



**Universidade de Brasília**

**Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária**

**Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal**

**POTENCIAL TECNOLÓGICO, PROBIÓTICO E ANTAGONISTA DA  
MICROBIOTA LÁTICA DE LEITE DE BÚFALAS**

**JAQUELINE LAMOUNIER RIBEIRO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL**

**BRASÍLIA-DF**



**Universidade de Brasília**

**Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária**

**Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal**

**POTENCIAL TECNOLÓGICO, PROBIÓTICO E ANTAGONISTA DA  
MICROBIOTA LÁTICA DE LEITE DE BÚFALAS**

**JAQUELINE LAMOUNIER RIBEIRO**

**ORIENTADORA: MÁRCIA DE AGUIAR FERREIRA**

**PUBLICAÇÃO: 162/2019**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL**

**BRASÍLIA-DF**

**POTENCIAL TECNOLÓGICO, PROBIÓTICO E ANTAGONISTA DA  
MICROBIOTA LÁTICA DE LEITE DE BÚFALAS**

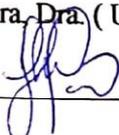
JAQUELINE LAMOUNIER RIBEIRO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO  
SUBMETIDA AO PROGRAMA DE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE  
ANIMAL, COMO PARTE DOS  
REQUISITOS NECESSÁRIOS À  
OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE  
EM SAÚDE ANIMAL.

APROVADA POR:



Márcia de Aguiar Ferreira, Dra. (Universidade de Brasília) (Orientadora)



Janice Lisboa De Marco, Dra. (Universidade de Brasília) (Membro externo)



Eliana dos Santos Leandro, Dra. (Universidade de Brasília) (Membro externo)

Brasília, 05 de 04 de 2019

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

RIBEIRO, J. L. **Potencial tecnológico, probiótico e antagonista da microbiota láctica de leite de búfalas.** Brasília, Faculdade de Agronomia e Veterinária, Universidade de Brasília, 2019. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de Mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos; foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e achase arquivado na secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

R484p      Ribeiro, Jaqueline Lamounier  
Potencial tecnológico, probiótico e antagonista da  
microbiota láctica de leite de búfalas / Jaqueline Lamounier  
Ribeiro; orientador Márcia de Aguiar Ferreira. -- Brasília,  
2019.  
50 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Saúde Animal) --  
Universidade de Brasília, 2019.

1. Bactérias ácido lácticas. 2. leite de búfalas. 3.  
Tecnologia do leite. I. Ferreira, Márcia de Aguiar, orient.  
II. Título.

“Quando o homem aprender a respeitar até o menor ser da criação, seja animal ou vegetal, ninguém precisará ensiná-lo a amar seus semelhantes.” Albert Schweitzer

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por mais esta vitória, pois a força que me faz lutar e perseverar provém apenas e somente do Teu poder.

Ao programa de pós-graduação em Saúde Animal da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária - UnB. À Professora Dra. Márcia de Aguiar Ferreira pela disposição em orientar de forma carinhosa e paciente a qualquer hora. Além disso, sou privilegiada em trabalhar com esta grande profissional que consegue estimular todos ao seu redor. Me espelho em sua dedicação, iniciativa e determinação. Feliz por tê-la como amiga, orientadora e chefe.

A minha amiga e companheira de trabalho no laboratório LabLeite, Sabrina dos Santos Costa Poggiani pelo apoio, conselhos e incentivo. À Msc Mayara Leal Fernandes pela valiosa colaboração com a metodologia. Aos dedicados alunos de PIBIC, a Dannyele, o Elídio e o Paulo. À médica veterinária Camila Pereira da Silva pelas suas considerações no presente trabalho.

Ao departamento de Biologia Celular e Laboratório de Biotecnologia de Leveduras, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade de Brasília (CEL/IB/UnB), ao professor Fernando Araripe por todas as informações e por disponibilizar o laboratório para a execução de uma parte do meu trabalho, aos alunos do departamento e em especial à aluna de mestrado Roberta e Mirna que dispuseram do seu tempo e paciência para me ajudar.

À professora Eliana dos Santos Leandro e à técnica Ester do Laboratório de Higiene da Faculdade de Ciências da Saúde pela ajuda e atenção, além do carinho e generosidade de ambas para comigo.

A todos os funcionários da FAV-UNB, em especial aos colaboradores: Maria do Socorro, Ludmila, Flávia, Virgílio, Franciane, Emília e a todos os docentes envolvidos no meu desenvolvimento intelectual.

Ao Laticínio Bubba Milk, em especial a Dona Marly Nery, que me recebeu muito bem e permitiu a realização do presente projeto.

Ao Sr. Henri Berghs e à empresa Applied Maths pela colaboração com o programa BioNumerics versão 7.6.

A minha grande inspiração, meu filho, Henrique e ao meu companheiro de caminhada até aqui, Leonardo que dispuseram de toda paciência e compreensão, além da motivação e carinho. Esta conquista é nossa!

A minha mãe e vovó Didi pelo apoio e por terem abdicado por muitas vezes dos seus próprios sonhos, por mim. Obrigada por acreditarem em mim! Minha eterna gratidão por tudo!

Ao meu amado pai, conselheiro para todas as horas. Aos meus irmãos: Caroline e Rossine. Aos meus queridos, Roseane e Carlos e a todos os meus familiares e amigos que sempre torceram por mim.

Ao meu tio Lelo e vovó Zezé (em memória), símbolos da coragem, força e fé. Que me ensinaram que na vida devemos fazer a diferença.

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE QUADROS</b>	<b>i</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>ii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>iii</b>
<b>RESUMO</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>vi</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>viii</b>
<b>ANEXO</b>	<b>xv</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>3</b>
2.1. Origem e coleta das amostras de leite	3
2.2. Enumeração, isolamento, caracterização e estocagem de bactérias ácido lácticas	3
2.3. Avaliação do potencial antagonista dos isolados	4
2. 4. Identificação molecular	5
2.5. Potencial tecnológico	6
2.5.1. Capacidade de acidificação	6
2.5.2. Atividade proteolítica extracelular	7
2.5.3. Formação exopolissacarídeos (EPS)	7
2.5.4. Resistência a diferentes concentrações de Cloreto de Sódio (NaCl)	7
2.5.5. Atividade autolítica	7
2.5.6. Produção de diacetil	8
2.6. Potencial probiótico	8
2.6.1. Desenvolvimento em diferentes valores pH e concentrações de bile	8
2.7. Análise dos dados	9
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>9</b>
<b>5. CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>23</b>

## **LISTA DE QUADROS**

**Quadro 1.** Microrganismos indicadores utilizados na avaliação do potencial antagonista de bactérias ácido lácticas isoladas de leite de búfalas.

**Quadro 2.** Desenvolvimento dos 28 isolados de bactérias ácido lácticas nas concentrações de pH 1, 2, 3, 7, 8 e 12 ordenados na tabela conforme agrupamento por similaridade.

**Quadro 3.** Desenvolvimento dos 28 isolados de bactérias ácido lácticas nas concentrações de bile 0.2, 0.3, 0.5, 1, 1.5 e 2% ordenados na tabela conforme agrupamento por similaridade:

## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1.** Frequências de atividade antagonista de 154 isolados de bactérias ácido lácticas provenientes de leite de búfalas, frente aos microrganismos patogênicos alvos.

**Tabela 2.** Identificação de 28 isolados de bactérias ácido lácticas provenientes de leite de búfalas e o nível de similaridade do grupo de cada espécie.

**Tabela 3.** Resultados da avaliação das características tecnológicas de 28 isolados de bactérias ácido lácticas provenientes de leite de búfalas.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Dendrograma gerado após a análise de impressões Rep-PCR de 58 isolados de bactérias ácido lácticas provenientes de leite cru de búfalas. A imagem foi gerada pelo *software* BioNumerics 7.6.

**Figura 2.** Dendrograma gerado de 28 isolados de bactérias ácido lácticas provenientes de leite de búfalas após o sequenciamento genético do gene 16S rRNA para avaliar o nível de similaridade dos grupos formados de uma mesma espécie. A imagem foi gerada pelo *software* BioNumerics 7.6.

**Figura 3.** Comparação do desenvolvimento dos isolados *Enterococcus durans* (103JL), *Lactococcus lactis* (119JL) e *Pediococcus acidilactici* (84JL) em caldo Man, Rogosa & Sharpe em diferentes escalas de pH. Cada resultado representa uma média de duas leituras. Gráficos gerados através do *Software SigmaPlot* v.10.

**Figura 4.** Comparação do desenvolvimento dos isolados *Enterococcus faecalis* (46JL), *Enterococcus durans* (105JL) e *Pediococcus acidilactici* (84JL) em caldo Man, Rogosa & Sharpe em diferentes concentrações de bile. Cada resultado representa uma média de duas leituras. Gráficos gerados através do *Software SigmaPlot* v.10.

## RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi caracterizar a microbiota láctica de leite de búfalas e avaliar o seu potencial tecnológico, antagonista e probiótico. A contagem média de bactérias ácido lácticas (BALs) das amostras de leite cru foi  $4,67 \times 10^6$  UFC/mL e 154 isolados foram caracterizados morfológicamente sendo que, 102 (66,2%) foram identificados como cocos, 49 (31,8%) como cocobacilos e três (1,9%) como bacilos. Os isolados foram avaliados quanto ao potencial antagonista frente *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enteritidis*. Dos 154 isolados, 148 (96,1%) apresentaram atividade antagonista frente a pelo menos um dos microrganismos alvos testados, com destaque para 58 (37%) isolados que desenvolveram antagonismo a todos os patógenos testados. Esses isolados foram submetidos a Rep-PCR *fingerprint* e agrupados por similaridade. A partir do resultado obtido com base na região conservada do gene 16S rRNA, 28 isolados foram encaminhados para o sequenciamento genético e o resultado demonstrou que, 57,1% eram do grupo enterococos (*E. dispar*, *E. durans* e *E. faecalis*); 14,2% *Lactobacillus rhamnosus*; 10,7% *Lactococcus lactis*; 7,1% *Pediococcus acidilactici* e 10,7% do gênero *Weissella* (*W. paramesenteroides* e *W.thailandensis*). Esses mesmos isolados (n=28) foram submetidos às análises para avaliação do potencial tecnológico (capacidade de acidificação, produção de *exopolissacarídeos* (EPS) e diacetil, atividade proteolítica extracelular, autólise e desenvolvimento em diferentes concentrações de NaCl) e aos testes de desenvolvimento em diferentes pH e concentrações de bile para avaliar o potencial probiótico. Apenas sete (25%) isolados apresentaram capacidade de acidificação que resultasse em redução do pH, para menor ou igual a 4,6 e no tempo de 24 horas; nenhum isolado apresentou capacidade de produção de EPS; nove (32,1%) isolados apresentaram a capacidade em produzir diacetil e, também nove (32,1%) isolados apresentaram atividade proteolítica. O percentual da capacidade de realizar autólise dos isolados de BALs em 24h variou 0 a 100%, sendo que quatro isolados (14,2%.) apresentaram capacidade acima de 80%. Observou-se que 17 (60,7%) dos isolados se desenvolveram em todas as concentrações cloreto de sódio testadas (4%, 6% e 10%). Na avaliação de capacidade de desenvolvimento em diferentes valores de pH observou-se que 14 (50%) isolados apresentaram viabilidade em pH ácido (de 1 a 3) e 12 (42,85%) em valores de pH alcalinos (7, 8 e 12)

durante todo o período de avaliação que foi de uma a 13 horas apresentaram resistência e desenvolvimento em todos os valores de pH testados. Todos os isolados de BALs demonstraram desenvolvimento na presença de bile, em pelo menos duas concentrações testadas; na concentração de 0,2% todos os isolados se desenvolveram, mas não em todos os períodos avaliados; 17 (60,71%) isolados BALs na concentração de 0,3% de bile; 14 (50%) na concentração de 0,5%; 16 (57,14%) em bile a 1,0%; 20 (71,42%) na concentração de 1,5%; e 17 (60,71%) em concentração de 2,0% em todos os tempos avaliados. Os resultados obtidos nesta pesquisa demonstraram que a microbiota láctica presente no leite de búfalas da região apresenta importante diversidade e potencial tecnológico, que podem contribuir para o desenvolvimento de produtos que agreguem mais valor a esse leite e à produção de derivados.

