de vinho apresentaram taxa de adesão variando de 0,37 a 12,2 %. A capacidade de aderir a tecidos é um pré-requisito determinante para uma BAL ser considerada probiótica (Tuomola *et al.* 2000), uma vez que a mesma precisa ser capaz de se manter no TGI do hospedeiro para desempenhar sua função.

A capacidade de agregação de um microrganismo é considerada essencial para a determinação de seu potencial probiótico, sendo a autoagregação uma propriedade necessária para a adesão ao TGI do hospedeiro, e a coagregação uma propriedade importante para a formação de uma barreira contra a colonização de microrganismos patogênicos (Del Re *et al.* 2000). Sendo assim, a capacidade de autoagregação das BALs selecionadas foi acompanhada pelo período de 5 h de incubação. *L. rhamnosus* LB1.5 e *L. paracasei* LB6.4 atingiram o máximo de autoagregação em 5 h, com 35,1 e 22,5 %, respectivamente, tendo um comportamento similar a cepa comercial. Tais valores são inferiores ao encontrados por Kos *et al.* (2002), que empregaram a mesma metodologia utilizada neste trabalho e determinaram que um isolado de *L. acidophilus* atingiu 70 % de autoagregação em 5h de incubação no próprio meio caldo MRS. Le e Yang (2019) demonstraram que *L. plantarum* FB003 exibiu altas taxas de autoagregação após 5 h, chegando a 44 %. Quanto a coagregação com outros microrganismos, *L. rhamnosus* LB1.5 demonstrou taxas de agregação de 67,3 e 39,3 % com *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 25923, respectivamente; já *L. paracasei* LB 6.4 teve 56,3 e 65,5 % de agregação com estes mesmos isolados, respectivamente. Le e Yang (2019) também avaliaram a capacidade de coagregação de *L. plantarum* FB003 com *L. monocytogenes*, *Salmonella choleraesuis*, *Yersinia enterocolitica* e *Bacillus cereus*, e demonstraram que a coagregação entre estes isolados foi de 43, 32, 18 e 15 %, respectivamente.

Quanto à tolerância ao TGI, as BALs analisadas demonstraram manter sua viabilidade quando expostas às condições do TGI simuladas *in vitro*, similarmente à cepa comercial. No entanto, as cepas de referência *L.*

monocytogenes ATCC 7944 e *E. coli* ATCC 10536 demonstraram uma queda na viabilidade celular em cada etapa da simulação, diminuindo sua concentração de 10^8 UFC/mL para 10^4 UFC/mL e 10^6 UFC/mL, respectivamente. Isso sugere que tais bactérias toleram menos o estresse causado por pH ácido e pela presença de sais biliares, do que os isolados de BALs testados. Em experimento similar, Souza *et al.* (2019) testaram a viabilidade celular de 19 isolados de *Lactobacillus* spp. provenientes de queijo *mozzarella* quando expostos a simulado da fase gástrica da digestão por 2 h e após exposição a fase entérica por 6 h. Seus resultados demonstraram que o isolados *L. casei* SJRP38 e dois isolados de *L. fermentum* SJRP46 e SJRP60 tiveram viabilidade similar às BALs testadas neste trabalho, variando de 10^9 UFC/mL no início da simulação para 10^7 UFC/mL após a exposição ao TGI. Iraporda *et al.* (2019), empregando o protocolo realizado neste trabalho, verificaram que três isolados de *L. paracasei* provenientes de *kefir* também toleraram as condições do TGI, mantendo 10^8 UFC/mL após exposição.

Para melhor compreender o que acontece em nível de expressão gênica nas células das BALs selecionadas frente às condições de simulação do TGI, foi realizada a análise da expressão de genes alvo cujas funções são importantes para a tolerância destas bactérias ao TGI humano e sua colonização. Foram analisados genes já descritos como envolvidos na tolerância a pH ácido (*atpD* e *argH*), adesão e agregação celular (*fbp*), resposta à estresse (*usp*), reparo de DNA (*recF*), e funções vitais para a célula, como glicólise (*gapdH*) e síntese proteica (*tuf*).

