

SAÚDE E AMBIENTE

V.9 • N.3 • 2024 - Fluxo Contínuo

ISSN Digital: 2316-3798

ISSN Impresso: 2316-3313

DOI: 10.17564/2316-3798.2024v9n3p791-802



MEIO DE CULTURA MODIFICADO PARA ENUMERAÇÃO DE *LACTICASEIBACILLUS* *RHAMNOSUS*GG EM AMOSTRAS FECAIS DE RATOS WISTAR

MODIFIED CULTURE MEDIUM FOR ENUMERATION OF
*LACTICASEIBACILLUS RHAMNOSUS*GG IN FECAL SAMPLES
FROM WISTAR RATS

MEDIO DE CULTIVO MODIFICADO PARA EL CONTEO DE
*LACTICASEIBACILLUS RHAMNOSUS*GG EN MUESTRAS
FECALES DE RATAS WISTAR

Renata Cristina de Almeida Bianchini Campos¹

Carlos Eduardo Luna²

André Narvaes da Rocha Campos³

Maria do Carmo Gouveia Peluzio⁴

Eliane Maurício Furtado Martins⁵

Maurilio Lopes Martins⁶

RESUMO

A contagem de probióticos nas fezes mostra-se eficiente para avaliar a resistência dos microrganismos ao trato gastrointestinal. Técnicas de plaqueamento em meios seletivos favorecem a identificação e quantificação das bactérias por plaqueamento tradicional. O ágar MRS com vancomicina e verde de bromocresol (LAMVAB) é um meio de cultura seletivo para o isolamento de lactobacilos em fezes, porém, algumas espécies de cocos e as leveduras não estão incluídas em seu espectro de inibição. Por outro lado, fluconazol é um antifúngico com amplo espectro de ação. Assim, objetivou-se desenvolver meio de cultura LAMVAB modificado pela adição de fluconazol a fim de aumentar a seletividade do mesmo e eliminar a interferência na quantificação de *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG em ensaios *in vivo* com ratos Wistar. *L. rhamnosus* GG foi adicionado ao suco de abacaxi com juçara que foi mantido a 8 °C por 28 dias. O estudo *in vivo* foi conduzido com 2 grupos experimentais de ratos agrupados em dieta basal (G1) e dieta basal e 1,0 mL/dia de suco probiótico (G2). Os grupos foram avaliados quanto à quantificação de *L. rhamnosus* GG em amostras fecais. Colônias típicas de *L. rhamnosus* GG em ágar LAMVAB modificado se apresentaram cremosas, regulares e levemente amareladas. Durante a cultura das fezes em meio LAMVAB, colônias de leveduras foram isoladas, apresentando-se morfológicamente semelhantes às colônias de lactobacilos, prejudicando a quantificação e diferenciação da bactéria probiótica em estudo. A adição de 20 mg/L de fluconazol ao meio de cultura aumentou sua seletividade, eliminando a interferência na análise. A escolha deste antifúngico se deve ao seu excelente espectro de ação em relação à espécie *Candida* sp. A contagem do probiótico nas amostras fecais apresentou

média de 5,7 Log de UFC/g de fezes. Portanto, os resultados sugerem que o meio LAMVAB modificado desenvolvido é seletivo e eficiente na caracterização de *L. rhamnosus* GG em amostras fecais.

PALAVRAS-CHAVE

Contagem. Probiótico. Resistência gastrointestinal.

ABSTRACT

Counting probiotics in feces is efficient for evaluating the resistance of microorganisms to the gastrointestinal tract. Plating techniques on selective media favoring the identification and quantification of bacteria by traditional plating. MRS agar with vancomycin and bromocresol green (LAMVAB) is a selective culture medium for the isolation of lactobacilli in feces, however, some cocci species and varieties are not included in its restriction spectrum. On the other hand, fluconazole is an antifungal with a broad spectrum of action. Thus, the objective was to develop LAMVAB culture medium modified by the addition of fluconazole in order to increase its selectivity and eliminate interference in the quantification of *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG in in vivo assays with Wistar rats. *L. rhamnosus* GG was added to pineapple and juçara juice that was kept at 8 °C for 28 days. The in vivo study was conducted with 2 experimental groups of rats grouped on a basal diet (G1) and a basal diet and 1.0 mL/day of probiotic juice (G2). The groups were evaluated regarding the quantification of *L. rhamnosus* GG in fecal samples. Typical *L. rhamnosus* GG colonies on modified LAMVAB agar are creamy, regular, and slightly yellowish. During the culture of feces in LAMVAB medium, yeast colonies were isolated, appearing morphologically similar to lactobacilli colonies, impairing the quantification and differentiation of the probiotic bacteria under study. The addition of 20 mg/L of fluconazole to the culture medium increased its selectivity, eliminating interference in the analysis. The choice of this antifungal is due to its excellent spectrum of action in relation to the *Candida* sp species. The probiotic count in fecal samples showed an average of 5.7 Log CFU/g of feces. Therefore, the results suggest that the developed modified LAMVAB medium is selective and efficient in characterizing *L. rhamnosus* GG in fecal samples.