**Palavras chave:** bactérias ácido lácticas, *Enterococcus* spp, potencial antimicrobiano, tecnologia do leite.

## ABSTRACT

The aim of this study was to define the lactic microbiota of buffalo milk and evaluate its technological, antagonist and probiotic potential. The average count of lactic acid bacteria (LABs) of the raw milk samples was  $4,67 \times 10^6$  CFU/ml, and 154 isolates were defined morphologically, where 102 (66,2%) were identified as coccus, 49 (31,8%) as cocobacillus and three (1,9%) as bacillus. The isolates were classified regarding the antagonist potential against *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enteritidis*. From the 154 isolates, 148 (96,1%) showed antagonistic activity against at least one of the target microorganisms tested, with emphasis on 58 (37%) isolates that developed antagonism to all tested pathogens. Those isolates were submitted to Rep-PCR fingerprint and were grouped according to similarity. From the obtained results based on the conserved region of the 16S rRNA gene, 28 isolates were sent to the genetic sequencing and the result demonstrated that 57,1% were from the enterococci group (*E. dispar*, *E. durans* e *E. faecalis*); 14,2% *Lactobacillus rhamnosus*; 10,7% *Lactococcus lactis*; 7,1% *Pediococcus acidilactici* and 10,7% of the *Weissella* genre (*W. paramesenteroides* and *W.thailandensis*). Those same isolates (n=28) were submitted to the analysis regarding technological potential evaluation (acidification capacity, exopolysaccharides (EPS) and diacetyl production, extracellular proteolytic activity, autolysis and development in different concentrations of NaCl) and development tests in different concentrations of pH and bile to evaluate their probiotic potential. Only seven (25%) isolates showed acidification capacity that resulted in pH reduction to 4,6 or less in the time period of 24 hours; none of the isolates showed EPS production capacity; nine (32,1%) isolates showed diacetyl production capacity, and also nine (32,1%) isolates showed proteolytic activity. The percentual of autolytic capacity of the LABs isolates in 24h varied from 0 to 100%, wherein four isolates (14,2%) presented autolytic capacity greater than 80%. It was observed that 17 (60,7%) of the isolates have developed in every concentration of NaCl (4%, 6% and 10%). In the development capacity analysis in different pH values, it was observed that 14 (50%) isolates showed viability in acid pH (from 1 to 3) and 12 (42,85%) in alkaline pH values (7, 8 and 12) during the whole period of evaluation that was from 1 to 13 hours showed resistance and development in every tested pH value. All LABs isolates showed development in the presence of bile, in at

least two tested concentrations; in the 0,2% concentration, every isolate have developed, but not in every evaluated period; 17 (60,71%) LABs isolates in the 0,3% bile concentration; 14 (50%) in the 0,5% concentration; 16 (57,14%) in bile at 1,0%; 20 (71,42%) in the 1,5% concentration; and 17 (60,71%) in the 2,0% concentration in every period of time evaluated. The results obtained in this research have shown that the lactic microbiota in the regionally produced buffalo milk represents an important diversity and technological potential that can contribute to the development of products that add more value to this kind of milk and to the making of milk products.

**Key words:** lactic acid bacteria, *Enterococcus* spp, antimicrobial potential, dairy technology.

# 1. INTRODUÇÃO

O búfalo é um animal da classe Mammalia, ordem dos Artiodactyla, família Bovidae e sub-família Bovinae que corresponde a seis gêneros: Bos, Bison, Bibos, Syncerus, Angra e Bubalus. O gênero Bubalus deu origem à espécie *Bubalus bubalis* com três subespécies: *bubalis*, *fulvus* e *kerebau* (SIMPSON, 1945). Dentre os bubalinos introduzidos no Brasil, quatro raças são reconhecidas oficialmente pela Associação Brasileira de Criadores de Búfalos - ABCB: Carabao ou Rosilho da subespécie *kerebau*; Jafarabadi, Mediterrânea e Murrah da subespécie *bubalis* (ABCB, 2011).

A bubalinocultura tornou-se uma alternativa para a atividade pecuária em diversas regiões do Brasil, devido à rusticidade do rebanho, fertilidade, adaptação favorável e longevidade produtiva (VIEIRA, *et. al.* 2011, SANTOS, *et. al.* 2016). No Brasil, o efetivo de bubalinos é de cerca de 1,4 milhão de cabeças (IBGE, 2017a), o que representa um aumento com relação aos anos anteriores que foi 1.370,941 em 2016 e de 1.370,488 em 2015 (IBGE, 2017b). A Secretaria da Agricultura, Abastecimento e Desenvolvimento Rural, cadastrou, em 2016, dezenove propriedades de bubalinocultura, totalizando 802 animais na região do Distrito Federal e uma indústria de beneficiamento para leite de búfalas (BRASÍLIA, 2016).

O leite de búfalas apresenta características relevantes de interesse industrial, como composição físico-química com teores mais elevados de gordura, proteína, lactose, sólidos totais e extrato seco desengordurado, quando comparados com o leite de vaca (PIGNATA, *et al* 2014). Por esse motivo, derivados produzidos com leite bubalino possuem maior rendimento industrial (HÜHN, *et. al.* 1991, SUMIT & YOGESH, 2017). Além disso, com relação à microbiota presente no leite de búfalas, diversos autores observaram predominância de bactérias ácido lácticas (BALs) (BEI-ZHONG HAN, *et. al.*, 2007; PIMENTEL, 2016; TSAKALIDOU & PAPADIMITRIOU, 2016).

O grupo de BALs é constituído por microrganismos em morfologia de cocos, coco-bacilos e bacilos que podem estar dispostos em cadeias ou individualmente; são tolerantes a ácidos, Gram positivos, catalase negativa, não esporulados, microaerófilos ou estritamente anaeróbios ( INÊS *et. al.*, 2008). Atualmente, o grupo pertence ao Reino Monera ou domínio Bacteria; Filo *Firmicutes*; Classes *Bacilli* e ordem *Lactobacillales*,

sendo as principais famílias descritas a seguir acompanhadas pelos seus principais gêneros: *Aerococcaceae* (*Abiotrophia*), *Carnobacteriaceae* (*Carnobacterium*), *Enterococcaceae* (*Enterococcus*; *Tetragenococcus* e *Vagococcus*), *Lactobacillaceae* (*Lactobacillus* e *Pediococcus*), *Leuconostocaceae* (*Leuconostoc*; *Oenococcus* e *Weissella*) e *Streptococcaceae* (*Lactococcus* e *Streptococcus*). (<http://www.uniprot.org/taxonomy/186826>).

Determinadas linhagens de BALs são capazes de sintetizar compostos antimicrobianos, como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, diacetil, dióxido de carbono e bacteriocinas (DEEGAN *et. al.*, 2006; OGAKI *et. al.*, 2015). As bacteriocinas são responsáveis por promoverem a segurança microbiológica e o aumento do tempo de prateleira de diversos produtos, em especial de alimentos de origem animal, reduzindo o uso de aditivos químicos, e com a vantagem adicional de não causarem riscos à saúde ou ao meio ambiente. Diversos estudos têm demonstrado que BALs exercem atividade antagonista contra várias bactérias patogênicas contaminantes de alimentos, como por exemplo, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enteritidis* (ORTOLANI *et. al.*, 2010; DAL BELLO *et. al.*, 2012; KOCH, 2014; DE LIMA, 2016).

BALs apresentam metabolismo homofermentativo onde o ácido lático é o único produto formado e heterofermentativo em que se produzem metabólitos como ácido acético, etanol, CO<sub>2</sub>, entre outros, além do ácido lático. São essencialmente mesófilos, alguns microrganismos deste grupo podem produzir enzimas glicolíticas, lipolíticas e proteolíticas que podem transformar os nutrientes fundamentais de diversos produtos, como o leite e o queijo, em compostos com propriedades sensoriais desejáveis conferindo-lhes sabores, odores e texturas específicas (DE MARTINIS *et. al.*, 2003; TULINI *et. al.*, 2016). Além disso, alguns destes microrganismos são capazes de conferir benefícios à saúde do hospedeiro quando administrados em quantidades adequadas, pois diversas BALs são reconhecidas como probióticos (FAO/WHO, 2002). Porém, para terem potencial probiótico necessitam resistir às condições adversas do trato gastrointestinal do hospedeiro e ainda demonstrar habilidade antagonista contra patógenos (ALVIM, 2011; FERNANDES, *et. al.* 2018).

Pesquisas com BALs têm despertado o interesse de pesquisadores do mundo todo e das mais diversas áreas. Portanto, a identificação da microbiota láctica no leite das

diferentes espécies de animais de produção representa importante papel na busca de novos produtos que possam contribuir para a tecnologia de alimentos. O objetivo desta pesquisa foi identificar a microbiota láctica de leite de búfalas e avaliar o seu potencial tecnológico, antagonista e probiótico.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Origem e coleta das amostras de leite**

Foram coletadas 24 amostras de leite de búfalas, no período de setembro de 2017 à fevereiro de 2018, provenientes de uma propriedade/laticínio localizada na Região Administrativa IV, Brazlândia, Distrito Federal (n=12) e de um fornecedor de leite cru cuja propriedade está localizada em Monte Alto, Padre Bernardo, no estado de Goiás (n=12). A propriedade do laticínio produz cerca de 80 Litros de leite/dia e possui aproximadamente 300 animais das raças Jafarabadi, Mediterrânea, Murrah e mestiços. Já a propriedade do fornecedor, produz cerca de 20 Litros de leite/dia e possui cerca de 100 animais de raças Murrah e mestiços. As amostras de leite foram coletadas diretamente dos latões e/ou de tanques de refrigeração, em frascos de vidro previamente esterilizados e, transportadas refrigeradas para o Laboratório de Análises de Leite e Derivados, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, da Universidade de Brasília (LABLEITE/FAV/UnB) para a realização das análises.

### **2.2. Enumeração, isolamento, caracterização e estocagem de bactérias ácido lácticas**

As amostras foram submetidas a diluições decimais seriadas (1:10; 1:100; 1:1000) em solução salina (NaCl) 0,85%. As diluições selecionadas foram semeadas, por profundidade, em ágar Man, Rogosa & Sharpe (MRS) (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. Vandhani Ind. LBS Marg, Mumbai, India) e incubadas a 35°C por 72 horas, em jarra de anaerobiose (GasPak™ EZ CO<sub>2</sub> Container System, Becton Dickinson & CO, Sparks, MD, EUA) (WEHR & FRANK, 2004; MORAES *et. al.*, 2010; CAVICCHIOLI *et. al.*, 2017). Após esse período as colônias formadas foram enumeradas e os resultados expressos em Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL).

De cada placa foram selecionadas aleatoriamente, de três a cinco colônias para a

caracterização morfológica de BALs a partir do teste de produção de catalase e da coloração de Gram. Após a confirmação as colônias foram purificadas por esgotamento em placas contendo ágar MRS, com incubação a 35°C por 48 horas, resultando em 154 isolados que foram transferidos para “*eppendorfs*” contendo caldo MRS e Glicerol (Glicerina bi destilada, CEATOX, São Paulo, Brasil) a 30%, e armazenados a ultrafreezer -80°C (MORAES *et. al.*, 2010 ).

### 2.3. Avaliação do potencial antagonista dos isolados

Os testes de antagonismos foram realizados com os 154 isolados de BALs, conforme metodologia preconizada por Ortolani (2010) e Moraes *et. al.* (2010), sendo utilizado como indicadores nos testes cepas patogênicas de referência, conforme Quadro 1. em todas as placas, uma alíquota de 20 µL da cultura de *Lactobacillus sakei* 2a foi semeada como controle positivo de BALs bacteriocinogênica (DE MARTINIS & FRANCO, 1998).

**Quadro 1.** Microrganismos indicadores utilizados na avaliação do potencial antagonista de bactérias ácido lácticas isoladas de leite de búfalas.

<b>Microrganismos indicadores</b>	<b>Procedência</b>
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 7644
<i>Listeria monocytogenes</i> “Scott A”	ATCC 49594
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25293
<i>Salmonella enteritidis</i>	ATCC 13076
<i>Lactobacillus sakei</i> *	ATCC 15521

\* BAL conhecida como cepa sensível a substâncias antagonistas.

As culturas de BALs foram recuperadas em caldo MRS; as cepas de *L. monocytogenes* em caldo Trypticase de soja (TSB- HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, Índia); a cepa de *S. enteritidis* em água de peptona (Merck KGaA, Germany, USA) e as de *S. aureus* em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI- Becton, Dickinson and Company Sparks, USA) a 35°C por 24 horas. Os inóculos de 3x10<sup>5</sup> UFC/mL determinados através da escala de *Mc Farland* (Probac) das culturas de BALs foram submetidas ao protocolo *spot-on-the-lawn* para avaliação do perfil antagonista a

partir da inoculação de 20 µL da cultura recuperada em placas contendo ágar MRS modificado com 0,5% de dextrose (Becton, Dickinson and Company Sparks, USA) (LIMA, *et al.* 2007), de forma que em cada placa de cepa indicadoras houvessem três pontos de isolados e um ponto para controle positivo de *Lb. sakei* 2a, com incubação a 25°C por 24 a 48 horas (MORAES *et al.*, 2010; ORTOLANI *et al.*, 2010).

