



**AVALIAÇÃO DE METODOLOGIAS DE CONTAGENS SELETIVAS PARA *Bifidobacterium sp* e *Lactobacillus acidophilus***

Nathália Motta **Fernandes**<sup>1</sup>; Fabiana Kátia Helena de Souza **Trento**<sup>2</sup>; Mariana Alves **Gragani**<sup>3</sup>;  
Thais **Marini**<sup>4</sup>; Adriana Torres Silva e **Alves**<sup>5</sup>

**Nº 16215**

**RESUMO** – Os probióticos são suplementos alimentares vivos que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde dos consumidores, ajudando a manter o equilíbrio da microbiota intestinal. Esses microrganismos são utilizados em diversos produtos do setor alimentício. Dentre as bactérias probióticas mais utilizadas estão as do gênero *Bifidobacterium sp* e *Lactobacillus acidophilus*. Este trabalho teve o intuito de determinar quais as metodologias e condições mais adequadas para contagem de *Bifidobacterium sp* e *Lactobacillus acidophilus* puras e combinadas em um produto comercial. Os meios utilizados para a contagem das culturas puras foram Ágar-MRS, MRS-LP, MRS com Dicloxacilina, Ágar-TOS e MRS com clindamicina, sendo incubados à 37±1°C por 72 horas em anaerobiose. Neste trabalho comprovou-se a seletividade e adequada recuperação celular dos meios MRS-LP, MRS-Dicloxacilina e Ágar-TOS para contagem de *Bifidobacterium sp* e de MRS-clindamicina para *Lactobacillus acidophilus*, quando aplicados em culturas puras destes microrganismos e também combinadas em um produto comercial.

**Palavras-chaves:** Bactéria láctica, próbiotico, contagem seletiva, *Bifidobacterium sp*, *Lactobacillus acidophilus*.

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Ciências Biológicas, PUC, Campinas-SP nathalia-motta@hotmail.com

2 Co-orientador, Assistente de Pesquisa, ITAL/TECNOLAT, Campinas-SP

3 Colaborador: Técnica de Apoio, ITAL/TECNOLAT, Campinas-SP.

4 Colaborador, Assistente de Pesquisa, ITAL/TECNOLAT, Campinas-SP.

5 Orientador: Pesquisador do Instituto de Tecnologia de Alimentos; atorres@ital.sp.gov.br.



**ABSTRACT** – *Probiotics are live food supplements which, when administered in adequate quantity, provide health benefits to consumers helping to maintain the balance of intestinal micro-flora. These microorganisms are used in a variety of products in the food industry. Among the most used probiotic bacteria are genera Bifidobacterium sp and Lactobacillus acidophilus. This study aimed to determine what are the most appropriate methodologies and conditions for the counting of Bifidobacterium sp and Lactobacillus acidophilus - pure and combined into a commercial product. The mediums used to count pure cultures were MRS-agar, MRS-LP, MRS with Dicloxacillin, and TOS Propionate Agar, incubated at 37°C for 72 hours anaerobically. This study proved the selectivity and adequate cell recovery in MRS- LP, MRS with dicloxacillin and TOS Propionate agar medium for the counting of Bifidobacterium sp and MRS-clindamycin for the counting of Lactobacillus acidophilus, when applied in pure culture of these microorganisms and also combined into a commercial product. This study proved the selectivity and adequate cell recovery in MRS- LP, MRS with dicloxacillin and TOS Propionate agar medium for the counting of Bifidobacterium sp and MRS-clindamycin for the counting of Lactobacillus acidophilus, when applied in pure culture of these microorganisms and also combined into a commercial product.*

**Keywords:** Lactic Bacteria, Probiotic, selective counting, *Bifidobacterium sp*, *Lactobacillus acidophilus*.

## **1 INTRODUÇÃO**

Os probióticos são definidos pela Organização Mundial da Saúde (FAO, WHO, 2002), como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas conferem um benefício à saúde do hospedeiro. São suplementos alimentares vivos que conferem benefícios à saúde dos consumidores, contribuindo para o equilíbrio da microbiota intestinal. Devido aos benefícios para a saúde, eles estão cada vez mais sendo incluídos no setor alimentício, principalmente nos laticínios, como iogurtes, leites fermentados e queijos (SAARELA et.al, 2000). Dentre os grupos de bactérias probióticas mais importantes estão as Bifidobactérias e os *Lactobacillus acidophilus*.