Sabe-se que bactérias do gênero *Lactobacillus* aumentam a síntese de pelo menos uma das proteínas que compõem a ATP sintase, como AtpB, AtpA, AtpG ou AtpD, quando em ambiente ácido. Tal enzima tem importante função para célula neste contexto, visto que é responsável por manter a homeostase celular e também para responder à exposição a sais biliares (Papadimitriou *et al.* 2016). Zhao *et al.* (2019) demonstraram que há um aumento da expressão de *argH* em *L. plantarum* quando exposta a pH 3,7. Neste trabalho, no entanto, não houve diferença significativa da expressão de *atpD* após exposição ao SGS, implicando na possibilidade de algum outro gene deste complexo estar sendo superexpresso nesta condição.

Outro gene já descrito como envolvido na tolerância a estresse ácido é *argH*. Wu *et al.* (2013) determinaram que este gene tem sua expressão aumentada 3,06-fold em *L. casei*, quando exposto a pH ácido e suplementado com aspartato.

Tal aminoácido é acumulado pela célula quando em ambientes ácidos e então regula positivamente a expressão de genes envolvidos no seu metabolismo (Zhang *et al.* 2012; Wu *et al.* 2012). No presente trabalho, não houve diferença significativa entre a condição controle e SGS, porém foi possível observar uma tendência de aumento da expressão deste gene em *L. rhamnosus* LB1.5 e *L. paracasei* LB6.4.

A presença do gene *fbp* em BALs aumenta o potencial de adesão e agregação da célula ao tecido do TGI humano, sendo considerada uma característica muito importante para isolados candidatos a probióticos (Watanabe *et al.* 2010). Portanto, a presença deste gene nas BALs selecionadas neste trabalho já indica seu potencial de se aderir e colonizar o TGI. Quanto ao nível de expressão de *fbp* após exposição ao SGS, foi observado o aumento significativo de sua expressão na cepa comercial *L. rhamnosus* FAGRON™ e a diminuição significativa de sua expressão em *L. rhamnosus* LB1.5. Apesar do papel de *fbp* em BALs já estar bem estabelecido, há pouca informação na literatura sobre o efeito das condições do TGI sobre sua expressão. Além disso, os resultados divergentes observados entre as cepas *L. rhamnosus* FAGRON™ e LB1.5 dificultam o entendimento do que acontece em nível de expressão, podendo sugerir que outros fatores possam contribuir para a regulação da expressão deste gene. Uma hipótese, corroborada pelos resultados obtidos em *L. rhamnosus* FAGRON™, é que a exposição a pH ácido do estômago humano cause um aumento da expressão de *fbp* para que a célula aumente seu potencial de aderir ao epitélio do TGI humano.

Não houve mudança no nível de expressão do gene *usp*, que codifica uma das proteínas de estresse universal presentes em bactérias, nas condições analisadas. Assim como *fbp*, há pouca informação na literatura sobre o comportamento deste gene em condições de estresse ácido em BALs. A regulação e função de tal gene ainda são pouco conhecidas, porém já se demonstrou que a proteína Usp tem sua expressão aumentada em diversas situações de estresse, como depleção de nutrientes, altas temperatura, estresse oxidativo, presença de antibióticos, entre outros (Kvint *et al.* 2003).

Zhao *et al.* (2019) não observaram diferença nos níveis de expressão de *recF* em *L. casei* quando exposto a Ph 3.7. O mesmo trabalho ainda analisou a expressão de outros genes envolvidos no reparo de DNA, como *recA*, *recN* e *recO*, que também não apresentaram diferença significativa entre pH 6,3 e pH 3,6, sugerindo que a exposição a pH ácido não gera danos suficientes ao DNA destas

células para que o sistema de reparo seja ativado. Neste trabalho, no entanto, a expressão de *recF* diminuiu significativamente em *L. paracasei* LB6.4 após exposição a pH ácido. Além disso, apesar de não haver diferença estatística, foi possível observar que as outras duas cepas *L. rhamnosus* LB1.5 e FAGRON™ também demonstraram uma tendência de diminuição dos níveis de expressão deste gene após exposição ao SGS.

Quanto ao gene *gapdH*, não foi observada diferença significativa entre as condições analisadas. Resultado semelhante foi observado por Zhao *et al.* (2019), que demonstraram não haver diferença nos níveis de expressão deste gene em *L. casei* em pH 6,3 e pH 3,6. Este trabalho também analisou outros genes envolvidos na via da glicólise, como *ldh*, *pfk*, *pgk*, *pycA*, e *glk*, que também não apresentaram alteração nos níveis de expressão.