KEYWORDS

Count; Probiotic; Gastrointestinal Resistance.

RESUMEN

El recuento de probióticos en las heces es eficaz para evaluar la resistencia de los microorganismos al tracto gastrointestinal. Técnicas de recubrimiento en medios selectivos que favorecen la identificación y cuantificación de bacterias mediante recubrimiento tradicional. El agar MRS con vancomicina y verde de bromocresol (LAMVAB) es un medio de cultivo selectivo para el aislamiento de lactobacilos en heces, sin embargo, algunas especies y variedades de cocos no están incluidas en su espectro de restricción. Por otro lado, el fluconazol es un antifúngico de amplio espectro de acción. Así, el objetivo fue desarrollar medio de cultivo LAMVAB modificado mediante la adición de fluconazol con el fin de aumentar su selectividad y eliminar interferencias en la cuantificación de *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG en ensayos in vivo con ratas Wistar. Se añadió *L. rhamnosus* GG al jugo de piña y juçara que se mantuvo a 8 °C durante 28 días. El estudio in vivo se realizó con 2 grupos experimentales de ratas agrupadas en una dieta basal (G1) y una dieta basal y 1,0 ml/día de jugo probiótico (G2). Los grupos fueron evaluados respecto a la cuantificación de *L. rhamnosus* GG en muestras fecales. Las colonias típicas de *L. rhamnosus* GG en agar LAMVAB modificado son cremosas, regulares y ligeramente amarillentas. Durante el cultivo de heces en medio LAMVAB se aislaron colonias de levaduras que aparecían morfológicamente similares a las colonias de lactobacilos, perjudicando la cuantificación y diferenciación de las bacterias probióticas en estudio. La adición de 20 mg/L de fluconazol al medio de cultivo aumentó su selectividad, eliminando interferencias en el análisis. La elección de este antifúngico se debe a su excelente espectro de acción en relación a las especies de *Candida* sp. El recuento de probióticos en muestras fecales mostró un promedio de 5,7 Log UFC/g de heces. Por lo tanto, los resultados sugieren que el medio LAMVAB modificado desarrollado es selectivo y eficiente para caracterizar *L. rhamnosus* GG en muestras fecales.

PALABRAS CLAVE

Conteo. Probiótico. Resistencia gastrointestinal.

1 INTRODUÇÃO

A microbiota do trato gastrointestinal é heterogênea e composta por várias espécies de microrganismos (HAN *et al.*, 2020). O gênero *Lactobacillus* é parte fundamental desta microbiota, sendo amplamente difundida sua ação probiótica (RASTOGI; SINGH, 2022).

Os probióticos favorecem a recolonização e restauração da simbiose da microbiota do trato intestinal, podendo ser veiculados em alimentos funcionais (RAJEEV *et al.*, 2022). Probióticos veiculados em alimentos devem ser resistentes ao trato gastrointestinal, a fim de atingirem o intestino em condições de multiplicação e colonização. Isso implica em testes de viabilidade a cada nova matriz alimentar desenvolvida (OSPA NOV *et al.*, 2023).

Os microrganismos probióticos são disponibilizados em diversos tipos de alimentos naturalmente fermentados, não fermentados; além de suplementos alimentares em tabletes, cápsulas e pílulas (SHORI, 2022).

A elaboração de novos produtos probióticos deve levar em consideração a viabilidade do microrganismo, sua funcionalidade durante o período de estocagem, além dos fatores intrínsecos e extrínsecos do próprio alimento (VALERO-CASES *et al.*, 2020). Algumas cepas de *Lactocaseibacillus rhamnosus*, anteriormente denominado de *Lactobacillus rhamnosus* estão sendo utilizadas em produtos lácteos. A adição de culturas probióticas em base não láctea representa um desafio tecnológico, sobretudo com relação à sobrevivência destes microrganismos (PALANIVELU *et al.*, 2022).