**10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2016**  
**02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo**  
**ISBN 978-85-7029-135-6**

Um parâmetro importante no desenvolvimento de produtos contendo probióticos e nos programas de qualidade assegurada das indústrias de alimentos e institutos de pesquisa é a capacidade de quantificar e diferenciar as células viáveis destes organismos (SHA, 2000). Adicionalmente, tais produtos devem atender a padrões de legislação, os quais estabelecem contagens mínimas de células viáveis que precisam ser determinadas (ANVISA, 2015).

A sobrevivência das bactérias probióticas no produto alimentício é fundamental, necessitando alcançar populações suficientemente elevadas (tipicamente acima de  $10^6$  UFC/ml ou g) para ser de importância fisiológica ao consumidor (JELEN, 1998). Entretanto, vários autores propõem que a dose mínima diária da cultura probiótica considerada terapêutica seja de  $10^8$  e  $10^9$  UFC (LEE, 1995; BLANCHETTE et al., 1996; HOIER et al., 1999).

Há necessidade de métodos simples e confiáveis para enumeração de rotina dos probióticos, como o *Bifidobacterium* sp. e o *L. acidophilus*, e dos micro-organismos dos fermentos tradicionais. Estas quantificações são importantes para determinar as contagens iniciais de bactérias probióticas após a fabricação do produto, para verificar a viabilidade destas células durante a estocagem refrigerada e, também, no produto na cadeia de distribuição. Além disso, esses métodos devem garantir uma boa recuperação celular para os microrganismos (VINDEROLA et al., 2000, ZACARCHENCO et al., 2012).

Diversos meios para enumeração de micro-organismos probióticos têm sido propostos, porém a maioria é baseada em culturas puras desses microrganismos. A enumeração de uma única cepa usando um meio seletivo é facilmente realizada. Entretanto, os probióticos são frequentemente incorporados em alimentos em combinação com outras bactérias lácticas, o que cria um desafio na enumeração específica dos microrganismos por métodos tradicionais (ZACARCHENCO, et al. 2012).

Assim este trabalho teve o intuito de determinar quais as metodologias e condições mais adequadas para contagem de *Bifidobacterium* sp e *Lactobacillus acidophilus* puras e combinadas em um produto comercial.

## **2 MATERIAL E METODOS**

Inicialmente foi feita a contagem individualmente de culturas puras de *Bifidobacterium* sp e *Lactobacillus acidophilus* em todos os meios citados abaixo. Foram empregadas as culturas *Bifidobacterium animalis* (BB12) e *Lactobacillus acidophilus* (La5) da empresa Chr. Hansen nesta



**10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2016**  
**02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo**  
**ISBN 978-85-7029-135-6**

etapa do trabalho. Já o produto comercial empregado continha culturas combinadas de *Lactobacillus acidophilus* ATCC SD5221, *Bifidobacterium lactis* HN019 e maltodextrina.

A seguir estão relacionados os métodos e condições utilizados neste trabalho:

1) MRS com dicloxacilina: Ágar de Man, Rogosa & Sharpe (MRS) (Difco) pH 6,5 suplementado com 5mL de uma solução de Dicloxacilina (Sigma), 10 mL de uma solução de Cloreto de Lítio (Vetec) e 5 mL da solução de L-cisteína (Inlab) por litro de meio, a serem adicionados ao meio no momento do uso (GROSSO; FÁVARO-TRINDADE, 2004).

2) MRS-LP: Ágar de Man, Rogosa & Sharpe (MRS) (Difco) pH 6,5 suplementado com 0,2% de Cloreto de Lítio (Vetec), 0,3% de Propionato de Sódio (Sigma) e 0,5% de L-cisteína (Inlab) (apenas a solução de L-cisteína deve ser adicionada no momento do uso) (VINDEROLA; REINHEIMER, 2000).

3) Agar TOS: TOS-Propionate (Merck) suplementado com Lithium Mupirocin (Sigma) (IDF, 2007).

4) MRS-Clindamicina: Ágar de Man, Rogosa & Sharpe (MRS) pH 6,5 suplementado com 0,5mL da solução de Clindamicina para cada litro de meio, a ser adicionado ao meio no momento do uso (CASTEELE, 2005).

Coloração de Gram e Teste de catalase: após o procedimento de contagem, colônias desenvolvidas, em cada meio de cultura, foram isoladas e caracterizadas quanto à morfologia e reação de Gram. Ambas as metodologias são descritas em Harrigan (1998).