Os níveis de expressão de *tuf* aumentaram significativamente em *L. rhamnosus* LB1.5 após exposição ao SGS, e uma tendência de aumento da expressão também foi visualizada em *L. paracasei* LB6.4. Wu *et al.* (2011), em trabalho avaliando os níveis de expressão gênica em *L. casei* frente a pH 6,4 e pH 2,5, observaram resultado similar, tendo determinado que a expressão de *tuf* foi aumentada em pH ácido.

7. CONCLUSÃO

O presente estudo expandiu o conhecimento a respeito da diversidade de BALs em leite cru de búfala no Rio Grande do Sul, tendo em vista que os dois laticínios amostrados recebem matéria-prima de todos os produtores de búfalo do estado. Além de estabelecer o perfil de BALs, foi possível identificar seis isolados inócuos – *L. mesenteroides* LB5.5, *L. mesenteroides* LB10.4, *L. paracasei* LB6.4, *L. rhamnosus* LB1.5, *L. paracasei* L3A7, *L. lactis* L4A8 –, de acordo com os testes realizados, e selecionar dois isolados – *L. rhamnosus* LB1.5 e *L. paracasei* LB6.4 –, para serem estudados quanto a seu potencial probiótico.

Estes dois isolados demonstraram ser capazes de se aderir a células Caco-2, sugerindo capacidade de adesão ao tecido do TGI humano e potencial colonização do mesmo. Bem como demonstraram ter capacidade de autoagregação similar à encontrada em uma cepa probiótica comercial. Ademais, *L. rhamnosus* LB1.5 demonstrou ser capaz de coagregar com cepas referência de *S. aureus* ATCC 25923 e *E. coli* ATCC 25922, sugerindo sua capacidade de se agregar a microrganismos patogênicos presentes do TGI, impedindo a ligação dos mesmos ao tecido do hospedeiro. Também se verificou que ambos isolados são capazes de tolerar as condições adversas do TGI, característica essencial para microrganismos probióticos.

Além disso, foi possível determinar a resposta a nível transcricional dos isolados *L. rhamnosus* LB1.5 e *L. paracasei* LB6.4 frente às condições de estresse ácido, simulando as condições encontradas no estômago humano. Tal abordagem permitiu melhor compreender quais genes são positiva ou negativamente regulados nesta condição.

Considerando todos os resultados obtidos neste trabalho, foi possível indicar que os isolados *L. rhamnosus* LB1.5 e *L. paracasei* LB6.4 têm potencial probiótico, podendo ser aplicados na indústria de alimentos futuramente. Para tal, estudos *in vivo* ainda são necessários, bem como aprovação da ANVISA. Porém, de modo geral, estes resultados apontam o potencial do leite bubalino como fonte de microrganismos funcionais para desenvolvimento de novos produtos.