Após, cada placa recebeu uma sobrecamada de 8,0 mL dos inóculos com  $3,0 \times 10^5$  UFC/mL das cepas indicadoras em caldos MRS, TSB, água peptonada ou BHI, de acordo com a cepa, e 75% de meio semi-sólido ágar bacteriológico (Dinâmica®, Indústria brasileira). *Lb. sakei* ATCC 15521 foi utilizada como controle positivo de sensibilidade às substâncias antagonistas produzidas por BALs. Em seguida, as placas foram incubadas a 35°C por 24 horas e avaliadas quanto à formação de halos de inibição ao redor das colônias de BALs semeadas. A presença de halos bem definidos (a partir 1,0 mm) foi registrada como atividade antimicrobiana. Adotou-se para a seleção de identificação genotípica e avaliação do potencial tecnológico e probiótico dos isolados de BALs o seguinte critério: apenas os isolados que obtiveram atividade antagonista contra todas as cepas indicadoras foram submetidos às respectivas análises.

#### **2. 4. Identificação molecular**

Nesta etapa, optou-se por submeter à identificação molecular os isolados que apresentassem potencial antagonista frente a todos os microrganismos alvos testados.

A Rep-PCR *fingerprint* foi realizado com *primer* (GTG)<sub>5</sub> (5'-GTGGTGGTGGTGGTG – 3') (VERSALOVIC *et al.*, 1994; GEVERS *et al.*, 2001). As reações de PCR continham 12,5 µL Mix PCR MyTaq™ Polymerases & Mixes X2 (Bioline reagents ltd, United Kingdom), 0,5 µL do *primer* na concentração de 50 pMol, 1 µL da colônia diluída em 10 µL de água milli-Q® estéril completando o volume de 25 µL conforme Müller, *et al.* (2007) e Coelho (2013), com adaptações. A amplificação da reação foi realizada em termociclador nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C durante 30 seg, seguidos de 30 ciclos de 95°C durante 30 seg; 40°C durante 30 seg e 65°C durante 8 min, e extensão final a 65°C por 16 min (DAL BELLO *et al.*, 2012).

Os produtos da Rep-PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% durante duas horas em uma voltagem constante de 75 V em tampão 0,5 x

Tris/Borato/EDTA, utilizando 1 Kb DNA como marcador de peso molecular e corados com GelRed (COELHO, 2013). Os perfis de Rep-PCR foram visualizados por meio do *Software Image Lab™ 5.0*, Bio-rad. os perfis foram analisadas pelo *software BioNumerics 7.6*. Os isolados foram agrupados para identificação de acordo com a similaridade entre os perfis. Assim, determinada a correlação de Pearson com otimização de 1,5%, o dendrograma foi obtido a partir dos perfis genéticos observados, com nível de similaridade (NS) de 79,9%.

Baseado nos perfis gerados pela técnica de Rep-PCR, isolados representativos de cada grupo foram selecionados e revitalizados em 10 mL de caldo MRS em 35°C por 24 horas para pesquisa do gene 16S rRNA, por PCR utilizando os *primers* P027F e 1492R; para iniciar a extração de DNA foi utilizado o *Kit* de extração de DNA Wizard® (Promega), conforme as recomendações do fabricante. As reações de PCR continham 25 µL de *GoTaq® Flexi DNA Polymerase, Mix 2x*, 1 µL de cada *primer* 10 pMol, 5 µL de DNA e água livre de DNA até completar o volume final de 50 µL e processadas conforme Leandro (2013).

Os produtos de PCR foram enviados para o sequenciamento genético na empresa Myleus Biotecnologia, Belo Horizonte, estado de Minas Gerais. Ainda, as sequências de nucleotídeos obtidas foram comparadas na base de dados do *National Center for Biotechnology Information* (GenBank) e avaliadas quanto ao nível de similaridade dentro de uma mesma espécie através do *software BioNumerics 7.6*.

## **2.5. Potencial tecnológico**

Nesta etapa foram submetidos aos testes para avaliação do potencial tecnológico, os isolados de BALs sequenciados.

### *2.5.1. Capacidade de acidificação*

Os isolados foram revitalizados em caldo BHI com incubação *overnight* a 37°C. Para o teste de atividade acidificante, tubos contendo 10 mL de leite em pó desnatado reconstituído estéril (10% p/v) (Molico) foram inoculados (1% p/v) com isolados e incubados a 37°C. O pH foi aferido em zero, seis e 24 horas (Medidor de pH 0-14, K39-

0014P - KASVI). Os dados foram expressos com a média da duplicata da análise (DAL BELLO *et. al.*, 2012; OLIVEIRA *et. al.*, 2015).

#### 2.5.2. Atividade proteolítica extracelular

Atividade proteolítica extracelular foi determinada segundo Franciosi *et. al.* (2009) e Dal Bello *et. al.* (2012) com adaptações, utilizando 20µL de cada cultura revitalizada foi inoculado sobre a superfície de ágar bacteriológico (Dinâmica®, Indústria brasileira) a 2%, constituído de 10% (p /v) de leite desnatado em pó e em seguida foi incubado a 37°C durante 4 dias. A atividade proteolítica foi indicada por uma zona clara em torno das colônias.

#### 2.5.3. Formação exopolissacarídeos (EPS)

As alíquotas de (1% p/v) de cada cultura com aproximadamente  $3 \times 10^5$  UFC/mL, revitalizadas, foram inoculadas em 10 mL de leite em pó desnatado reconstituído (10% p/v) e incubadas a 37°C por 24 h. A produção de EPS a partir de lactose foi determinada de forma qualitativa pela mensuração do grau de formação do fio ( DAL BELLO, *et. al.*, 2012).

#### 2.5.4. Resistência a diferentes concentrações de Cloreto de Sódio (NaCl)

Alíquotas de 100 µL das culturas foram inoculadas em 350 µL de caldo MRS previamente distribuído em placas de microtitulação com diferentes concentrações de NaCl: 0, 4, 6 e 10% (p/v). A capacidade das culturas para crescer em diferentes concentrações foi avaliada após 24 h a 37°C por medição da densidade óptica (DO 640 nm) usando EPOCH (BIOTEK). O potencial de multiplicação das culturas nas diferentes concentrações de NaCl foi avaliado pela diferença das DO registradas nas duas leituras (DAL BELLO *et. al.*, 2012).

#### 2.5.5. Atividade autolítica

A autólise das células foi medida como descrito por Mora *et. al.* (2003) e Dal Bello *et. al.* (2012) com adaptações. As culturas foram cultivadas em caldo MRS (Oxoid) durante 24 h a 37°C para atingir DO 640 nm de 0,8-1. As células foram lavadas em solução tampão fosfato tripotássio (50 mmol-1, pH 6,5) (Sigma-Aldrich, Irlanda) e

resuspendidas na mesma solução tampão e incubadas a 37°C. O grau de autólise foi expresso pela porcentagem de decréscimo na DO 640 nm usando EPOCH (BIOTEK), após 24 h.

#### *2.5.6. Produção de diacetil*

A produção de diacetil foi determinada de acordo com Dal Bello *et. al.* (2012). Culturas revitalizadas (1% p / v) foram inoculadas em 10 mL de leite em pó reconstituído e incubadas a 37°C durante 24 h. Um mililitro de cada suspensão de células foi combinado com 0,5 mL de  $\alpha$ -naftol (1% p/v) e KOH (16% p/v) (Sigma-Aldrich, Irlanda) e incubou-se a 37°C durante 10 min. A produção de diacetil é indicada pela formação de um anel vermelho no topo dos tubos.

### **2.6. Potencial probiótico**

Nesta etapa foram analisados os isolados de BALs submetidos ao sequenciamento genético.

#### *2.6.1. Desenvolvimento em diferentes valores pH e concentrações de bile*

Foram inoculados 66  $\mu$ L, da cultura obtida com caldo MRS, em microtubos contendo 1,0 mL de solução salina fosfatada (PBS), composta por NaCl, cloreto de potássio (KCl) (Dinâmica, Indústria brasileira), fosfato dissódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (Emsure, Germany), fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (Dinâmica, Indústria brasileira) e ácido clorídrico (HCl) (Titripur Merck), ajustadas para pH 1, pH 2, pH 3, pH 7, pH 8 e pH 12. Os inóculos foram submetidos à placas de microtitulação de 96 poços (Kasvi 12-096). Cada poço foi preenchido com 160  $\mu$ L desses inóculos acondicionadas em microtubos.

Além disso, foram inoculados 66  $\mu$ L da cultura obtida com caldo MRS, em microtubos contendo 1,0 mL do caldo MRS suplementado com sais biliares Oxbile (Sigma, Irlanda) a 0,2%; 0,3%; 0,5%; 1%; 1,5% e 2%. Os testes foram submetidos à microtitulação de fundo de placas estéreis de 96 poços (Kasvi 12-096). Cada poço foi preenchido com 160  $\mu$ L dos inóculos e, por fim, todas as placas foram vedadas com filme de alta aderência (Parafilm) e submetidas à espectrofotometria no equipamento Epoch (Biotek), com densidade óptica (DO) de 640 nm, a 37°C, sendo realizada a

leitura de hora em hora, por 13 horas, a partir da primeira hora. Culturas cultivadas em caldo MRS foram utilizadas como controle negativo. Os experimentos foram realizados em duplicatas (TODOROV *et. al.*, 2011).

## **2.7. Análise dos dados**

Todos os resultados obtidos nessa pesquisa foram submetidos à análise estatística descritiva e não paramétrica. Para a plotagem dos gráficos foi utilizado o programa *SigmaPlot* v.10 (Systat Software Inc. Germany).

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### *Enumeração e caracterização morfológica de bactérias ácido lácticas*

Os resultados obtidos demonstraram contagem média de  $6,34 \times 10^7$  UFC/mL para BALs nas amostras de leite de búfalas coletadas na propriedade/laticínio (n=12) e de  $3,0 \times 10^5$  UFC/mL nas amostras de leite do fornecedor (n=12) sendo que a média geral das contagens foi de  $4,67 \times 10^6$  UFC/mL (n=24). Dos 154 isolados, observaram-se 102 (66,2%) com morfologia de cocos, 49 (31,8%) de cocobacilos e três (1,9%) de bacilos.

A microbiota autóctone do leite cru é considerada como o principal fator que pode interferir na contaminação, sobrevivência e multiplicação de patógenos podendo reduzir o número de ocorrências de enfermidades associadas ao consumo de alimentos. Os resultados obtidos nessa pesquisa indicam que as bactérias ácido lácticas presentes em quantidade expressiva nas amostras de leite de búfalas, compõem essa microbiota e podem ter ação efetiva na inibição do desenvolvimento de microrganismos patogênicos.

Hashmi e Saleem (2015) relataram contagem média de  $7,4 \times 10^5$  UFC/mL de BALs, ao analisarem 120 amostras de leite de búfalas cru, provenientes de 10 propriedades familiares situadas em pequenas cidades da Índia. A predominância de BALs caracterizadas com morfologia de cocos, também tem sido observada por outros autores, com amostras de leite de búfalas e de outras espécies (FERREIRA, 2016; OLIVEIRA, 2015; KOCH, 2014).

### *Potencial antagonista*

Dos 154 isolados, 148 (96,1%) apresentaram atividade antagonista frente a pelo menos um dos microrganismos alvos testados sendo que, 58 (37%) desenvolveram antagonismo a todos os patógenos (Tabela 1).

**Tabela 1.** Frequências de atividade antagonista de 154 isolados de BALs provenientes de leite de búfalas, frente aos microrganismos patogênicos alvo.