A quantificação de probióticos nas fezes por meio de ensaios *in vivo* mostra-se eficiente e robusta para avaliar a resistência dos microrganismos, seja por determinação geral de espécies ou por pesquisa espécie-específica (LEBLANC *et al.*, 2022). Para tanto, são usadas técnicas imunológicas, moleculares ou plaqueamento em meios seletivos (WENDEL, 2021), que favorecem a identificação e quantificação das bactérias por plaqueamento tradicional (LUNARDI *et al.*, 2021).

Um meio de cultura seletivo para o isolamento de lactobacilos em fezes foi padronizado por Hartemink *et al.* (1997), denominado *Lactobacillus Anaerobic MRS with Vancomycin and Bromocresol green* (LAMVAB). Este meio potencializa a seletividade do ágar MRS ao acrescentar à formulação cisteína-HCL, que favorece as condições de anaerobiose e pH baixo conferindo poder inibitório às espécies de enterobactérias, bacteroides, outros microrganismos Gram-negativos, além da adição de cloridrato de vancomicina, que inibe estirpes de enterococos, bifidobactérias e espécies de *Clostridium*.

Porém, deve ser ressaltado que leveduras fazem parte da microbiota gastrointestinal e exibem satisfatória sobrevivência ao suco gástrico, apresentando considerável resistência ao pH baixo (CHAN *et al.*, 2021). Tal informação torna-se um entrave ao meio LAMVAB, pois algumas espécies de cocos e as leveduras não estão incluídas no espectro de inibição deste meio (HARTEMINK *et al.*, 1997).

Desta forma, torna-se necessário um aumento de seletividade do meio LAMVAB para obter-se um meio de cultura com o espectro de inibição ainda maior. Assim, uma vez que fluconazol é prescrito como tratamento de primeira escolha em infecções provocadas por *Candida* sp., com excelente espectro de ação (PARTHA *et al.*, 2022), a adição desse antifúngico ao meio LAMVAB torna-se uma opção no intuito de aumentar a seletividade do mesmo e eliminar a interferência na quantificação de lactobacilos probióticos em contagem em placa. Assim, objetivou-se adicionar o antifúngico fluconazol ao meio de cultura LAMVAB no intuito de aumentar a seletividade do mesmo e eliminar a interferência na quantificação de *L. rhamnosus* GG nas fezes de ratos Wistar alimentados com suco de abacaxi (*Ananas comosus*) com juçara (*Euterpe edulis*) fermentado por essa bactéria probiótica.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 PREPARO E OBTENÇÃO DAS POLPAS DE ABACAXI E JUÇARA

A palmeira Jussara é uma espécie nativa da Mata Atlântica com potencial de manejo e geração de renda para produtores rurais. Está ameaçada de extinção pela extração ilegal de palmito, pois a

planta morre ao ser cortada devido ao fato de ser monocaule. O manejo dos frutos para a produção de polpa auxilia na preservação da espécie. A polpa produz uma bebida muito semelhante ao açaí da Amazônia (*Euterpe oleraceae*) em termos de textura, cor, sabor e características nutricionais e funcionais. A adição de suco de abacaxi visa suavizar o sabor subjacente de terra que a bebida possui.

Os frutos de abacaxi foram adquiridos em três lotes no comércio de Rio Pomba, MG, Brasil, em estado adequado de amadurecimento. Eles foram lavados em água corrente para eliminação de sujidades, sanitizados em solução clorada a 200 mg/L, enxaguados em água potável contendo 10 mg/L de cloro ativo, descascados, cortados e a polpa obtida (Walita, Modelo RI6720). Além disso, três lotes de polpa de juçara congelada (20 Kg) foram obtidos de um produtor da cidade de Rio Pomba, MG, Brasil e acondicionados em recipientes de polietileno com capacidade para 500 g. As polpas de abacaxi e de juçara foram congeladas a -18 °C.