8. REFERÊNCIAS

- ACBC – Associação Brasileira de Criadores de Búfalo. **Boletim do Búfalo**. 2019. São Paulo. Disponível em: <<https://www.bufalo.com.br/doc/boletim-no1-2019.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2020.
- Amara AA, Shibl A. 2015. Role of Probiotics in health improvement, infection control and disease treatment and management. *Saudi Pharm. J.* 23: 107-14.
- Amaral FR, Carvalho LB, Silva N, Brito JRF. 2005. Qualidade do leite de búfalas: composição. *Rev Bras Reprod Anim Belo Horizonte*. 29(2):106-10.
- Andrade LTA, Nicolau ES, Maia RA, Lima LMR, Arruda MLT. 2009. Análise sensorial de queijo mussarela de búfala temperado com pequi. *Rev Inst Latic.* Cândido Tostes. 367/368(64):3-9.
- Andrade KD, Rangel AHN, Araújo VM, Júnior DML, Oliveira NA. 2011. Efeito da estação do ano na qualidade do leite de búfala. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*. 6(3):33-37.
- Angelakis E, Million M, Henry M, Raoult D. 2011. Rapid and accurate bacterial identification in probiotics and yoghurts by MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Food Sci.* 76:568-72.
- Anisimova EA, Yarullina DR. 2019. Antibiotic resistance of Lactobacillus strains. *Curr. Microbiol.* 76(12):1407-16.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Probióticos: construção da lista de linhagens probióticas**. 2017. Brasil. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/3845226/0/An%C3%A1lise+das+Linhagens+de+Probi%C3%B3ticos_23042018.pdf/6e37da13-2151-4330-85b0-0f449dbb0e95>. Acesso em: 10 jan. 2020.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Minuta de guia para instrução processual de petição de avaliação de probióticos para uso em alimentos**. 2019. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/219201/219401/Minuta+Guia+Instru%C3%A7%C3%A3o+Processual+Avalia%C3%A7%C3%A3o+Probi%C3%B3ticos+em+Alimentos/7546c7c2-a698-4975-8a26-51d9e9e18d97>>. Acesso em: 10 jan. 2020.
- Arellano K, Vazquez J, Park H, Lim J, Ji Y, Kang HJ, Cho D, Jeong HW, Holzapfel WH. 2019. Safety evaluation and whole-genome annotation of Lactobacillus plantarum strains from different sources with special focus on isolated from green tea. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 1-14.
- Axelsson L. 2004. **Lactic acid bacteria: classification and physiology**. Em: Salminen S, von Wright A, Ouwehand A. (Eds) **Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects**, 3rd ed. Basel, New York, pp 20-86.
- Bajpai VK, Rather IA, Majumder R, Shukla S, Aeron A, Kim K, Kang SC, Dubei RC, Maheshwari DK, Lim J, Park YH. 2016. Exopolysaccharide and lactic acid bacteria: Perception, functionality and prospects. *Bangladesh J. Pharmacol.* 11:1-23.
- Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45:493-6.
- Bessède E, Angla-gre M, Delagarde Y, Sep Hieng S, Ménard A, Mègraud F. 2011. Matrix-assisted laser-desorption/ionization biotyper: Experience in the routine of a University hospital. *Clin. Microbiol. Infect.* 17: 533-38.
- Bezkorovainy A. 2001. Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. *Am. J. Clin. Nutr.* 73(2):399-405.

- Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G, Prodhom G. 2010. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a Clinical Microbiology Laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 48: 1549-54.
- BrCast – Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. **Tabelas pontos de corte clínicos.** 2019. Brasil. Disponível em: <<http://brcast.org.br/documentos/> <http://brcast.org.br/documentos/>>. Acesso em: 10 jan. 2020.
- Broadbent JR, Larsen RL, Deibel V, Steele JL. 2010. Physiological and transcriptional response of *Lactobacillus casei* ATCC 334 to acid stress. *J. Bacteriol.* 192(9):2445-58.
- Capitani C, Hauschild FAD, Friedrich CJ, Lehn DN, Souza CFV. 2014. Characterization of yogurts elaborated with probiotics and soluble fiber. *Rev. Bras. Tec. Agroind.* 8(2): 1285-300.
- Del Re B, Sgorbati B, Miglioli M, Palenzona D. 2000. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Lett. Appl. Microbiol.* 31(6): 438-42.
- Depardieu F, Perichon B, Courvalin P. 2004. Detection of the van alphabet and identification of Enterococci and Staphylococci at the species level by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 42(12):5857-60.
- Doan NTL, Van Hoorde K, Cnockaert M, De Brandt E, Aerts M, Le Thanh B. 2012. Validation of MALDI-TOF MS for rapid classification and identification of lactic acid bacteria, with a focus on isolates from traditional fermented foods in Northern Vietnam. *Lett. Appl. Microbiol.* 55:265-73.
- Dušková M, Šedo O, Kšicová K, Zdráhal Z, Karpíšková R. 2012. Identification of lactobacilli isolated from food by genotypic methods and MALDI-TOF MS. *Int. J. Food Microbiol.* 159:107-14.
- Eaton TJ, Gasson MJ. 2001. Molecular Screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1628-35.
- EFSA – European Food Safety Authority. **Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance prepared by the EFSA Panel on Additives and Products of Substances used in Animal Feed (FEEAP).** 2012. Itália: EFSA; 2016. Disponível em: <<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2012.2740>>. Acesso em: 20 jan. 2020.
- FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Probiotics in animal nutrition: production, impact and regulation.** 2016. Roma: FAO; 2016. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i5933e.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2020.
- FAO/WHO – Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. **Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food.** 2002. Canada: FAO/WHO; 2002. Disponível em: <https://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2020.
- FAO/WHO – Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. **Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation.** 2006. Roma: FAO/WHO; 2006. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-a0512e.pdf>>. Acesso em: 20 jan. 2020.