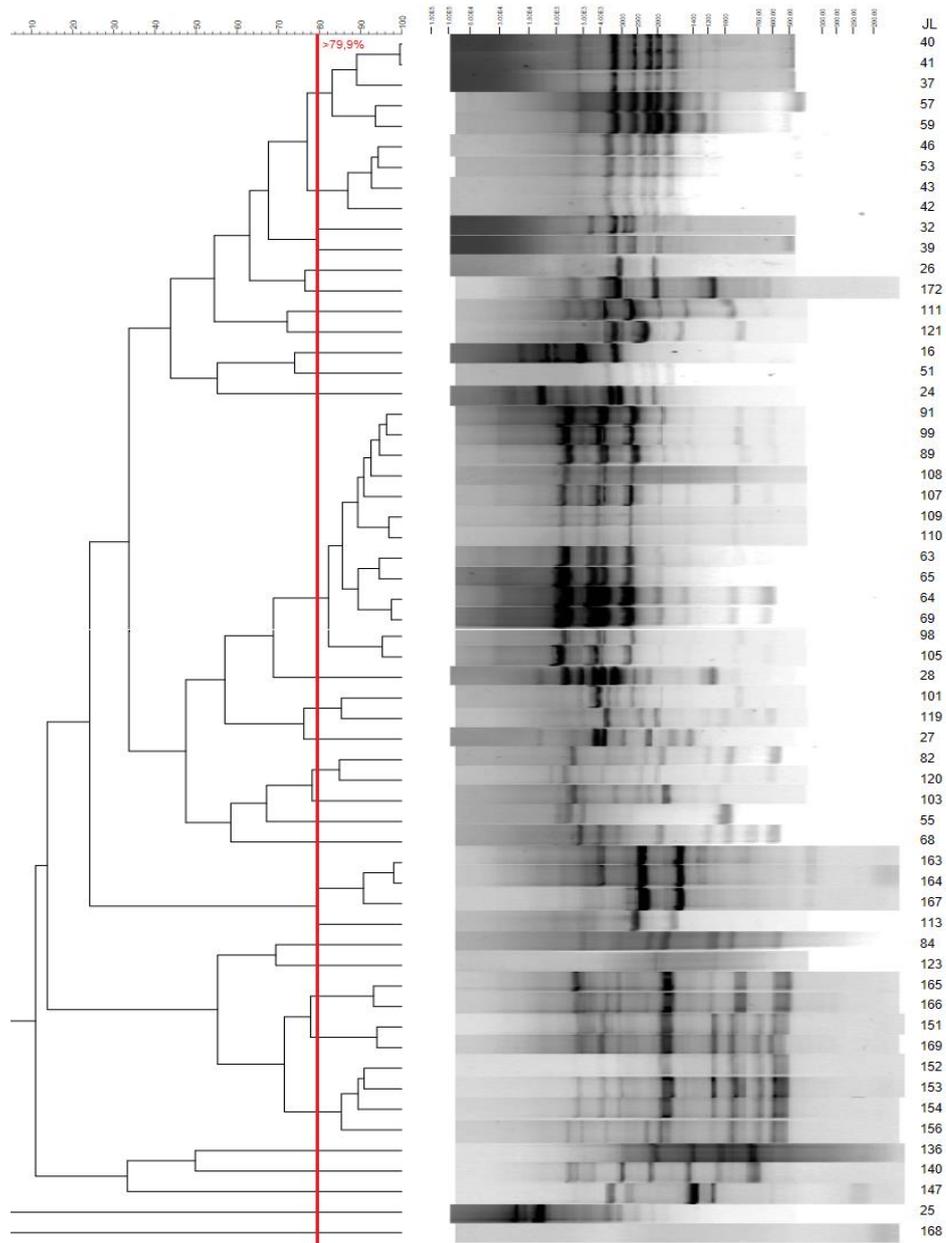
<b>Microrganismos alvo</b>	<b>isolados (n)</b>	<b>frequência (%)</b>
<i>S. aureus</i> ATCC 25293	117	75,9
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 49594	112	72,7
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	108	70,1
<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076	103	68,6
SA, LM1, LM2, SE	58	37,0

Legenda: SA = *S. aureus*; LM1= *L. monocytogenes* ATCC 49594; LM2= *L. monocytogenes* ATCC7644; SE= *S. enteritidis*

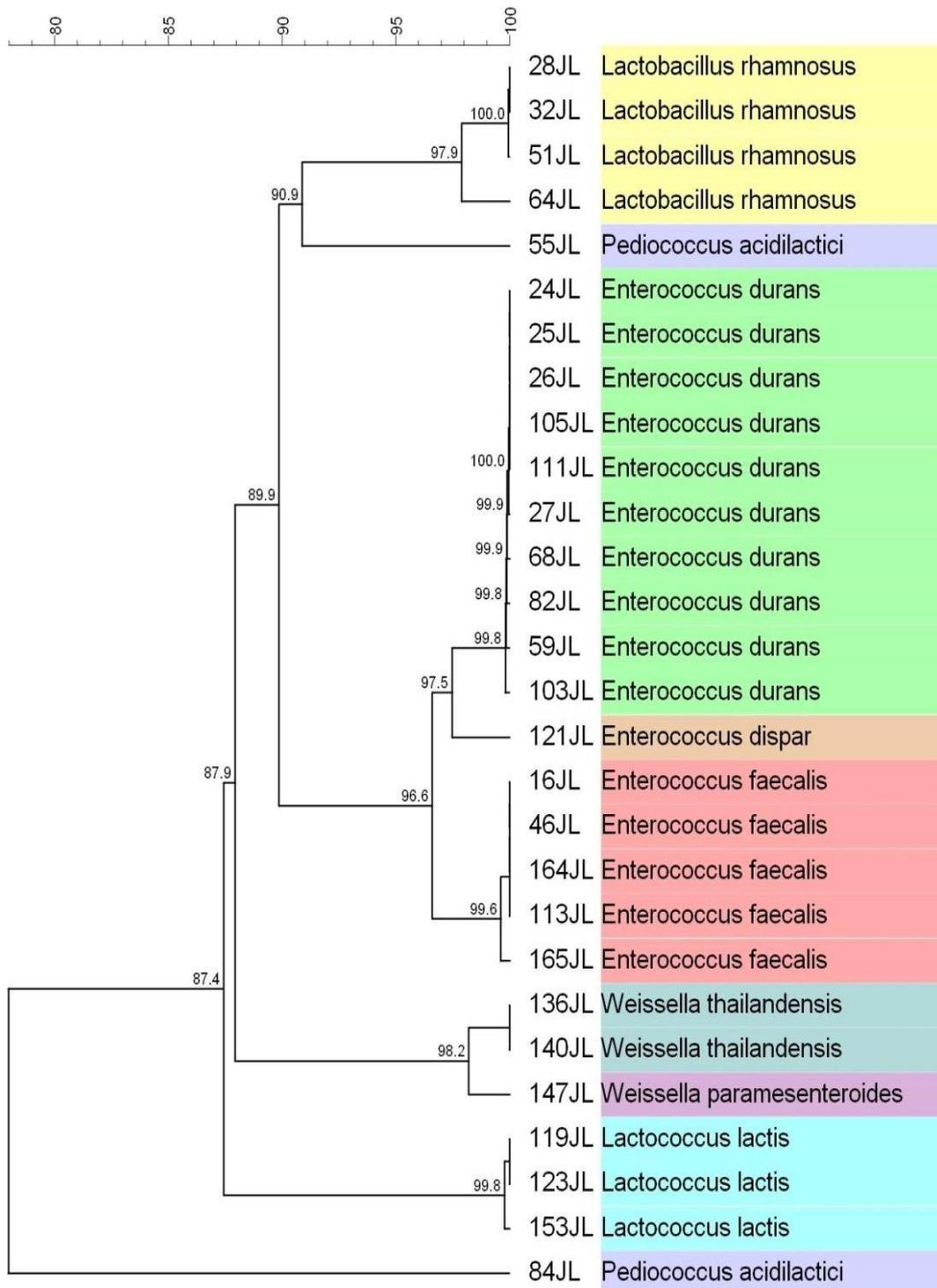
A atividade antagonista contra todos os patógenos demonstrada por 58 isolados de BALs deve ser considerada relevante apesar de, não ter sido objeto de estudo dessa pesquisa a natureza das substâncias responsáveis pela inibição dos microrganismos alvos testados. Pesquisas têm demonstrado que BALs isoladas de leite de diferentes espécies e de produtos lácteos estão associadas a atividades antimicrobianas frente a microrganismos patogênicos (PERIN *et. al.*, 2017; PERIN & NERO, 2014; KOCH, 2014; DAL BELLO *et al.*, 2012). Deve-se destacar o isolamento de BALs do gênero *Weissella* que apresentaram antagonismo contra todas as cepas patogênicas testadas. Diversos estudos têm demonstrado o potencial antagonista de *Weissella* spp (AYENI *et. al.*, 2011; NDAGANO *et. al.*, 2011).

#### *Identificação molecular*

Para esta etapa optou-se por identificar os 58 (37%) isolados de BALs que desenvolveram antagonismo frente a todos os patógenos testados. Os perfis de bandas dos isolados foram analisadas pelo *software* BioNumerics 7.6, que foram agrupados em padrões distintos considerando o nível de similaridade (NS) de 79,9% (Figura 1) e, após o sequenciamento com base na região conservada do gene 16S rRNA dos isolados, representantes de cada grupo (n=28) foram identificados pelo *software* BioNumerics 7.6 e avaliados quanto ao NS dos grupos formados de uma mesma espécie (Figura 2).



**Figura 1.** Dendrograma após a análise de impressões Rep-PCR de 58 isolados de bactérias ácido lácticas provenientes de leite cru de búfalas. A imagem foi gerada pelo *software* BioNumerics 7.6.



**Figura 2.** Dendrograma de 28 isolados de bactérias ácido lácticas provenientes de leite cru de búfalas após o sequenciamento genético do gene 16SrRNA para avaliar o nível de similaridade dos grupos formados de uma mesma espécie. A imagem gerada pelo *software* BioNumerics 7.6.

A partir do sequenciamento genético foram identificados: 16 (57,1%) *Enterococcus*; quatro (14,2%) *Lactobacillus rhamnosus*; três (10,7%) *Lactococcus lactis*; dois (7,14%) *Pediococcus acidilactici* e três (10,7%) *Weissella* (Tabela 2) .

**Tabela 2.** Identificação de 28 isolados de bactérias ácido lácticas provenientes de leite de búfalas e o nível de similaridade do grupo de cada espécie.

<b>Isolados de BALs</b>	<b>n (%)</b>	<b>Nível de similaridade (NS %)</b>
<i>Enterococcus dispar</i>	1 (3,57)	-
<i>Enterococcus durans</i>	10 (35,7)	>99,8
<i>Enterococcus faecalis</i>	5 (17,8)	>99,6
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	4 (14,2)	>97,8
<i>Lactococcus lactis</i>	3 (10,7)	>99,8
<i>Pediococcus acidilactici</i>	2 (7,14)	<70
<i>Weissella thailandensis</i>	2 (7,14)	100
<i>Weissella paramesenteroides</i>	1 (3,57)	-

A diversidade da microbiota láctica das amostras analisadas, identificou microrganismos de interesse para a indústria laticínica como *L. lactis*, *Lb. rhamnosus*, *Weissella spp*, *P. acidilactici* e *Enterococcus spp*, sendo o grupo dos *Enterococcus* o que se apresentou com maior frequência. As bactérias desse gênero apresentam facilidade em colonizar numerosos nichos ecológicos e constituem uma parte essencial da microbiota intestinal de animais e de humanos. Caracterizam-se como linhagens homofermentativas com o ácido láctico como produto final de fermentação da glicose, sem produção de gás, o que diminui o pH e pode inibir microrganismos indesejáveis, sendo que algumas espécies deste grupo são capazes de sintetizar bacteriocinas e, por resistirem à variadas condições ambientais adversas, atualmente são desenvolvidos para utilização como probióticos (FOULQUIÉ MORENO *et. al.*, 2006; GAMA, 2008; GALVEZ *et. al.*, 2009). Entretanto, algumas cepas podem possuir fatores de virulência e capacidade de resistência antimicrobiana, sendo referidas pela Comissão Europeia de

Segurança dos Alimentos como "aparentemente seguro" desde que seja identificada a sua avirulência (QPS, 207).

#### *Potencial Tecnológico*

Os resultados da avaliação do potencial tecnológico dos 28 isolados estão contidos na Tabela 3.

**Tabela 3.** Resultados da avaliação das características tecnológicas de 28 isolados de bactérias ácido lácticas provenientes de leite cru de búfalas.