As culturas puras de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium* sp foram enumeradas nos diferentes meios após um período de incubação a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  por 72 horas em condições de anaerobiose (VINDEROLA et al., 2002; GROSSO; FÁVARO-TRINDADE, 2004; HARRIGAN, 1998).

No produto comercial, os meios de cultura utilizados para a contagem de *Lactobacillus acidophilus* foram incubados em aerobiose a fim de excluir o desenvolvimento das bifidobactérias presentes na amostra.

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A Tabela 1 apresenta as contagens das culturas probióticas puras nos diferentes meios de cultura e a Tabelas 2 as contagens das culturas probióticas no produto comercial avaliado.



**Tabela 1.** Quantificação total das culturas puras de *Bifidobacterium* sp e *Lactobacillus acidophilus* (UFC/ g e Log UFC.g<sup>-1</sup>) nos diferentes meios de cultura utilizados.

Meios de cultura	Quantificação total (UFC/ g) <sup>a</sup>			
	<i>Bifidobacterium</i> sp		<i>Lactobacillus acidophilus</i>	
	UFC/ g <sup>b</sup>	Log UFC/ g <sup>b</sup>	UFC/ g <sup>b</sup>	Log UFC/ g <sup>b</sup>
Ágar MRS	4,5 x 10 <sup>11</sup>	11,65	4,1 x 10 <sup>9</sup>	9,61
Ágar MRS-LP	6,7 x 10 <sup>11</sup>	11,82	< 1 <sup>c</sup>	< 1 <sup>c</sup>
Ágar MRS com dicloxacilina	6,7 x 10 <sup>11</sup>	11,82	< 1 <sup>c</sup>	< 1 <sup>c</sup>
Ágar TOS+ mupirocina	6,2 x 10 <sup>11</sup>	11,79	< 1 <sup>c</sup>	< 1 <sup>c</sup>
Ágar MRS + clindamicina	< 1 <sup>c</sup>	< 1 <sup>c</sup>	5,8 x 10 <sup>9</sup>	9,77

<sup>a</sup> UFC/ g – Unidade Formadora de Colônia por grama da cultura

<sup>b</sup> Valores médios das contagens em duplicata

<sup>c</sup> Valor estimado, abaixo do limite de detecção do método.

**Tabela 2.** Quantificação total (UFC/ g e Log UFC.g<sup>-1</sup>) nos diferentes meios de cultura utilizados em uma amostra de produto comercial contendo os probióticos.

Meios de cultura	Quantificação total (UFC/ g) <sup>a</sup>		Morfologia celular e coloração de Gram	Teste de catalase
	UFC/ g <sup>b</sup>	Log UFC/ g <sup>b</sup>		
Ágar MRS	1,9 x 10 <sup>10</sup>	10,28	Bastonetes longos G+ e bastonetes curtos, curvados e com arranjo típico para bifidobactérias G+	Negativa
Ágar MRS-LP	6,4 x 10 <sup>9</sup>	9,81	Bastonetes curtos, curvados e com arranjo típico para bifidobactérias G+	Negativa
Ágar MRS com dicloxacilina	8,6 x 10 <sup>9</sup>	9,94	Bastonetes curtos, curvados e com arranjo típico para bifidobactérias G+	Negativa
Ágar TOS+ mupirocina	8,5 x 10 <sup>9</sup>	9,93	Bastonetes curtos, curvados e com arranjo típico para bifidobactérias G+	Negativa
Ágar MRS + clindamicina	7,1 x 10 <sup>9</sup>	9,85	Bastonetes longos G+	Negativa

<sup>a</sup> UFC/ g - Unidade Formadora de Colônia por grama da cultura

<sup>b</sup> Valores médios das contagens em duplicata

G+: Gram positivos



**10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2016**  
**02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo**  
**ISBN 978-85-7029-135-6**

O ágar MRS é um meio de cultura utilizado na contagem geral de bactérias lácticas. Os meios Ágar MRS-LP, Ágar MRS com dicloxacilina e Ágar TOS adicionado de mupirocina são específicos para contagem de *Bifidobacterium* sp e o Ágar MRS suplementado de clindamicina é utilizado para a quantificação seletiva de *Lactobacillus acidophilus*.