2.2 ELABORAÇÃO DE SUCO DE ABACAXI COM JUÇARA FERMENTADO COM *LACTICASEIBACILLUS RHAMNOSUS*GG

Antes da preparação dos sucos, as polpas foram descongeladas por, aproximadamente, seis horas sob refrigeração. A polpa de abacaxi foi homogeneizada manualmente com a de juçara e sacarose na proporção de 5:4,5:0,5 obtendo-se o suco, o qual foi submetido ao tratamento térmico de pasteurização em banho-maria (Tecnal TE - 056 MAG, Piracicaba, São Paulo, Brasil) a 82 °C por 2 minutos, sendo utilizada como controle uma garrafa contendo o suco e termômetro (imerso no ponto geométrico central da garrafa - ponto de menor taxa de aquecimento) para checagem da temperatura. Após a pasteurização, o suco foi resfriado a 37 °C procedendo-se a adição da cultura probiótica liofilizada de *L. rhamnosus* GG (Culturelle®).

Inicialmente, em 200 mL do suco, foi adicionada uma cápsula contendo 10¹⁰ células de *L. rhamnosus* GG. Esta formulação foi denominada pré-inóculo e foi incubada (Nova Ética 403 - 5D, Vargem Grande do Sul, São Paulo, Brasil) por 24 horas a 37 °C, caracterizando a fase de adaptação do microrganismo. Após o período de incubação, foram inoculados 10 mL do pré-inóculo em frascos contendo 200 mL do suco, os quais foram incubados a 37 °C por 72 horas para fermentação do produto. Após a fermentação, os frascos foram armazenados a 8 °C (Nova técnica NT 704, Piracicaba, São Paulo, Brasil) por até 28 dias, caracterizando o produto elaborado.

2.3 ANIMAIS E TRATAMENTOS

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, machos, com peso médio de 105 g e idade de 8 semanas, disponibilizados pelo Biotério do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa. Todo protocolo esteve em conformidade com os Princípios Éticos de Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, em acordo com liberação fornecida pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA / UFV), sobre número de processo 46/2015, fornecido pelo referido Comitê em 20 de agosto de 2015. A opção por ratos Wistar como cobaias para realização de ensaios “*in vivo*” é porque sua fisiologia é semelhante à dos seres humanos, além da praticidade de manuseio e cuidado.

O experimento foi caracterizado por 10 semanas de duração. Os animais foram divididos randomicamente em dois grupos (G1 e G2) de dez animais cada. O grupo G1 foi utilizado como controle negativo,

sendo os animais alimentados apenas com dieta comercial (Purina®) indicada para alimentação de roedores. Os animais do grupo G2, além de ração e água, receberam o suco desenvolvido contendo 7,6 log UFC/mL de *L. rhamnosus* GG, administrado por meio de técnica de gavagem, na quantidade de 1,0 mL por dia durante o período de 10 semanas. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, em ciclos claro/escuro de 12 horas com temperatura média de 23 °C e receberam ração e água *ad libitum*.

2.4 ELABORAÇÃO DO MEIO DE CULTURA MODIFICADO

O meio de cultura LAMVAB modificado (LAMVAB-M) foi preparado a partir de três soluções (A, B e C), as quais foram, posteriormente, misturadas para a elaboração final do meio.

A solução A foi constituída de ágar MRS, cisteína-HCl (0,5 g/L) (Vetec, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil) e púrpura de bromocresol (0,04 g/L) (Impex, Diadema, São Paulo, Brasil). Esta solução teve o pH ajustado para $5,0 \pm 0,1$ utilizando ácido acético glacial P.A. (Êxodo Científica, Hortolândia, São Paulo, Brasil). Após o ajuste do pH, a solução foi esterilizada a 121 °C por 15 minutos em autoclave vertical (Primatec CS, Itu, São Paulo, Brasil).

A solução B foi constituída de cloridrato de vancomicina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) 1,0 mg/mL em água e a solução C de fluconazol 20,0 mg/mL (Pharmanostra, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil) em água. As soluções B e C foram esterilizadas por filtração em filtro de 0,22 µm (Jetbiofil®).

Após a esterilização, a solução A foi deixada em banho-maria até a estabilização da temperatura em 50 °C. Para 1 litro da mesma foram adicionados 20,0 mL da solução B e 1,0 mL da solução C, perfazendo um total de 20,0 mg/L de cada. O preparo final do meio foi realizado no momento do plaqueamento.