- Fontana L, Bermudez-Brito M, Plaza-Diaz J, Muñoz-Quezada S, Gil A. 2013. Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *Br. J. Nutr.* 109.
- Fortina MG, Ricci G, Borgo F, Manachini PL, Arends K, Schiwon K, Abajy MY, Grohmann E. 2008. A survey on biotechnological potential and safety of the novel *Enterococcus* species of dairy origin, *E. italicus*. *Int. J. Food Microbiol.* 123: 204-11.
- García-Ruiz A, González LD, Esteban-Fernández A, Requena T, Bartolomé B, Moreno-Arribas MV. 2014. Assessment of probiotic properties in lactic acid bacteria isolated from wine. *Food Microbiol.* 44:220-25.
- Gevers D, Danielsen M, Huys G, Swings J. 2003. Molecular characterization of tet(M) genes in *Lactobacillus* isolates from different types of fermented dry sausage. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1270-75.
- Gottesman, S. 1984. Bacterial regulation: Global regulatory networks. *Annu. Rev. Plant Biol.* 18:415-41.
- Guan X, Xu Q, Zheng Y, Qian L, Lin B. 2017. Screening and characterization of lactic acid bacterial strains that produce fermented milk and reduce cholesterol levels. *Braz J Microbiol.* 48(4):730-39.
- Halami PM, Chandrashekar A, Nand K. 2000. *Lactobacillus farciminis* MD, a newer strain with potential for bacteriocin and antibiotic assay. *Lett. Appl. Microbiol.* 30: 197-202.
- Harwood VJ, Brownell M, Perusek W, Whitlock JE. 2001. Vancomycin-Resistant *Enterococcus* spp. Isolated from Wastewater and Chicken Feces in the United States. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4930-33.
- Huang CH, Lee FL, Liou JS. 2010. Rapid discrimination and classification of the *Lactobacillus plantarum* group based on a partial *dnaK* sequence and DNA fingerprinting techniques. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 97:289-96.
- Heeney DD, Gareau MG, Marco ML. 2018. Intestinal *Lactobacillus* in health and disease, a driver or just along for the ride? *Curr. Opin. Biotechnol.* 49:140-7.
- Huang CH, Lee FL. 2011. The *dnaK* gene as a molecular marker for the classification and discrimination of the *Lactobacillus casei* group. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 99:319-27.
- Iraporda C, Rubel IA, Manrique GD, Abraham AG. 2019. Influence in inulin rich carbohydrates from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers on probiotic properties of *Lactobacillus* strains. *LWT Food Sci. Tech.* 101: 738-46.
- Ispirli H, Demirbas F, Dertli E. 2018. Glucan type exopolysaccharide (EPS) shows prebiotic effect and reduces syneresis in chocolate pudding. 55(9):3821-6.
- Jeronymo-Ceneviva AB, de Paula AT, Silva LF, Todorov SD, Franco BD, Penna AL. 2014. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from water-buffalo mozzarella cheese. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 6(3-4):141-56.
- Kaboré WAD, Dembélé R, Bagré TS, Konaté A, Boisramé S, Chevalier V, Konsem T, Traoré AS, Barro N. 2018. Characterization and antimicrobial susceptibility of *lactococcus lactis* isolated from endodontic infections in Ouagadougou, Burkina Faso. *Dent. J.* 6: 1-9.
- Kapse NG, Engineer AS, Gowdaman V, Wagh S, Dhakephalkar PK. 2019. Functional annotation of the genome unravels probiotic potential of *Bacillus coagulans* HS243. *Genomics* 111: 921-29.
- Klein G, Pack A, Bonaparte C, Reuter G. 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 41(2):103-25.