Isolados BALs	Capacidade de acidificação (pH)			* EPS	* Diacetil	* Proteólise	Autólise** (%)	Resistência ao NaCl***			
	0h	6h	24h					0%	4%	6%	10%
<i>E. dispar</i> 121JL	6,9	6,67	5,26	(-)	(-)	(-)	30	+++	+	+++	+++
<i>E. durans</i> 24JL	6,9	6,28	5,5	(-)	(+)	(-)	14	++	+++	+++	+++
<i>E. durans</i> 25JL	6,9	6,55	5,4	(-)	(-)	(-)	0	++	++	++	++
<i>E. durans</i> 26JL	6,9	6,55	5,34	(-)	(+)	(-)	39	+	+	+++	++
<i>E. durans</i> 27JL	6,9	6,20	5,27	(-)	(-)	(-)	14	++	++	++	++
<i>E. durans</i> 105JL	6,9	6,15	4,58	(-)	(+)	(-)	6	+++	+++	+++	+++
<i>E. durans</i> 111JL	6,9	6,25	4,67	(-)	(-)	(+)	22	+++	+++	+++	+++
<i>E. durans</i> 82JL	6,9	6,48	4,9	(-)	(-)	(+)	3	+	+	+++	+++
<i>E. durans</i> 68JL	6,9	6,33	4,62	(-)	(-)	(-)	81	+	+++	+++	+++
<i>E. durans</i> 59JL	6,9	6,67	5,1	(-)	(-)	(-)	0	+++	+++	+++	+++
<i>E. durans</i> 103JL	6,9	6,18	5,06	(-)	(+)	(-)	92	+++	+++	+++	+++
<i>E. faecalis</i> 16JL	6,9	6,28	5,65	(-)	(-)	(+)	29	++	+++	+++	+++
<i>E. faecalis</i> 46JL	6,9	6,7	4,58	(-)	(+)	(-)	5	+	+++	+	+++
<i>E. faecalis</i> 164JL	6,9	6,32	5,42	(-)	(-)	(+)	0	+++	+	+	+
<i>E. faecalis</i> 113JL	6,9	6,54	5,69	(-)	(-)	(+)	21	+++	+	+++	+++
<i>E. faecalis</i> 165JL	6,9	5,67	4,5	(-)	(-)	(-)	100	+++	+	+	+
<i>Lb.rhamnosus</i> 28JL	6,9	6,85	5,1	(-)	(+)	(-)	83	+++	+++	+++	+
<i>Lb.rhamnosus</i> 32JL	6,9	6,8	4,83	(-)	(-)	(-)	1	+++	+++	+++	+++
<i>Lb.rhamnosus</i> 51JL	6,9	6,72	4,6	(-)	(+)	(-)	2	+++	+++	+++	+++
<i>Lb.rhamnosus</i> 64JL	6,9	6,39	4,68	(-)	(+)	(-)	64	+	+++	+++	+++
<i>L.lactis</i> 119JL	6,9	6,55	5,26	(-)	(-)	(+)	0	+	+	+	+
<i>L.lactis</i> 123JL	6,9	6,81	5	(-)	(+)	(+)	40	+	+	+	+
<i>L.lactis</i> 153JL	6,9	6,2	4,35	(-)	(-)	(-)	47	+	+	+	+
<i>P.acidilactici</i> 55JL	6,9	6,77	5,2	(-)	(-)	(-)	6	+++	+++	+++	+++
<i>P.acidilactici</i> 84JL	6,9	5,69	4,48	(-)	(-)	(-)	22	++	+	+	+
<sup>1</sup> <i>Weissella</i> 147JL	6,9	6,82	4,66	(-)	(-)	(+)	0	+	+	+	+
<sup>2</sup> <i>Weissella</i> 136JL	6,9	6,8	4,66	(-)	(-)	(+)	0	+++	+	+	+++
<sup>2</sup> <i>Weissella</i> 140JL	6,9	6,75	4,55	(-)	(-)	(+)	0	+	+	+++	+++

<sup>1</sup>*Weissella paramesenteroides*; <sup>2</sup>*Weissella thailandensis*; \* positivo (+), negativo (-) \*\* Determinação do percentual de autólise 100-A1/A2x100 (A1 = 0h e A2 = 24h). \*\*\* Método espectrofotômetro DO 650 ≤ 0,1= +; DO 650≤0,5= ++ ; DO 650≥0,5= +++

Os resultados obtidos na avaliação da capacidade de acidificação demonstraram que após seis horas de incubação, os isolados 84JL (*P. acidilactici*) e 165JL (*E. faecalis*) produziram diminuição do pH para 5,69 e 5,67, respectivamente, e após 24 horas para 4,48 e 4,5. Deve-se destacar ainda, que o ponto isoelétrico da caseína (pH 4,6) somente foi atingido após 24 horas de incubação e por sete isolados (25%) que foram: *E.durans* (105JL); *E. faecalis* (46JL e 165JL); *Lb. rhamnosus* (51JL); *L. lactis* (153JL); *P. acidilactici* (84JL) e *W.thailandensis* (140JL).

Nesta pesquisa, o abaixamento do valor de pH foi observado somente após 24 horas. Diversos estudos corroboram com esses resultados, pois demonstraram também que a maioria dos isolados de laboratório são inicialmente lentos na produção de ácidos (FRANCIOSI *et. al.*, 2009; MORANDI *et. al.*, 2011; DAL BELLO *et. al.*, 2012, PICON *et. al.*, 2015).

Apenas sete isolados apresentaram capacidade de acidificação que resultasse em redução do pH para menor ou igual a 4,6 no tempo de 24 horas. Esse valor de pH é de suma importância, por atingir o ponto isoelétrico da caseína, provocando a sua precipitação, que resulta no fenômeno da coagulação do leite, essencial para a produção de queijos e leites fermentados.

A rápida queda do pH é muito importante durante a produção de queijos e fermentados, porque contribui com a textura da massa e desenvolvimento de sabor, além de controlar microrganismos indesejáveis e patogênicos (PERIN *et. al.*, 2017). Além disso, pode contribuir não só para a conservação de propriedades organolépticas, mas também para estender a vida de prateleira de alimentos fermentados (BERESFORD *et. al.*, 2001; SALVUCCI *et. al.*, 2016).

Porém, segundo Ribeiro *et. al.* (2013) microrganismos com baixa capacidade de acidificação podem ser usados como organismos auxiliares, dependendo de outras características. Fernandes *et. al.* (2018) avaliaram a capacidade de acidificação dos seis isolados do gênero *Pediococcus* e também não observaram redução do pH nas seis primeiras horas, sendo que o menor valor de pH registrado foi 6,19.

Para atividade proteolítica, nove (32,1%) isolados apresentaram: *E. durans* (82JL e 111JL); *E. faecalis* (16JL e 113JL); *L. lactis* (119JL e 123JL); *W. paramesenteroides* (147JL) e *W. thailandensis* (136JL e 140JL).

A frequência de isolados de BALs (32,1%) com atividade proteolítica observada nesta pesquisa pode ser considerada relevante, em especial pelo isolamento do gênero *Weissella* (*W. paramesenteroides* e *W. thailandensis*). Conforme Guedes Neto (2004) essa bactéria exerce papel importante em processos de maturação de queijos. Durante a maturação do queijo, vários compostos aromáticos são gerados devido à ação de enzimas proteolíticas do leite e de BALs adicionadas. *Weissella* spp. Também tem sido isolada em produtos vegetais fermentados artesanais em países da África e da Ásia e é crescente o interesse no potencial tecnológico e probiótico dessa bactéria (OUOBA *et. al.*, 2010; GALLE *et. al.*, 2010; PATEL *et. al.*, 2013; ONO *et. al.*, 2014).

A atividade proteolítica de BALs consiste na ação de proteinases e peptidases, que hidrolisam a caseína em pequenos peptídeos e aminoácidos, o que gera a maior parte dos precursores aromáticos e influência nas características organolépticas. Além disso, o sistema proteolítico de BALs pode contribuir para a liberação de peptídeos bioativos que podem melhorar a absorção no trato intestinal, ao funcionar como carreadores de minerais, especialmente, o cálcio (LEROY & DE VUYST, 2004; PERIN *et. al.*, 2017).

Quanto à produção de EPS nenhum dos isolados foi positivo para essa característica. Perin *et. al.* (2017) que testaram 56 isolados de *Enterococcus* e *Lactococcus* de leite cru de cabras, quanto Fernandes *et. al.* (2018) que avaliaram seis isolados de *Pediococcus pentosaceus* em leite cru de ovelhas, também não observaram a produção de EPS nos seus estudos.

A produção de polissacárides extracelulares (EPS) é um importante recurso para culturas utilizadas na produção de lácteos, em especial de leites fermentados como coalhadas e iogurtes, pois desenvolvem características reológicas do produto, como o aumento da viscosidade e a ligação de água, resultando em coágulo com textura lisa e cremosa, além de conferir efeitos benéficos para a saúde (FRANCIOSI *et. al.*, 2009; PERIN *et. al.*, 2017). A produção de EPS por BALs também está relacionada com aumento da adesão no trato gastrointestinal (DE PALÊNCIA *et. al.*, 2009).

Com relação à capacidade de desenvolvimento em diferentes concentrações de cloreto de sódio (4%, 6% e 10%), observou-se que 17 (60,7%) isolados foram capazes de se desenvolver ou de apresentar tolerância a todas as concentrações testadas: *E. durans* (24JL, 59JL, 103JL, 105JL, 111JL); *Lb. rhamnosus* (32JL, 51JL e 54JL); *P. acidilactici* (55JL).

A capacidade de desenvolvimento ou de apresentar tolerância a todas as concentrações de cloreto de sódio testadas de 60,7% dos isolados, em especial *E. durans*, *Lb. Rhamnosus* e *P. acidilactici* representa um achado interessante, especialmente na produção de determinados tipos de queijos e de outros alimentos que contenham elevadas concentrações de sal. Além disso, o crescimento em meios com alto teor de sal é desejável para culturas iniciadoras, uma vez que o cloreto de sódio é um dos aditivos mais importantes para a conservação de alimentos (SALVUCCI *et. al.*, 2016; FERNANDES *et. al.*, 2018).

De acordo com Facklam *et al.* (2002) *Enterococcus* se desenvolvem bem em meios contendo cloreto de sódio 6,5%. Em nossa pesquisa, todos os isolados de *Enterococcus* apresentaram tolerância a concentrações de até 10%.

O percentual da capacidade de realizar autólise dos isolados de BALs em 24h variou 0 a 100%, sendo que quatro isolados (14,2%.) apresentaram essa capacidade maior do que 80%, que foram: *E. durans* (68JL e 103JL), *E. faecalis* (165JL) e *Lb. rhamnosus* (28JL).

A frequência de BALs que apresentaram capacidade de autólise foi significativa com destaque para isolados de *E. durans*, *E. faecalis* e *Lb. rhamnosus*. Embora a autólise de culturas iniciadoras seja benéfica, se for muito rápida, podem ocorrer consequências indesejáveis, tais como a produção de ácidos e remoção insuficiente de lactose residual. Na prática, um equilíbrio na autólise é necessário para a maturação ideal de determinados queijos e para o desenvolvimento do sabor. Além disso, isolados com baixa atividade autolítica podem ser desejáveis, pois se produzirem bacteriocinas ou outra atividade antagonista podem sobreviver por mais tempo no produto e continuar a produzir tais atividades (PERIN *et. al.*, 2017; FERNANDES *et. al.*, 2018 ).

A autólise de BALs favorece o acesso das peptidases intracelulares aos seus substratos, mas também acelera a maturação dos queijos. Os peptídeos e aminoácidos gerados também contribuem para sabor específico de queijos. As células bacterianas intactas são necessárias para as atividades fisiológicas, tais como fermentação e remoção de oxigênio de lactose, e por uma série de reações de sabor. Entretanto, a principal consequência da autólise no queijo é acelerar as reações peptidolíticas (PIRAINO *et. al.*, 2008).

Perin *et. al.* (2017) que avaliaram a capacidade de autólise de 24h, também para *E. durans* (n=17) e *E. faecalis* (n=8) encontraram valores máximos de 72,67% e 97%, respectivamente. Portanto, valores semelhantes aos encontrados neste trabalho para estes microrganismos.

Por outro lado, nove (32,1%) isolados apresentaram a habilidade em produzir diacetil: *E. durans* (24JL, 26JL, 103JL, 105JL); *E. faecalis* (46JL); *Lb. rhamnosus* (28JL, 51JL, 64JL) e *L. lactis* (123JL). A produção de diacetil por *Enterococcus* tem sido relatada em diversas pesquisas, como o estudo de Perin *et. al.* (2017), que observaram que a maioria dos isolados de *Enterococcus* provenientes de leite cru de cabras foi capaz de produzir diacetil. Ribeiro *et. al.* (2013), também avaliaram o grupo dos Enterococos e observaram que níveis médios de produção de diacetil foram produzidos por quatro isolados de *Enterococcus* e apenas um isolado de *Enterococcus* apresentou resultados negativos.