2.5 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE *LACTICASEIBACILLUS RHAMNOSUS* GG NAS FEZES DOS RATOS

Um pool de fezes de cada grupo experimental foi coletado em frascos estéreis no 7º, 14º, 28º, 49º e 70º dia, a partir do início do experimento. As amostras foram devidamente homogeneizadas e 1,0 g de fezes foram diluídos em 9,0 mL de solução salina peptonada caracterizando a diluição 10-1, a partir da qual foram realizadas diluições decimais até 10-8. O plaqueamento foi realizado de acordo com Hartemink *et al.* (1997) por profundidade em Ágar LAMVAB e Ágar LAMVAB-M com incubação a 37 °C por 72 horas em jarra de anaerobiose.

A contagem de *L. rhamnosus* GG nas amostras fecais foi realizada por enumeração seletiva, sendo realizada contagem padrão de bactérias lácticas e contagem diferencial de *L. rhamnosus* GG. A estirpe *L. rhamnosus* GG caracteriza-se como bastonetes Gram-positivos curtos, finos e agrupados em paliçadas, catalase negativo e diferencia-se das demais subespécies de *L. rhamnosus* por não fermentar a lactose, maltose e sacarose (GOLDIN *et al.*, 1992; PEÑA *et al.*, 2004). Sendo assim, a contagem diferencial em amostra fecal da estirpe em estudo foi baseada na morfologia das colônias, considerando-se colônias típicas de *L. rhamnosus* GG em ágar LAMVAB-M as que se apresentaram cremosas, regulares e levemente amareladas.

Utilizou-se também para a caracterização da estirpe a tipicidade morfotintorial por coloração pelo método de Gram, reação ao peróxido de hidrogênio (prova da catalase) e teste de fermentação de açúcares (glicose e lactose). O número de UFC/g de fezes foi calculado em função do número de colônias típicas contadas, diluição inoculada e porcentagem de colônias confirmadas, tomando-se como base,

um mínimo de 20 colônias testadas por amostra de fezes. Como controle positivo na identificação da estirpe pesquisada utilizou-se cultura pura de *L. rhamnosus* GG (Culturelle®, ATCC 53103).

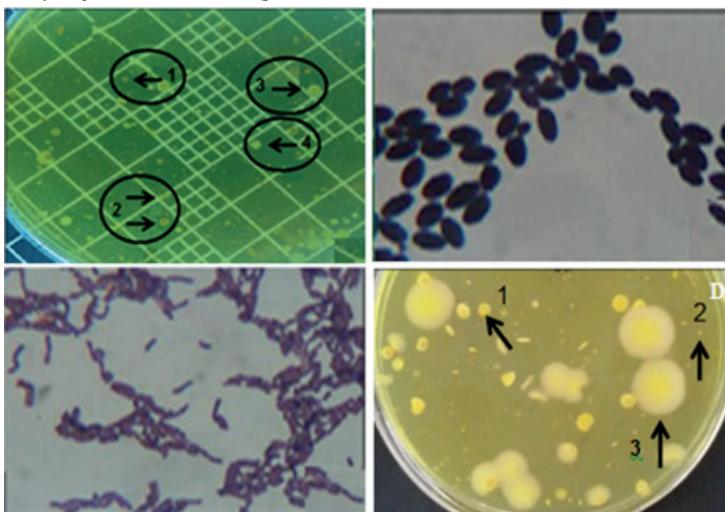
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CARACTERIZAÇÃO DO MEIO DE CULTURA LAMVAB-M PARA IDENTIFICAÇÃO DE *LACTICASEIBACILLUS RHAMNOSUS* GG NAS CULTURAS DE FEZES DE RATOS WISTAR

Durante a cultura das fezes em meio LAMVAB, colônias de leveduras foram isoladas, apresentando-se morfologicamente semelhantes às colônias de lactobacilos, prejudicando a quantificação e diferenciação da bactéria probiótica em estudo (Figuras 1A, 1B e 1C). A adição de 20 mg/L de fluconazol ao meio de cultura aumentou sua seletividade, eliminando a interferência na análise.

As colônias de *L. rhamnosus* GG em Ágar LAMVAB são morfologicamente semelhantes às características descritas por Goldin *et al.* (1992) em Ágar para seleção de lactobacilos suplementado. Nesse ágar as colônias se apresentam esbranquiçadas, cremosas e de aparência regular (Figura 1A), enquanto em meio LAMVAB-M apresentam-se levemente amareladas (Figura 1D).