Quando avaliada isoladamente, a cultura de *Bifidobacterium* BB12 variou entre  $4,5 \times 10^{11}$  e  $6,7 \times 10^{11}$  UFC/ g (11,65 e 11,82 logUFC/ g, respectivamente), mostrando eficiência de todos os meios aplicados. Estes resultados demonstram que, para a contagem de culturas puras de bifidobactérias, é possível escolher entre os meio avaliados, levando em consideração o custo de cada um deles. Ou seja, pode-se utilizar o MRS puro pois não contém inibidores e antibióticos, reduzindo o valor da análise.

Já a cultura pura de *Lactobacillus acidophilus* La5, não cresceu nos meios Ágar MRS-LP, Ágar MRS com dicloxacilina e Ágar TOS+ mupirocina, confirmando a seletividade destes meios para *Bifidobacterium* sp. Esta cultura cresceu no Ágar MRS e também no Ágar adicionado de Clindamicina. Este resultado demonstra que o último meio é apropriado para a quantificação dos *Lactobacillus acidophilus*.

Com relação ao produto comercial contendo os dois grupos de microrganismos, as contagens variaram de  $6,4 \times 10^9$  UFC/ g no ágar MRS-LP a  $1,9 \times 10^{10}$  UFC/g no ágar MRS puro. Após a quantificação dos microrganismos, 10 colônias de cada meio de cultura foram isoladas e caracterizadas quanto a sua morfologia, reação ao teste de Gram e catalase.

Os testes confirmaram características morfológicas e fisiológicas apresentadas por culturas pertencentes ao gênero *Bifidobacterium* sp e pela cultura de *Lactobacillus acidophilus*. As duas culturas são Gram positivas, a catalase é negativa, a morfologia de *Bifidobacterium* sp é bastonetes curtos, curvados e com arranjo típico para bifidobactérias e de *Lactobacillus acidophilus* são bastonetes mais longos.

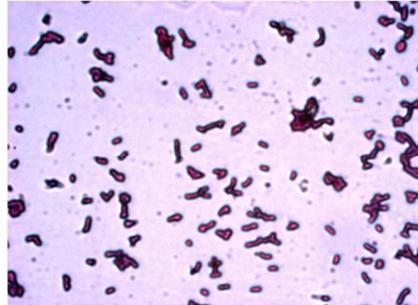
Os resultados obtidos são semelhantes aos observados no trabalho de Castele et al (2006). Neste artigo, os autores demonstram que o meio MRS adicionado de clindamicina foi seletivo para *Lactobacillus acidophilus* (*Lactobacillus acidophilus* LMG 9433, *Lactobacillus acidophilus* LMG 11430, *Lactobacillus acidophilus* La-145 e *Lactobacillus acidophilus* Lafti L10) e inibiu o desenvolvimento de todas as cepas de *Bifidobacterium* testadas (*B. animalis* subsp. *lactis* LMG 18314, *B. animalis* subsp. *lactis* LMG 11580, *B. animalis* subsp. *lactis* B-420, *B. animalis* subsp. *lactis* BL e *B. animalis* subsp. *lactis* Lafti B94).

Além do MRS com clindamicina, os autores também testaram o MRS suplementado com cloreto de Lítio, e propionato de Sódio e L-cisteína. Neste meio, todas as cepas de bifidobactérias apresentaram crescimento e, em contra partida, os *Lactobacillus acidophilus* foram todos inibidos quando inoculados no MRS-LP (CASTEELE et al, 2006).

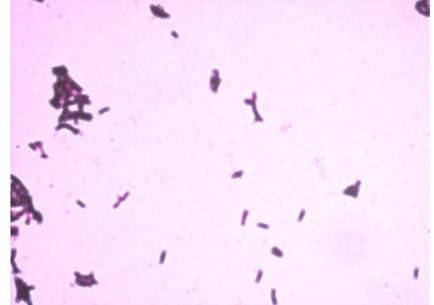
A seguir são apresentadas as imagens obtidas em microscópio com aumento de 1000 x, a partir das colônias isoladas em cada um dos meios de cultura aplicados (Figuras 1 a 5):



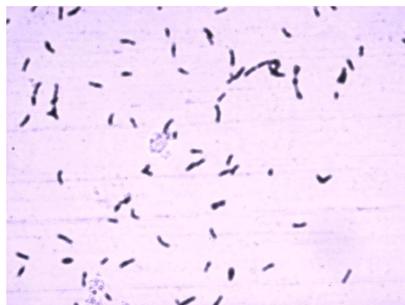
**Figura 1.** Morfologia de colônia isolada a partir de Ágar MRS