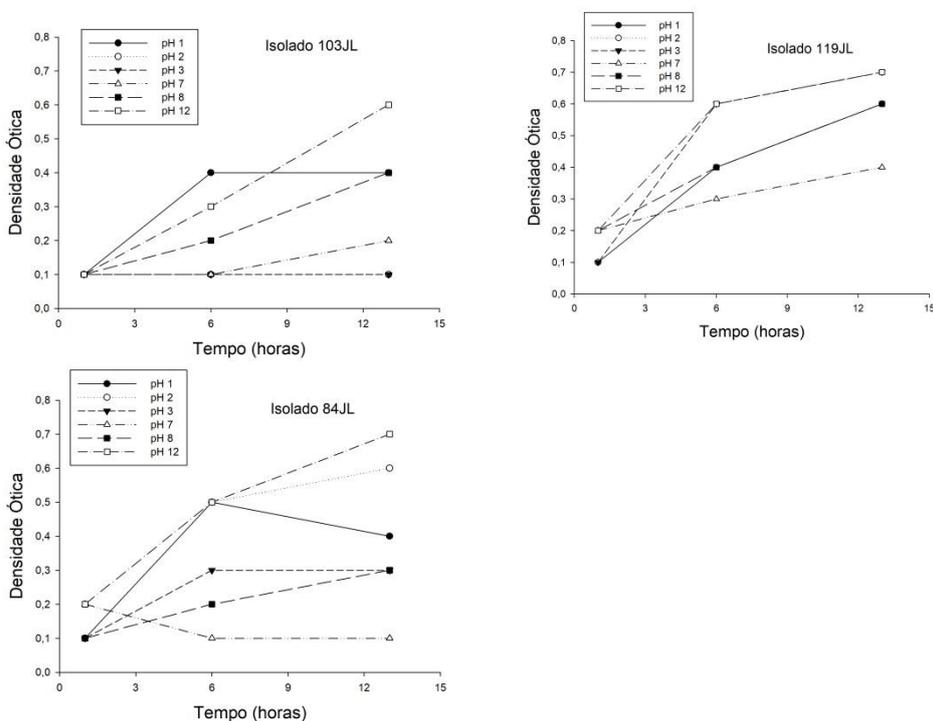
A produção de diacetil por isolados de *Lb. rhamnosus* e *Lactococcus lactis* também foi relatada por outros autores (JYOT *et. al.*, 2004; DAL BELLO *et. al.*, 2012). O diacetil é um composto volátil e aromatizado gerado como um produto final da conversão de citrato em piruvato, o que contribui para o desenvolvimento e equilíbrio de sabores e odores desejáveis em diversos produtos lácteos. A produção de diacetil é considerada cultura-dependente porque nem todas BALs têm capacidade de metabolizar o citrato, portanto esse comportamento pode diferir entre as espécies e as culturas (LEROY & DE VUYST, 2004; PERIN *et. al.*, 2017).

#### *Potencial probiótico*

Na avaliação de capacidade de desenvolvimento em diferentes valores de pH, observou-se que 14 (50%) dos isolados apresentaram viabilidade em pH ácido (de 1 a 3) durante todo o período de avaliação (de uma a 13 horas): *E. durans* (26JL, 68JL, 103JL, 105JL, 111JL, 164JL); *E. faecalis* (113JL, 165JL); *L. lactis* (153JL, 119JL, 123JL); *P. acidilactici* (84JL) e *W. thailandensis* (136JL e 140JL) (anexo, Quadro 2).

Em valores de pH alcalinos (7, 8 e 12) observou-se que 12 (42,85%) isolados apresentaram-se viáveis durante todo o período de avaliação: *E. durans* (25JL, 103JL, 105JL, 111JL); *E. faecalis* (113JL, 164JL, 165JL); *L. lactis* (119JL, 123JL, 153JL); *P. acidilactici* (84JL) e *W.thailandensis* (140JL, 136JL).

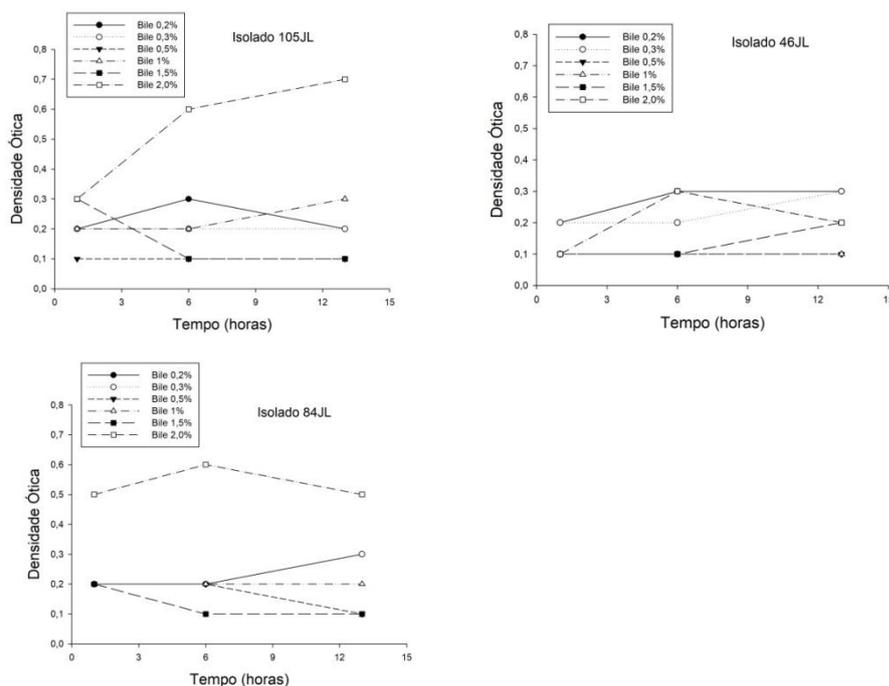
Deve-se destacar que 11 (39,28%) isolados de BALs apresentaram capacidade de se desenvolver em todos os valores de pH testados e em todos os períodos, que foram *E. durans* (103JL e 111JL); *E. faecalis* (113JL, 164JL, 165JL); *L. lactis* (119JL, 123JL, 153JL); *P. acidilactici* (84JL) e *W.thailandensis* (140JL, 136JL), sendo que destes os que apresentaram desenvolvimentos mais expressivos foram os isolados 103JL (*E. durans*), 119JL (*L.lactis*) e 84JL (*P. acidilactici*) (Figura 3).



**Figura 3.** Desenvolvimento dos isolados *E. durans* (103JL), *L. lactis* (119JL) e *P. acidilactici* (84JL) em caldo MRS, em diferentes valores de pH, por 13 horas; cada resultado representa uma média de duas leituras. Gráficos gerados através do *Software SigmaPlot v.10*.

Com relação ao desenvolvimento na presença de bile, todos os isolados de BALs (n=28) foram capazes se desenvolver em pelo menos duas das concentrações testadas. Na concentração de 0,2% todos se desenvolveram, mas não em todos os períodos avaliados. Observou-se desenvolvimento de: 17 (60,71%) isolados BALs na concentração de 0,3% de bile; 14 (50%) na concentração de 0,5%; 16 (57,14%) em bile a 1,0%; 20 (71,42%) na concentração de 1,5%; e 17 (60,71%) em concentração de 2,0% de sais biliares em todos os tempos avaliados. Nessa última concentração, os isolados *E. dispar* (121JL); *E. durans* (68JL, 103JL, 105JL, 111JL); *E. faecalis* (113JL e 165JL); *L. lactis* (119JL); *P. acidilactici* (84JL) e *W. paramesenteroides* (147JL) foram os que apresentaram desenvolvimento mais expressivo (anexo, Quadro 3).

Os isolados 121JL (*E. dispar*); 105JL e 111JL de (*E. durans*); 46JL e 113JL (*E. faecalis*) e 84JL (*P. acidilactici*) foram capazes de se desenvolver em todas as concentrações a partir de 0,3% de sais biliares, porém apenas os isolados 105JL, 46JL e 84JL apresentaram crescimento em todas as concentrações e tempos testados (Figura 4).



**Figura 4.** Comparação do desenvolvimento dos isolados *E. durans* (105JL), *E. faecalis* (46JL) e *P. acidilactici* (84JL) em caldo MRS em diferentes concentrações de bile. Cada resultado representa uma média de duas leituras. Gráficos gerados através do *Software SigmaPlot v.10*.

A capacidade de sobreviver através do trato gastrointestinal e persistir temporariamente no ambiente intestinal do hospedeiro são as principais características funcionais de uma cultura probiótica (SANTOS *et al.*, 2014). Assim, devido às condições do estômago, onde o valor de pH é cerca de 2,0 torna-se essencial selecionar probióticos com alta tolerância a condições ácidas (BAUTISTA-GALLEGO *et. al.*, 2013; PATEL *et. al.*, 2014).

Da mesma forma, os sais biliares secretados para o intestino delgado também representam um desafio para a sobrevivência bacteriana, assim, é importante selecionar isolados probióticos com resistência a altas concentrações de bile porque elas poderiam desenvolver-se melhor no intestino delgado (TODOROV *et. al.*, 2011; BAUTISTA-GALLEGO *et. al.*, 2013). Ren *et. al.*, (2014) e Almeida Júnior (2015) ressaltam que resistência a ácidos e tolerância a sais biliares são considerados os critérios básicos para a triagem de potenciais estirpes com finalidades probióticas.

A frequência de BALs que se mantiveram em crescimento quando submetidas a todos os valores de pH ácidos e alcalinos e às diferentes concentrações de sais biliares, estimula o desenvolvimento de estudos mais aprofundados com esses isolados, em especial os dos gêneros *Pediococcus* e *Weissella* que têm despertado bastante interesse em pesquisas recentes (FERREIRA, 2016; FERNANDES *et. al.*, 2018).

## **5. CONCLUSÃO**

Os resultados obtidos nesta pesquisa permitiram concluir que a microbiota láctica presente no leite de búfalas da região do Centro-Oeste apresenta importante diversidade e potencial tecnológico, que podem contribuir para o desenvolvimento de produtos que agreguem mais valor a esse leite e à produção de derivados.

## **6. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Esse trabalho, além de contribuir com os dados gerados sobre a microbiota láctica do leite produzido na região, consolida a área de estudo do grupo de pesquisadores envolvido e amplia as perspectivas para outras pesquisas, nas quais se pretende aprofundar o conhecimento sobre a ação antagonista desses isolados e sobre seu potencial probiótico, para garantir que apresentem condições seguras de uso como bioconservantes, inibidores de microrganismos patogênicos de origem alimentar, agregadores de características organolépticas e probióticos.

## BIBLIOGRAFIA

- ALMEIDA JÚNIOR, W. L. G. Seleção de Bactérias do Ácido Lático (BAL) autóctones de leite caprino com potencial probiótico e avaliação funcional em queijo caprino artesanal. 2015. 113 p. **Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) Universidade Federal do Vale do São Francisco**, Petrolina, 2015.
- ALVIM, L. B. Identificação molecular e seleção de bactérias lácticas com potencial probiótico isoladas de diferentes mucosas de suínos. **Dissertação (Mestrado em Biologia Geral) Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte. 2011.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DE BÚFALOS (ABCB). Dados de Produção 2011. Disponível em: <http://www.bufalo.com.br>. Acesso em: 10 de janeiro. 2019.
- AYENI, F. A.; SÁNCHEZ, B.; ADENIYI, B. A.; de LOS REYES-GAVILÁN, C.G.; MARGOLLES, A.; RUAS-MADIEDO, P. Evaluation of the functional potential of *Weissella* and *Lactobacillus* isolates obtained from Nigerian traditional fermented foods and cow's intestine. **International Journal of Food Microbiology**. 147: 97-104. 2011.
- BAUTISTA-GALLEGO, J.; ARROYO-LÓPEZ, F. N.; RANTSIOU, K.; JIMÉNEZ -DÍAZ R.; GARRIDO-FERNÁNDEZ, A.; COCOLIN, L. Screening of lactic acid bacteria isolated from fermented table olives with probiotic potential. **Food Research International** 50:135–142. 2013.
- BEI-ZHONG, H.; MENG, Y.; MIN, L.; YING-XIAO, Y.; REN, F. Z.; ZENG, Q. K.; NOUT, R. M. J. A survey on the microbiological and chemical composition of buffalo milk in China. **Food Control**, 18: 742-746. 2007.
- BERESFORD, T.P., FITZSIMONS, N.A., BRENNAN, N.L. AND COGAN, T.M. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal** 11(4): 259-274, 2001.
- BRASÍLIA (estado), Secretaria de Estado de Agricultura, Abastecimento e Desenvolvimento Rural DSAF/SDA/Seagri-DF, ofício nº 020/2016.
- CAVICCHIOLI, V.; CAMARGO, A. C; TODOROV, S. D.; JÚNIOR, A. S. ; NERO, L. A. Novel bacteriocinogenic *Enterococcus hirae* and *Pediococcus pentosaceus* strains with anti-listerial activity isolated from Brazilian artisanal cheese. **Journal of Dairy Science**. 100: 4. 2017.
- COELHO, C. V. L. Marcadores de enteropatogenicidade em amostras de *Escherichia coli* isoladas de crianças indígenas - etnia Guarani, Sul do estado do Rio de Janeiro apresentada. **Dissertação de mestrado. Escola Nacional de saúde Pública - ENPS/FIOCRUZ**. Fundação Oswaldo Cruz. 2013