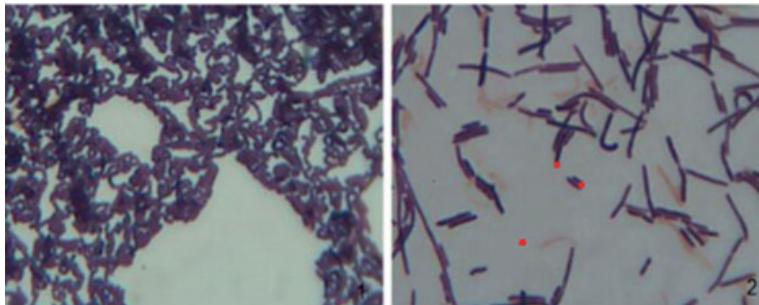
Figura 1 – Morfologia das colônias de amostra fecal em meio LAMVAB (A). Em B tem-se uma estrutura leveduriforme, correspondente às colônias 1 e 2 da Figura A e em C bastonetes Gram-positivos típicos da estirpe *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG, correspondente às colônias 3 e 4 da Figura A. Em D tem-se colônia típica de *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG em Ágar LAMVAB-M (colônia 1), colônia de bactéria láctica de outra espécie/estirpe (colônia 2) e colônia de *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG com crescimento na porção inferior do ágar (colônia 3)



Fonte: Dados da pesquisa

Pela característica morfotintorial em coloração pelo método de Gram, verificou-se que a estirpe *L. rhamnosus* GG apresenta-se como bastonetes Gram-positivos curtos, finos e agrupados em paliçada, corroborando com o relato de Doron *et al.* (2015). Sua tipicidade morfotintorial permitiu distinguir *L. rhamnosus* GG de outras bactérias do ácido láctico (Figura 2A e 2B).

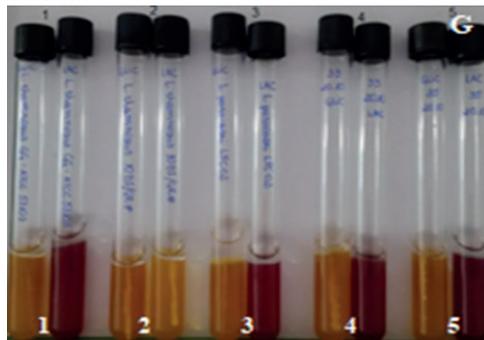
Figura 2 – (A): bastonetes Gram-positivos curtos, finos e agrupados em paliçadas, típicos da estirpe *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG. (B): bastonetes Gram-positivos longos e sem agrupamento específico característicos de bactérias lácticas de outra espécie/estirpe



Fonte: Dados da pesquisa

Bactérias do ácido láctico são geralmente classificadas como catalase negativa, sendo uma característica também presente na estirpe *L. rhamnosus* GG (PEÑA *et al.*, 2004). As colônias identificadas morfotintorialmente como bastonetes Gram-positivos foram testadas quanto à capacidade de reagir com o peróxido de hidrogênio, obtendo resultado negativo em todos os testes. Além disso, as colônias indicativas de *L. rhamnosus* GG apresentaram resultado negativo para fermentação da lactose (Figura 3).

Figura 3 – Teste de fermentação de açúcares sendo que os pares de tubos possuem glicose (à esquerda) e lactose (à direita) como fonte de carbono: (1) *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103); (2) *Lacticaseibacillus rhamnosus* Lc 705; (3) *Lacticaseibacillus paracasei* LPC02; (4 e 5) isolados de amostras fecais do presente trabalho



Fonte: Dados da pesquisa

3.2 CONTAGEM DE BACTÉRIAS LÁTICAS E DE *LACTICASEIBACILLUS RHAMNOSUS*GG NAS AMOSTRAS FECAIS DE RATOS WISTAR

Não houve diferença ($p>0,05$) na contagem padrão em placas de bactérias lácticas entre os grupos de animais. A contagem diferencial de *L. rhamnosus* GG em ágar LAMVAB-M apresentou uma redução de, aproximadamente, 2 ciclos logarítmicos em relação a contagem dessa bactéria no suco ofertado aos animais (Tabela 1).

Constatou-se que *L. rhamnosus* GG apresentou contagens superiores a 7,6 log UFC/mL de suco ao longo do período experimental, sendo mantido a 8 °C (Tabela 1). Apesar de não existir um consenso da quantidade mínima de microrganismos probióticos necessária para proporcionar efeitos benéficos ao organismo, alguns autores consideram necessário $>10^6$ UFC/g ou mL do alimento, enquanto outros sugerem entre 10^6 a 10^7 UFC/g (SAAD, 2006), ou ainda 10^9 a 10^{10} UFC/g. A ingestão de 100 mL do suco de abacaxi com juçara fermentado com *L. rhamnosus* GG, poderá fornecer ao consumidor no mínimo de 9,9 log UFC por dia. Portanto, com base na literatura consultada, o suco desenvolvido é um veículo promissor de *L. rhamnosus* GG.