- Koort J, Vandamme P, Schillinger U, Holzapfel W, Bjorkroth J. 2004. *Lactobacillus curvatus* subsp. *melibiosus* is a later synonym of *Lactobacillus sakei* subsp. *carneus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:1621-6.
- Kos B, Suskovic JS, Vukovic S, Simpraga MS, Frece J, Matosic S. 2002. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J. Applied Microbiol.* 94:981-87.
- Kvint K, Nachin L, Diez A, Nystrom T. 2003. The bacterial universal stress protein: function and regulation. *Curr. Opin. Microbiol.* 6(2):140-5.
- Landete JM, García-Haro L, Balsco A, Manzanares P, Berbegal C, Monedero V, Zuñiga M. 2010. Requirement of the *Lactobacillus casei* MaeKR two-component system for L-malic acid utilization via a malic enzyme pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(1):84-95.
- Lane DJ. 1991. **16S/23S rRNA sequencing**. Em Stackebrandt E, Goodfellow M (Eds). **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. John Wiley & Sons, Nova Iorque.
- Le B, Yang SH. 2019. Identification of a novel potential probiotic *Lactobacillus plantarum* FB003 isolated from salted-fermented shrimp and its effect on cholesterol absorption by regulation of NPC1L1 and PPAR α . *Probiotics Antimicrob Proteins.* 11(3):785-93.
- Liu WJ, Chen YF, Kwok LY, Li MH, Sun T, Sun CL, Wang XN, Dan T, Menghebilige, Zhang HP, Sun TS. 2013. Preliminary selection for potential probiotic *Bifidobacterium* isolated from subjects of different Chinese ethnic groups and evaluation of their fermentation and storage characteristics in bovine milk. *J Dairy Sci.* 96(11):6807-17.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta$ C(T)} method. *Methods* 25(4):402-8.
- Lopes FMS, Simões AP, Tenreiro R, Marques JJF, Crespo MTB. 2006. Activity and expression of a virulence factor, gelatinase, in dairy enterococci 112: 208-14.
- Madera C, García P, Jansen T, Rodríguez A, Suárez JE. 2003. Characterization of technologically proficient wild *Lactococcus lactis* strains resistant to phage infection. *Int. J. Food Microbiol.* 86:213-22.
- Mahdhi A, Leban N, Chakroun I, Chaouch MA, Hafsa J, Fdhila K, Mahdouani K, Majdoub H. 2017. Extracellular polysaccharide derived from potential probiotic strain with antioxidant and antibacterial activities as a prebiotic agent to control pathogenic bacterial biofilm formation. *Microb. Pathog.* 109:214-20.
- Man JD, Rogosa M, Sharpe ME, 1960. A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *J. Appl. Bacteriol.* 23: 130-35.
- Maragkoudakis PA, Zoumpopoulou G, Miaris C, Kalantzopoulos G, Pot B, Tsakalidou E. 2006. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *Int. Dairy J.* 16: 189-99.
- Marteau P, Minekus M, Havenaar R, Huis in't Veld JHJ. 1997. Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. *J. Dairy Sci.* 80:1031-7.
- Marra A, Dib-Hajj F, Lamb L, Kaczmarek F, Shang W, Beckius G, Milici AJ, Medina I, Gootz TD. 2007. Enterococcal virulence determinants may be involved in resistance to clinical therapy. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 58: 59-65.
- Mora D, Fortina MG, Parini C, Ricci G, Gatti M, Giraffa G, Manachini PL. 2002. Genetic diversity and technological properties of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from dairy products 278–287.