- DAL BELLO, B.; COCOLIN, L.; ZEPPA, G.; DES FIELD, D.; COTTER, P.; HILL, C. Technological characterization of bacteriocin producing *Lactococcus lactis* strains employed to control *Listeria monocytogenes* in Cottage cheese. **International Journal of Food Microbiology** 153:58–65. 2012.
- DE LIMA, R. C. Atividade antagonista e perfil de resistência a antibióticos de bactérias ácido lácticas isoladas de frutas tropicais. **Dissertação Mestrado na Universidade Federal da Paraíba, Centro de Tecnologia Departamento de Engenharia de Alimentos**. 2016.
- DE MARTINIS, E. C. P.; ALVES V. F.; FRANCO, B. D. G. M. Bioconservação de alimentos: Aplicação de bactérias lácticas e suas bacteriocinas para a garantia da segurança microbiológica de alimentos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, 29:114-119. 2003.
- DE PALENCIA, F. P.; WERNING, M. L.; SIERRA-FILARDI, E.; DUENAS, M.T.; IRASTORZA, A.; CORBI, A.L. Probiotic properties of the 2-substituted (1,3)-D-glucan-producing bacterium *Pediococcus parvulus* 2.6. **Applied and Environmental Microbiology**, 75 (48): 87–4891. 2009.
- DEEGAN, L. C.; COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, P. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. **International Dairy Journal**, 16 (10): 58-1071. 2006.
- DOS SANTOS, K. M. O.; VIEIRA, A. D. S.; BURITI, F. C. A.; DE MELO FRANCO, B. D. G.; BRUNO, L. M.; BORGES, M. F.; TODOROV, S. D.; DO NASCIMENTO, J. C. F.; ROCHA, C. R. C.; DE MELO, M. E. S.; DE SOUZA LOPES A. C. Artisanal Coalho cheeses as source of beneficial *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* strains. **Dairy Sci. & Technol, INRA and Springer-Verlag France**, 95 (2): 209-230. 2014.
- EUROPEAN COMMISSION. Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA on the introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. **EFSA Journal**. 587:1-16. 2007.
- FACKLAM, R. R.; CARVALHO, M. G. S.; TEIXEIRA, L. M. History, Taxonomy, Biochemical Characteristics and Antibiotic Susceptibility Testing of Enterococci. In: GILMORE, M. S. (Ed.). The enterococci : pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance. Washington: **ASM Press**, p. 1-54. 2002.
- FERNANDES, M. L.; PERIN, L.M.; TODOROV, S. D.; NERO, L. A.; ALENCAR, E. R.; FERREIRA, M. A. *In vitro* evaluation of the safety and probiotic and technological potential of *Pediococcus pentosaceus* isolated from sheep milk : Avaliação *in vitro* do potencial de segurança, probiótico e tecnológico de *Pediococcus pentosaceus* isolado de leite de ovelhas. **Journal of Food Science**, 39(1):113. 2018.

- FERREIRA, A. A., Biodiversity of lactic acid bacteria and preserving by freeze and spray drying of *Lactobacillus plantarum* from Marajó cheese. 126 p. **Tese, Departamento de Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.** Viçosa, MG, 2016.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. WORLD HEALTH ORGANIZATION – FAO/WHO. Organization Guidelines for Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario, Canada, April 30 and May 1, 11 p. 2002.
- FOULQUIÉ MORENO, M. R.; SARANTINOPOULOS, P.; TSAKALIDOU, E.; DE VUYST, L. The role and application of enterococci in food and health. **International Journal of Food Microbiology**, 106(1): 1-24. 2006.
- FRANCIOSI, E.; SETTANNIA, L.; CAVAZZA, A.; POZNASKI, E. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. **International Dairy Journal** 199(1): 3-11. 2009.
- GALLE, S.; SCHWAB, C.; ARENDT, E.; GÄNZLE, M. Exopolysaccharide-forming *Weissella* strains as starter cultures for sorghum and wheat sourdoughs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 58(9): 5834– 5841. 2010.
- GÁLVEZ, A.; BENOMAR, N.; BAKALI, E. Genomic and proteomic analysis of probiotic lactic acid bacteria View project Food safety and control of infectious diseases with bacteriocins. **Frontiers in Microbiology**, 10:57. 2009.
- GAMA, B.A. Análise da resistência antimicrobiana e de genes de virulência de *Enterococcus spp.* **Dissertação de Mestrado em Ciências, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.** 73p, 2008.
- GUEDES NETO, L.G. Produção de queijo de coalho em Pernambuco isolamento e identificação de *Staphylococcus spp.* e de bactérias ácido lácticas e de sua atividade antagonista in vitro. 94f. **Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.** 2004.
- HASHMI, S.; SALEEM, Q. An investigation on microbiological and chemical quality of buffalo milk supplies. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences** 4:78–83. 2015.
- HÜHN, S.; LOURENÇO JUNIOR, J.B.; MOURA CARVALHO, L.O.D.; NASCIMENTO, C.N.B.; VIEIRA, L.C. Características, peculiaridades e tecnologia do leite de búfala. Belém: Embrapa CPATU, 51p. (Embrapa-CPATU. Documentos, 57). 1991.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Anuário Estatístico do Brasil, v. 77, 2017a. Disponível em: [https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/20/aeb\\_2017.pdf](https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/20/aeb_2017.pdf). Acesso em: 10 janeiro 2018.

- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da Pecuária Municipal em 2017b. Disponível em: [https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm\\_2017\\_v45\\_br\\_informativo.pdf](https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2017_v45_br_informativo.pdf). Acesso em: 10 janeiro 2019.
- INÊS, A.; TENREIRO, T.; TENREIRO, R.; MENDES-FAIA, A. Review: wine lactic acid bacteria - part I. **Ciência e Técnica Vitivinícola** 23:81-96. 2008.
- JYOTI, B. D.; SURESH, A. K.; & VENKATESH, K. V. Effect of preculturing conditions on growth of *Lactobacillus rhamnosus* on medium containing glucose and citrate. **Microbiological Research**, 159:35-42. 2004.
- KOCH, A. C. C. Características Físico-químicas e Microbiológicas do Leite de Ovelha e Atividade Antagonista de sua Microbiota Láctica. 2014. 93f. **Tese (Doutorado) Universidade de Brasília**. Brasília, 2014.
- MÜLLER, D.; GREUNE, L.; HEUSIPP, G.; KARCH, H.; FRUTH, A.; TSCHÄPE, H. SCHMIDT, A. Identification of Unconventional Intestinal Pathogenic *Escherichia coli* Isolates Expressing Intermediate Virulence Factor Profiles by Using a Novel Single-Step Multiplex PCR – **Applied and Environmental Microbiology**, 71(10):3380-3390. 2007.
- LEANDRO, E. dos S. Diversidade e resistência ao processo de liofilização de estirpes de *Lactococcus lactis* e ecossistema distintos. 72f **Tese (Doutorado) Universidade Federal de Viçosa**. Viçosa. MG, 2013.
- LEROY, F. e DE VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science & Technology** 15(2): 67-78. 2004.
- LIMA, E. .; FILHO, R. L.R A. ; OKAMOTO, A. S.; NOUJAIM, J. C.; BARROS, M. R.; CROCCI, A. J. Evaluation in vitro of the antagonistic substances produced by *Lactobacillus spp.* isolated from chickens. **Canadian Journal of Veterinary Research**, 71(2): 103–107. 2007.
- LIU, D.; LI, L.; YANG, X.; LIANG, S.; WANG, J. Survivability of *Lactobacillus rhamnosus* during th preparation of soy cheese. **Food Technology and Biotechnology**. 2006.
- MORA, D.; MUSACCHIO, F.; FORTINA, M. G.; SENINI, L.; MANACHINI, P. L. Autolytic activity and pediocin-induced lysis in *Pediococcus acidilactici* and *Pediococcus pentosaceus* strains. **Journal of Applied Microbiology**, London. 94(4): 561-570. 2003.
- MORAES, P. M.; PERIN, L. M.; ORTOLANI, M. B. T.; YAMAZI, A. K.; VIÇOSA, G. N.; NERO, L. A. Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potential. **LWT - Food Science and Technology**. 43: 1320-1324. 2010.
- MORANDI, S., BRASCA, M. e LODI, R. Technological, phenotypic and genotypic

- characterisation of wild lactic acid bacteria involved in the production of Bitto PDO Italian cheese. **Dairy Science & Technology** 91(3): 341-359, 2011.
- NDAGANO, D.; LAMOUREUX, T.; DORTU, C.; VANDERMOTEN, S.; THONART, P. Antifungal Activity of 2 Lactic Acid Bacteria of the *Weissella* Genus Isolated from Food. **Journal of Food Science**. 76(6):M305-11. 2011.
- OGAKI, M. B.; FURLANETO, M. C.; FURLANETO-MAIA, L. Aspectos gerais das bacteriocinas. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas. 18(4): 267-276. 2015.
- OLIVEIRA, J.; MALHERBI, N.; DA SILVA, V. G.; RAMOS, CARLOS, J. R. R.; DOS PASSOS, C. T. Biodiversidade de bactérias ácido lácticas isoladas de leite cru e investigação do seu potencial tecnológico. **Anais do V SEPE e V jornada de iniciação científica**, vol. V UFFS, 2015.
- ONO, H.; NISHIO, S.; TSURII, J.; KAWAMOTO, T.; SONOMOTO, K.; NAKAYAMA, J. Monitoring of the microbiota pro fi le in nukadoko , a naturally fermented rice bran bed for pickling vegetables. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 118:520– 525. 2014.
- ORTOLANI, M.B.T., YAMAZI, A.K., MORAES, P.M., VIÇOSA, G.N. and NERO, L.A. Microbiological quality and safety of raw milk and soft cheese and detection of autochthonous lactic acid bacteria with antagonistic activity against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., and *Staphylococcus aureus*. **Foodborne Pathogens and Disease**, 7: 175–180, 2010.
- OUOBA, L.I.I.; NYANGA-KOUMOU, C.A.G.; PARKOUDA, C.; SAWADOGO, H.; KOBAWILA, S.C.; KELEKE, S.; DIAWARA, B.; LOUEMBE, D.; SUTHERLAND, J.P. Genotypic diversity of lactic acid bacteria isolated from African traditional alkaline-fermented foods. **Journal of Applied Microbiology**, 108: 2019–2029. 2010.
- PATEL, A.; FALCK, P.; SHAH, N.; IMMERZEEL, P.; ADLERCREUTZ, P.; STÅLBRAND, H.; PRAJAPATI, J.B.; HOLST, O.; NORDBERG KARLSSON, E. Evidence for xylooligosaccharide utilization in *Weissella* strains isolated from Indian fermented foods and vegetables. **FEMS - Federation of European Microbiological Societies, Microbiology**. Lett. 346: 20– 28. 2013.
- PERIN, L. M., BELVISO, S., DAL BELLO, B., NERO, L. A., COCOLIN, L. Technological Properties and Biogenic Amines Production by Bacteriocinogenic Lactococci and Enterococci Strains Isolated from Raw Goat Milk, **Journal of Food Protection**, 80(1): 151–157. 2017.
- PERIN, L. M.; NERO, L. A. Antagonistic lactic acid bacteria isolated from goat milk and identification of a novel nisin variant *Lactococcus lactis*. **BMC Microbiology**, 14(1): 1–9. 2014.
- PICON, A., GARDE, S., ÁVILA, M. e NUÑEZ, M. 2015. Microbiota dynamics and lactic acid bacteria biodiversity in raw goat milk cheeses. **International Dairy Journal** 58: 14-22. 2015.