Tabela 1 – Contagem (log UFC/mL) de *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG no suco e de bactérias lácticas e *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG nas fezes dos ratos

Dia	Suco	Fezes			
		Bactérias lácticas		<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> GG	
		G1	G2	G1	G2
7	7,6	7,0	7,0	< 1,0	6,4
14	7,6	7,0	6,9	< 1,0	6,0
28	8,3	5,0	6,0	< 1,0	5,4
49	7,7	7,5	7,2	< 1,0	5,5
70	8,2	8,0	6,1	< 1,0	5,7
Média	7,9 ± 0,3 a	6,9 ± 1,1 A	6,6 ± 0,6 Ab	< 1,0 B	5,8 ± 0,4 Ac

Médias seguidas por mesma letra maiúscula (comparação entre as contagens de bactérias lácticas e de *L. rhamnosus* GG nas amostras de fezes) e de mesma letra minúscula (comparação entre a contagem de *L. rhamnosus* GG no suco desenvolvido, de bactérias lácticas e de *L. rhamnosus* GG nas fezes dos ratos do grupo G2) não diferem entre si ($p>0,05$).

Fonte: Dados da pesquisa

Doron *et al.* (2015) avaliaram, em humanos, a eficácia de *L. rhamnosus* GG na colonização intestinal. Os voluntários receberam por 14 dias consecutivos uma dosagem de 10,3 log de UFC do probiótico. A quantificação aos 14 dias de experimento, imediatamente após o término da ingestão do probiótico, foi de 8,36 log UFC/g de fezes. Os autores observaram uma redução de, aproximadamente, dois ciclos log na contagem do probiótico, fato similar ao encontrado no presente estudo.

Deve-se considerar a capacidade de adesão dos microrganismos, particularmente, de *L. rhamnosus* GG devido ao pili que favorece a colonização. Segundo Leeber *et al.* (2012), o pilus SpaCBA de *L. rhamno-*

sus GG mostrou-se uma estrutura fundamental de adesão eficiente ao epitélio intestinal, favorecendo a formação de biofilme em células epiteliais Caco-2. Portanto, deve-se levar em consideração que parte do total de *L. rhamnosus* GG ingerido pelos animais por meio do suco de abacaxi com juçara podem não ter sido eliminados nas fezes por estarem aderidos ao epitélio, resistindo ao peristaltismo intestinal.

4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos de viabilidade da cultura probiótica *L. rhamnosus* GG e de resistência ao trato gastrointestinal *in vivo* sugerem que o meio de cultura LAMVAB-M é eficiente na caracterização dessa bactéria probiótica. A adição de fluconazol 20 mg/L ao meio de cultura LAMVAB foi eficiente na inibição de leveduras, o que demonstra um ganho de seletividade na análise, sendo o meio de cultura ajustado importante para pesquisas de bactérias probióticas.

REFERÊNCIAS

- CHAN, M. *et al.* Microorganisms in Whole Botanical Fermented foods survive processing and simulated digestion to affect gut microbiota composition. **Front Microbiol**, v. 12, p. 759708, 2021.
- DORON, S. *et al.* Effect of *Lactobacillus rhamnosus* GG administration on vancomycin-resistant Enterococcus colonization in adults with comorbidities. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, n. 8, p. 4593-4599, 2015.
- GOLDIN, B. R.; GORBACH, S. L.; SAXELIN, M.; BARAKAT, S.; GUALTIERI, L.; SALMINEN, S. Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract. **Dig Dis Sci**, v. 37, n. 1, p. 121-128, 1992.
- HAN, S.K. *et al.* *Lactobacillus reuteri* NK33 and *Bifidobacterium adolescentis* NK98 alleviate *Escherichia coli*-Induced depression and gut dysbiosis in mice. **J Microbiol Biotechnol**, n. 30, p. 1222-1226, 2020.
- HARTEMINK, R. *et al.* LAMVAB – A new selective médium for the isolation of lactobacilli from faeces. **J Microbiol Meth**, n. 29, p. 77-84, 1997.
- LEBLANC, D. *et al.* Effect of probiotic bacteria on porcine rotavirus OSU infection of porcine intestinal epithelial IPEC J2 cells. **Arch Virol**, n. 167, p. 1999-2010, 2022.
- LEEBER, S. *et al.* Functional analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG pili in relation to adhesion and immunomodulatory nteractions with intestinal epithelial cells. **Appl Environ Microbiol**, p. 185-193, 2012.