- MS – Ministério da Saúde. **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC n° 241, de 26 de Julho de 2018.** 2018. Brasil. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3898888/RDC_241_2018_.pdf/941cda52-0657-46dd-af4b-47b4ee4335b7>. Acesso em: 20 jan. 2020.
- Nacef M, Chevalier M, Chollet S, Drider D, Flahaut C. 2017. MALDITOF mass spectrometry for the identification of lactic acid bacteria isolated from a French cheese: the Maroilles. *Int. J. Food Microbiol.* 247:2-8.
- Nawaz M, Wang J, Zhou A, Ma C, Wu X, Moore JE, Millar BC, Xu J. 2011. Characterization and Transfer of Antibiotic Resistance in Lactic Acid Bacteria from Fermented Food Products. *Curr Microbiol* 62: 1081-9.
- Neto OCC, Oliveira CAF, Hotta RM, Sobral PJA. 2005. Avaliação físico-química e sensorial do iogurte natural produzido com leite de búfala contendo diferentes níveis de gordura. *Ciênc Tecno. Aliment.* 25(3):448-53.
- Neville SA, LeCordier A, Ziochos H, Chater MJ, Gosbell IB, Maley MW, Van Hal SJ. 2011. Utility of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry following introduction for routine laboratory bacterial identification. *J. Clin. Microbiol.* 49: 2980-84.
- Omar NB, Castro A, Lucas R, Abriouel H, Yousif NMK, Franz CMAP, Holzapfel WH, Rubén PP, Martínez-Canãmero M, Gálvez A. 2004. Functional and Safety Aspects of Enterococci Isolated from Different Spanish Foods. *Syst. Appl. Microbiol.* 27: 118-30.
- Papadimitriu K, Alegría A, Bron PA, de Angelis M, Gobbeti M, Kleerebezem M, Lemos JA, Linares DM, Ross P, Stanton C, Turrone F, van Sinderen D, Varmanen P, Ventura M, Zúñiga M, Tsakalidou E, Kok J. 2016. Stress physiology of lactic acid bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 80(3):837-90.
- Paula AT, Jeronimo-Ceneviva AB, Silva LF, Todorov SD, Franco BDGM, Penna ALB. 2015. *Leuconostoc mesenteroides* SJRP55: a potential probiotic strain isolated from Brazilian water buffalo mozzarella cheese. *Ann. Microbiol.* 65: 899-910.
- Pellegrino MS, Frola ID, Natanael B, Gobelli D, Nader-Macias MEF, Bogni CI. 2019. In vitro characterizations of lactic acid bacteria isolated from bovine milk as potential probiotic strains to prevent bovine mastitis. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 11(1):74-84.
- Piuri M, Sanchez-Rivas C, Ruzal SM. 2003. Adaptation to high salt in *Lactobacillus*: role of peptides and proteolytic enzymes. *J. Appl. Microbiol.* 95:372-9.
- Piuri M, Sanchez-Rivas C, Ruzal SM. 2005. Cell wall modifications during osmotic stress in *Lactobacillus casei*. *J. Appl. Microbiol.* 98:84-95.
- Pochart P, Marteau P, Bouhnik Y, Goderel I, Bourlioux P, Rambaud JC. 1992. Survival of bifidobacteria ingested via fermented milk during their passage through the human small intestine: an in vivo study using intestinal perfusion. *Am. J. Clin. Nutr.* 55:78-80.
- Sabo SS, Vitolo M, González JDM, Oliveira RPS. 2014. Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. *Food Research Int.* 64:527-36.
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-25.
- Sawatari Y, Yokota A. 2007. Diversity and mechanisms of alkali tolerance in lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:3909-15.

- Silva LF, Casella T, Gomes ES, Nogueira MC, Lindner JDD, Penna AL. 2015. Diversity of lactic acid bacteria isolated from Brazilian water buffalo mozzarella cheese. *J Food Sci.* 80(2):411-17.
- Souza BMS, Borgonovi TF, Casarotti SN, Todorov SD, Penna ALB. 2019. *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus fermentum* Strains Isolated from Mozzarella Cheese: Probiotic Potential, Safety, Acidifying Kinetic Parameters and Viability under Gastrointestinal Tract Conditions. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 11: 382-96.
- Stinglele F, Neeser J. 1996. Identification and Characterization of the *eps* (Exopolysaccharide) Gene Cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6 178: 1680-90.
- Teixeira LV, Bastianetto EB, Oliveira DAA. 2005. Leite de búfala na indústria de produtos lácteos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 29(2):96-100.
- Teuber M, Meile L, Schwarz F. 1999. Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76(1-4): 115-37.
- Todorov SD, Botes M, Danova ST, Dicks LMT. 2007. Probiotic properties of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* HV219, isolated from human vaginal secretions. *J. Appl. Microbiol.* 103: 629-39.
- Todorov SD, Dicks LMT. 2008. Evaluation of lactic acid bacteria from kefir, molasses and olive brine as possible probiotics based on physiological properties. *Annals of Microbiology.* 58(4):661-70.
- Todorov SD, Franco BDGM. 2018. In vitro study of some safety and beneficial properties of bacteriocinogenic *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MK02R. *Chem. Eng. Trans.* 64: 133-38.
- Torriani S, Clementi F, Vancanneyt M, Hoste B, Dellaglio F, Kersters K. 2001. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus* and *L. paraplantarum* species by RAPD-PCR and AFLP. *Syst. Appl. Microbiol.* 24, 554-60.
- Tripathi MK, Giri SK. 2014. Probiotic functional foods: survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods.* 9(1):225-241.
- Tuomola EM, Ouwehand AC, Salminen SJ. 2000. Chemical, physical and enzymatic pre-treatments of probiotic lactobacilli alter their adhesion to human intestinal mucus glycoproteins. *Int. J. Food Microbiol.* 60(1):75-81.
- Tulini FL, Hymery N, Haertlé T, Le Blay G, Martinis ECP. 2016. Screening for antimicrobial and proteolytic activities of lactic acid bacteria isolated from cow, buffalo and goat milk and cheeses marketed in the southeast region of Brazil. *J. Dairy Res.* 83: 115-24.
- Urdaneta V, Casadesús J. 2017. Interactions between bacteria and bile salts in the gastrointestinal and hepatobiliary tracts. *Front. Med.* 4:163.
- Vankerckhoven V, Van Autgaerden T, Vael C, Lammens C, Chapelle S, Rossi R, Jabes D, Goossens H. 2004. Development of a multiplex PCR for the detection of *asaI*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among european hospital isolates of *Enterococcus faecium*. *J. Clin. Microbiol.* 42: 4473-79.
- Vankerckhoven V, Huys G, Vancanneyt M, Vael C, Klare I, Romond MB, Entenza JM, Moreillon P, Wind RD, Knol J, Wiertz E, Pot B, Vaughan EE, Kahlmeter G, Goossens H. 2008. Biosafety assessment of probiotics used for human consumption: recommendations from the EU-PROSAFE project. *Trend. Food Sci. Tech.* 19:102-14.
- Vijaya Kumar B, Vijayendra SV, Reddy OV. 2015. Trends in dairy and non-dairy probiotic products – a review. *J Food Sci Technol.* 52(10):6112-24.