- PIGNATA, M. C.; FERNANDES, S. A. de A.; FERRÃO, S. P. B.; FALEIRO, A. S.; CONCEIÇÃO, D. G. Estudo comparativo da composição química, ácidos graxos e colesterol de leites de búfala e vaca. **Revista Caatinga**, 27(4): 226-233. 2014.
- PIMENTEL, J. W. Identificação dos Principais Pontos de Contaminação na Produção de Leite de Búfala e Implantação de Boas Práticas. 2016. 49 f. Trabalho de conclusão de curso (**Monografia**) – **Curso de Graduação em Medicina Veterinária, Universidade de Brasília**, Brasília, Distrito Federal. 2016.
- PIRAINO P., ZOTTA, T., RICCIARDI, A. MCSWEENEY P. L.H., PARENTE, E. Parentea Acid production, proteolysis, autolytic and inhibitory properties of lactic acid bacteria isolated from pasta filata cheeses: A multivariate screening study. **International Dairy Journal** 18:81–92. 2008.
- REN, D.; LI, C.; QIN, Y.; YIN, R.; DU, S.; YE, F.; LIU, C.; LIU, H.; WANG, M.; LI, Y.; SUN, Y.; LI, X.; TIAN, M.; JIN, N. In vitro evaluation of the probiotic and functional potential of Lactobacillus strains isolated from fermented food and human intestine. **Province for Zoonosis Prevention and Control, Institute of Military Veterinary, Academy of Military Medical Sciences** 10 p, República Popular da China, 2014.
- RIBEIRO, S.C., COELHO, M.C., TODOROV, S.D., FRANCO, B.D.G.M., DAPKEVICIUS, M.L.E. e SILVA, C.C.G. Technological properties of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from Pico cheese an artisanal cow's milk cheese. **Journal of Applied Microbiology** 116 (3): 573-585, 2013.
- SALVUCCI, E.; LEBLANC, J.; PEREZ, G. Technological properties of Lactic Acid Bacteria isolated from raw cereal material. **LWT - Food Science and Technology**. 70: 185-191.2016.
- SANTOS, C.; SANTOS, JR. J.; CUNHA, M.; NUNES, S.; BEZERRA, D; TORRES, JR. J.; CHAVES, N., Nível tecnológico e organizacional da cadeia produtiva da bubalinocultura de corte no estado do Maranhão. **Arquivos do Instituto Biológico**, 83:1-8. 2016.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R.; Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água. 4. Ed., São Paulo, Livraria Varela, Pg 105, 135-13. 2010.
- SIMPSON, G.G. Principles of Classification and a Classification of Mammals. 85: 339, 1945. Disponível em acesso em 10 de janeiro. 2019.
- SUMIT, A.; YOGESH, K. Cheese (Fourth edition) Chemistry, Physics and Microbiology. Buffalo Milk Cheese. Ed., Paul L.H. McSweeney, Patrick F. Fox, Paul D. Cotter, David W. Everett. **Academic Press**, Chapter 42, 1093-1101. 2017
- TODOROV, S. D.; FURTADO, D. N.; SAAD, S. M. I.; TOME, E.; FRANCO, B. D. G. M. Potential beneficial properties of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from

- smoked salmon. **Journal of Applied Microbiology**, London, 110(4): 971-986. 2011.
- TULINI, F. L.; HYMERY, N.; HAERTLÉ, T.; LE BLAY, G.; DE MARTINIS, E. C. 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. **The Journal of Dairy Research**, 83(1):115-24, 2015
- TSAKALIDOU, E.; PAPANIKOLAOU, K. Non-bovine milk and milk products. Elsevier Inc. **Academic press**. 2016.
- UNIPROT, Disponível em: <http://www.uniprot.org/taxonomy/186826>>. Acesso em: 27 jan. 2019.
- VIEIRA, J.N.; TEIXEIRA, C. S.; KUABARA, M. Y.; OLIVEIRA, D. A. A. Bubalinocultura no Brasil: Short communication. **PUBVET – Publicações em Medicina Veterinária**, Londrina, 5(2)149: 1003, 2011.
- WEHR, H.M., & FRANK, J. F. (Eds.) Standard Methods for the Examination of Dairy Products. 17<sup>th</sup> ed. **American Public Health Association.**, Washington, DC. 2001-3710. 2004.

## ANEXO

**Quadro 2.** Desenvolvimento dos 28 isolados de BALs nas concentrações de pH 1, 2, 3, 7, 8 e 12 ordenados na tabela conforme agrupamento por similaridade:

	pH 1			pH 2			pH 3			pH 7			pH 8			pH 12		
	1h	6h	13h	1h	6h	13h	1h	6h	13h	1h	6h	13h	1h	6h	13h	1h	6h	13h
<b>27JL</b>	0	0	0	0	0	0	0,1	0,1	0,2	0	0,1	0	0	0	-0,1	-0,1	-0,1	0
<b>28JL</b>	0	0	0	0	0	0	0,1	0,2	0,2	0	-0,1	-0,2	0,1	-0,1	-0,1	0,1	0,1	0,2
<b>32JL</b>	0	0	0	0	0	0	0	0,1	0	0	-0,2	-0,1	0,1	-0,2	-0,1	0	0,1	0
<b>51JL</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-0,2	-0,2	0	-0,2	-0,1	0	0	0
<b>64JL</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1	0	-0,2	-0,2	0	-0,2	-0,2	0	0,1	0
<b>55JL</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-0,2	-0,2	0	-0,2	-0,1	0	0	0
<b>24JL</b>	0,1	0,1	0	0	0	0	0,1	0,2	0,2	0,1	-0,1	-0,2	0,1	0	-0,1	0,1	0,2	0,3
<b>25JL</b>	0	0	0	0	0	0	0,1	0,5	0,6	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,4
<b>26JL</b>	0,1	0,1	0,1	0,1	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-0,2	-0,2	0,1	-0,2	-0,1	0,1	0	0
<b>59JL</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0,2	0	-0,2	-0,1	0	-0,2	-0,1	0	0	0,1
<b>68JL</b>	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-0,1	-0,2	0,1	-0,1	-0,2	0,1	0,2	0,1
<b>82JL</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-0,2	-0,2	0	-0,2	-0,2	0	0	0
<b>103JL</b>	0,1	0,4	0,4	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,4	0,1	0,3	0,6
<b>105JL</b>	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0	-0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,5
<b>111JL</b>	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,3	0,5	0,1	0,4	0,6

<b>121JL</b>	0,1	0,1	0,1	0	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-0,1	-0,2	0,1	0	-0,1	0,1	0,2	0,2
<b>16JL</b>	0	0	0	0	0	0	0	0,1	0	0	-0,2	-0,2	0	-0,2	-0,1	0	0	0,1
<b>46JL</b>	0	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	-0,2	-0,1	0	-0,2	-0,1	0	0	0
<b>113JL</b>	0,1	0,1	0,1	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	-0,1	0,2	0,3	0,3	0,1	0,5	0,5
<b>164JL</b>	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0	-0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,6	0,6
<b>165JL</b>	0,1	0	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,3	0,1	0,3	0,3	0,1	0,2	0,2	0,1	0,7	0,9
<b>136JL</b>	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,4	0,5	0,1	0,5	0,5
<b>140JL</b>	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,3	0,2	0,4	0,4	0,1	0,4	0,3
<b>147JL</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-0,1	-0,2	0	-0,1	0	0	0	0
<b>153JL</b>	0,1	0,3	0,5	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	-0,1	0,2	0,5	0,5	0,2	0,7	0,8
<b>119JL</b>	0,1	0,4	0,6	0,1	0,4	0,6	0,1	0,6	0,7	0,2	0,3	0,4	0,2	0,4	0,6	0,2	0,6	0,7
<b>123JL</b>	0,1	0,1	0,1	0	0,1	0,1	0,2	0,6	0,6	0,3	0,7	0,5	0,1	0,5	0,5	0,2	0,8	0,9
<b>84JL</b>	0,1	0,5	0,4	0,1	0,5	0,6	0,1	0,3	0,3	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,3	0,2	0,5	0,7

**Quadro 3.** Desenvolvimento dos 28 isolados de BALs nas concentrações de bile 0.2, 0.3, 0.5, 1, 1.5 e 2% ordenados na tabela conforme agrupamento por similaridade:

	Bile 0.2%			Bile 0.3%			Bile 0.5%			Bile 1%			Bile 1.5%			Bile 2%		
	1h	6h	13h	1h	6h	13h	1h	6h	13h	1h	6h	13h	1h	6h	13h	1h	6h	13h
<b>27JL</b>	0	0	0	-0,1	-0,1	-0,1	-0,2	-0,2	-0,2	-0,2	-0,2	-0,2	0	-0,1	-0,1	0	0	-0,2
<b>28JL</b>	0,1	0,5	0,4	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0	0,2	0	0	0,4	0,3	0,3
<b>32JL</b>	0	0,3	0,3	0,1	0	0,2	-0,1	-0,1	-0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	0,3	0,3
<b>51JL</b>	0,1	0,6	0,5	0,2	0,3	0,4	0	0	0	-0,1	-0,1	-0,1	0,1	0,1	0,1	-0,1	0,2	0,2
<b>64JL</b>	0,2	0,5	0,3	0,1	0,2	0,2	-0,1	-0,1	-0,1	-0,1	-0,1	-0,1	0	0	0	-0,3	-0,2	-0,2
<b>55JL</b>	0,1	0,3	0,1	0,2	0,1	0,2	-0,1	-0,1	-0,1	-0,2	-0,2	-0,2	0,1	0,1	0,1	-0,1	0,2	0,2
<b>24JL</b>	0,3	0,6	0,5	0,3	0,4	0,2	0	0	0,1	-0,1	-0,1	-0,1	0,1	0,1	0,1	0,4	0,3	0,3
<b>25JL</b>	0,4	0,6	0,4	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	-0,1	-0,1	-0,3	0,2	0,1	0,2	0,3	0,2	0,2
<b>26JL</b>	0,1	0,4	0,3	0,1	0	0,1	0	0,2	0,1	0	0	0	0	0	0	0,3	0,3	0,3
<b>59JL</b>	0,1	0,4	0,3	0,2	0,2	0,3	-0,4	-0,4	-0,4	-0,1	-0,1	-0,1	0,1	0	0	0,1	0	0
<b>68JL</b>	0,2	0,3	0,2	0,2	0	0	0	-0,1	-0,1	0	0	0	0,1	0	-0,1	0,4	0,7	0,9
<b>82JL</b>	0,3	0,4	0,4	0,2	0,1	0,2	0	0	0	-0,1	-0,1	-0,1	0,2	0	0,2	-0,1	-0,3	-0,3
<b>103JL</b>	0,2	0,4	0,3	0,1	0,1	0,2	0	0,1	0,1	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,7	0,9
<b>105JL</b>	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,3	0,3	0,1	0,1	0,3	0,6	0,7

<b>111JL</b>	0,1	0,1	-0,2	0,1	0,3	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	0,7	0,9	1
<b>121JL</b>	0,1	0,2	-0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,4	0,4	0,4	0,3	0,3	0,3	0,5	0,6	0,7
<b>16JL</b>	0,3	0,6	0,5	0,2	0,2	0	0,2	0,2	0,5	0	0	-0,1	0,2	0,1	0	0,4	0,3	0,3
<b>46JL</b>	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,3	0,2
<b>113JL</b>	0	0,1	-0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,6	0,8
<b>164JL</b>	0	0,2	0,1	0	-0,1	0	0	0	0	0,3	0,3	0,3	0,2	0,2	0,1	-0,1	0	0
<b>165JL</b>	-0,1	0,2	0,1	0,1	-0,2	-0,2	0,1	0,1	0,1	0,3	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	0,5
<b>136JL</b>	-0,1	0,1	0,1	0	-0,1	-0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,3	0,3	0,1	0,1	0,1	-0,1	0	0
<b>140JL</b>	-0,1	0,1	-0,1	-0,1	-0,1	-0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	-0,1	0,1	0,1
<b>147JL</b>	0	0,1	-0,2	0,1	0,1	0	-0,1	-0,1	-0,1	0,3	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	0,4	0,7	0,8
<b>153JL</b>	0	0,1	-0,1	-0,1	-0,2	-0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	-0,1	0	0
<b>119JL</b>	0,1	0,2	-0,1	0,2	0	-0,1	0,1	0,1	0	0,3	0,3	0,3	0,4	0,3	0,2	0,6	0,8	0,9
<b>123JL</b>	0	0,1	-0,1	0	-0,1	-0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	-0,1	-0,1
<b>84JL</b>	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,5	0,6	0,5