LUNARDI, A. *et al.* Bactérias ácido-láticas não iniciadoras (NSLAB): Um desafio à indústria do queijo. **Braz J Develop**, v. 7, n. 3, p. 26383-26409, 2021.

OSPA NOV, A. *et al.* Survival of lactic acid bacteria when using the developed yogurt from the milk of small cattle under in-vitro conditions. **Food Sci Technol**, v. 43, e117722, 2023.

PALANIVELU, J. *et al.* Probiotics in functional foods: survival assessment and approaches for improved viability. **Appl. Sci.**, v. 12, n. 455, 2022.

PARTHA, A. D. S. L. *et al.* Evaluation of fluconazole, itraconazole, and voriconazole activity on *Candida albicans*: A case control study. **Ann Med Surg**, v. 84, p. 104882, 2022.

PEÑA, J. A. *et al.* Genotypic and phenotypic studies of murine intestinal lactobacilli: Species differences in mice with and without colitis. **Appl Environ Microbiol**, v. 70, n. 1, p. 558-568, 2004.

RAJEEV, R. *et al.* Gut microbiome responses in the metabolism of human dietary components: Implications in health and homeostasis. **Crit Rev Food Sci**, v. 62, n. 27, 7615-7631, 2022.

RASTOGI, S.; SINGH, A. Gut microbiome and human health: Exploring how the probiotic genus *Lactobacillus* modulate immune responses. **Front Pharmacol**, v. 24, n. 13, p. 1042189, 2022.

SAAD, S. M. I. Probióticos e probióticos: o estado da arte. **Rev Bras Cienc Farm**, v. 42, n. 1, 2006.

SHORI, A. B. Application of *Bifidobacterium* spp in beverages and dairy food products: an overview of survival during refrigerated storage. **Food Sci Technol**, v. 42, p. e41520, 2022.

VALERO-CASES, E. *et al.* Non-dairy fermented beverages as potential carriers to ensure probiotics, prebiotics, and bioactive compounds arrival to the gut and their health benefits. **Nutrients**, v. 12, n. 1666, 2020.

WENDEL, U. Assessing viability and stress tolerance of probiotics – a review. **Front Microbiol**, v. 12, p. 818-468, 2021.

Recebido em: 20 de Dezembro de 2024

Avaliado em: 27 de Julho de 2024

Aceito em: 4 de Novembro de 2024

1 Graduada em Farmácia e Bioquímica, Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais - Campus Rio Pomba, Rio Pomba, MG, Brasil. ORCID: 0000-0002-9743-4141. Email: renata.campos@ifsudestemg.edu.br.

2 Químico. Instituto Federal Sudeste de Minas Gerais - campus Barbacena, Barbacena, MG, Brasil. ORCID: 0009-0006-6389-8497. E-mail: carlos.eduardo@ifsudestemg.edu.br.

3 Agrônomo, Doutor em Microbiologia Agrícola. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais - Campus Rio Pomba, Rio Pomba, MG, Brasil. ORCID: 0000-0003-3379-871X. E-mail: andre.campos@ifsudestemg.edu.br.

4 Nutricionista, Doutora em Bioquímica e Imunologia. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil. ORCID: 0000-0003-4665-7043. E-mail: mpeluzio@ufv.br.

5 Graduada em Economia Doméstica, Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais - Campus Rio Pomba, Rio Pomba, MG, Brasil. ORCID: 0000-0001-7621-5575. E-mail: eliane.martins@ifsudestemg.edu.br.

6 Tecnólogo em Laticínios, Doutor em Microbiologia Agrícola. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais - Campus Rio Pomba, Rio Pomba, MG, Brasil. ORCID: 0000-0001-8494-0873. E-mail: maurilio.martins@ifsudestemg.edu.br



A autenticidade desse artigo pode ser conferida no site <https://periodicos.set.edu.br>

Copyright (c) 2024 Revista Interfaces Científicas - Saúde e Ambiente



Este trabalho está licenciado sob uma licença Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.