- Wang X, Yang Y, Huycke MM. 2019. Risks associated with Enterococci as probiotics. *Food Res. Int.* 129: 108788.
- Watanabe K, Fujimoto J, Tomii Y, Sasamoto M, Makino H, Kudo Y, Okada S. 2009. *Lactobacillus kisonensis* sp. nov., *Lactobacillus otakiensis* sp. nov. *Lactobacillus rapi* sp. nov. and *Lactobacillus sunkii* sp. nov., four novel heterofermentative species isolated from sunki, a Japanese traditional pickle. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 754-60.
- Watanabe M, Kinoshita H, Nitta M, Yukishita R, Kawai Y, Kimura K, Taketomo N, Yamazaki Y, Tateno Y, Miura K, Horii A, Kitazawa H, Saito T. 2010. Identification of a new adhesin-like protein from *Lactobacillus mucosae* ME-340 with specific affinity to the human blood group A and B antigens. *J. Appl. Microbiol.* 109:927-35.
- Wood BJB, Holzapfel WH. 1995. **The Genera of Lactic Acid Bacteria vol.2.** Blackie Academic & Professional, Glasgow.
- Wu R, Zhang WY, Sun T, Wu JR, Yue X, Meng H, Zhang HP. 2011. Proteomic analysis of responses of a new probiotic bacterium *Lactobacillus casei* Zhang to low acid stress. *Int. J. Food Microbiol.* 147:181-7.
- Wu C, Zhang J, Wang M, Du G, Chen J. 2012. *Lactobacillus casei* combats acid stress by maintaining cell membrane functionality. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39:1031-9.
- Wu C, Zhang J, Du G, Chen J. 2013. Aspartate protects *Lactobacillus casei* against acid stress. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97(9):4083-93.
- Yerlikaya O. 2018. Probiotic potential and biochemical and technological properties of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* strains isolated from raw milk and kefir grains. *J. Dairy Sci.* 102: 124-34.
- Zhang J, Wu C, Du G, Chen J. 2012. Enhanced acid tolerance in *Lactobacillus casei* by adaptive evolution and compared stress response during acid stress. *Biotechnol. Bioproc.* 17(2):283-9.
- Zhao H, Liu L, Peng S, Yuan L, Li H, Wang H. 2019. Heterologous expression of argininosuccinate synthase from *Oenococcus oeni* enhances the acid resistance of *Lactobacillus plantarum*. *Front. Microbiol.* 10: 1393.
- Zhou JS, Shu Q, Rutherford KJ, Prasad J, Birtles MJ, Gopal PK, Gill HS. 2000. Safety assessment of potential probiotic lactic acid bacterial strains *Lactobacillus rhamnosus* HN001, *Lb. acidophilus* HN017, and *Bifidobacterium lactis* HN019 in BALB/c mice. *Int. J. Food Microbiol.* 56: 87-96.
- Zuo F, Appaswamy A, Gebremariam HG, Jonsson AB. 2019. Role of Sortase A in *Lactobacillus gasseri* KX110A1 adhesion to gastric epithelial cells and competitive exclusion of *Helicobacter pylori*. *Front. Microbiol.* 10:2770.