**Figura 2.** Morfologia de colônia isolada a partir de Ágar MRS-LP



**Figura 3.** Morfologia de colônia isolada a partir de Ágar MRS com dicloxacilina



**Figura 4.** Morfologia de colônia isolada a partir de Ágar TOS+ mupirocina



**Figura 5.** Morfologia de colônia isolada a partir de Ágar MRS com clindamicina

#### **4 CONCLUSÃO**

Após a realização deste trabalho, conclui-se que (i) para culturas puras de probióticos pode-se utilizar um meio mais geral para a sua quantificação (MRS puro); (ii) os meios MRS-LP, MRS com dicloxacilina, L-cisteína e cloreto de lítio e o Ágar TOS com mupirocina são eficazes de forma semelhante quando utilizados na quantificação de *Bifidobacterium* sp e seletivos para este grupo de microrganismos; (iii) O Ágar MRS adicionado de Clindamicina mostrou-se seletivo para a



**10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2016**  
**02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo**  
**ISBN 978-85-7029-135-6**

contagem de *Lactobacillus acidophilus*. Finalmente, conclui-se que, para produtos contendo as duas cepas estudadas (*Lactobacillus acidophilus* ATCC SD5221 e *Bifidobacterium lactis* HN019) há a necessidade da utilização dos meios seletivos e que a incubação sob aerobiose do meio específico para os *Lactobacillus acidophilus*, foi importante na quantificação diferenciada dos dois gêneros de probióticos avaliados.

## **5 AGRADECIMENTOS**

Ao CNPQ – PIBIC pelos recursos financeiros concedidos e ao TECNOLAT/ITAL pela oportunidade de estágio.

## **6 REFERÊNCIAS**

- ANVISA. Missões Tecno científicas de Acessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. Alimentos com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos: lista das alegações aprovadas. 2015. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm). Acesso em: 20/05/2016.
- BLANCHETTE L, ROY D, BELANGER G, GAUTHIER SF. Production of cottage cheese using dressing fermented by bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*, v. 79, p. 8-15, 1996.
- CASTEELE, S. V.; VANHEUVERZWIJN, T.; RUYSSSEN, T.; VAN ASSCHE, P.; SWINGS, J.; HUYS, G. Evaluation of culture media for selective enumeration of probiotic strains of lactobacilli and bifidobacteria in combination with yoghurt or cheese starters. *International Dairy Journal*, v. 16, p. 1470-1476, 2006.
- FAO/WHO. *Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*. Ontario, Canada, 2002.
- GROSSO, C. R. F.; FÁVARO-TRINDADE, C. Stability of free and immobilized *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in acidified milk and of immobilized *B. lactis* in yoghurt. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 35, p. 151-156, 2004.
- HOIER E, JANZEN T, HENRIKSEN CM, RATTRAY F, BROCKMANN E, JOHANSEN E. The production, application and action of lactic cheese starter cultures. In: Law BA, ed. *Technology of cheesemaking*. ed. CRC Press: Boca Raton, 1999.
- JELEN P, LUTZ S. Functional milk and dairy products. In: MAZZA, G., ed. *Functional foods: biochemical and processing aspects*. ed. Technomic Publishing Company, Inc.: Lancaster, USA, 1998.
- HARRIGAN, W.F. *Laboratory methods in food microbiology*. Academic Press, San Diego, 1998.
- LEE YK, SALMINEN S. The coming age of probiotics. *Trends Food Science and Technology*. V. 6, p. 241-242, 1995.
- SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MÄTTÖ, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*. v. 84, p. 197-215, 2000.
- SHAH N. P. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Science*, v. 83, n. 4, p. 894-907, 2000.



**10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2016**  
**02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo**  
**ISBN 978-85-7029-135-6**

VINDEROLA, C.C.; REINHEIMER, J.A. Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. *International Dairy Journal*, v. 10, p. 271-275. 2000.

ZACARCHENCO, P.B.; TRENTO, F. K.H.S.; SPADOTI, L. M.; GALLINA, D. A.; SILVA E ALVES, A. T.; MEDEIROS, M. I.M. A quantificação seletiva de fermentos lácticos e probióticos em produtos lácteos. *Revista Indústria de Laticínios*, n. 97, p. 58-63, 2012.