

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ  
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**JOSIANE MANGONI**

**POTENCIAL PROBIÓTICO DE LACTOBACILOS DE ORIGEM SUÍNA**

**MARECHAL CÂNDIDO RONDON**

**2009**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ**  
**CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**JOSIANE MANGONI**

**POTENCIAL PROBIÓTICO DE LACTOBACILOS DE ORIGEM SUÍNA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná para obtenção do título de Mestre em Zootecnia, Área de Concentração: Produção Animal – Nutrição de Monogástricos.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Magali Soares dos Santos Pozza

**MARECHAL CÂNDIDO RONDON**

**2009**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca da UNIOESTE – Campus de Marechal Cândido Rondon – PR., Brasil)

M277p	Mangoni, Josiane Potencial probiótico de lactobacilos de origem suína / Josiane Mangoni. - Marechal Cândido Rondon, 2009. 46 p.  Orientadora: Prof <sup>a</sup> Dr <sup>a</sup> Magali Soares dos Santos Pozza  Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Marechal Cândido Rondon, 2009.  1. Suinocultura. 2. Leitões - Alimentação. 3. Leitões - Características probióticas. 4. Leitões - Trato gastrointestinal. I. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. II. Título.  CDD 21.ed. 636.4 CIP-NBR 12899
-------	---

Ficha catalográfica elaborada por Marcia Elisa Sbaraini Leitzke CRB-9/539

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ  
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**JOSIANE MANGONI**

**POTENCIAL PROBIÓTICO DE LACTOBACILOS DE ORIGEM SUÍNA**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, para a obtenção do título de “Mestre”.

Marechal Cândido Rondon, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

---

---

## **Dedicatoria**

Dedico o meu trabalho as pessoas que mais amo, e que foram fundamentais para o meu sucesso:

Meu pai **Marques Delci Mangoni**

Minha mãe **Merilene Carme Marafon Mangoni**

Minhas irmãs **Ana Paula Mangoni** e **Andréia  
Fernanda Mangoni**

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade da vida.

Aos meus pais **Marques Delci Mangoni e Merilene Carme Marafon Mangoni** e as minhas irmãs **Ana Paula Mangoni e Andréia Fernanda Mangoni**, por todo o amor e dedicação, pelo esforço incondicional em me ajudar, pela compreensão e incentivo nos momentos difíceis.

À professora orientadora Dr<sup>a</sup> Magali Soares dos Santos Pozza por suas orientações e competências repassadas.

As amigas e colegas Suzana de Almeida, Ruthielly Zeni de Almeida, que compartilharam comigo de forma direta na realização e na condução deste trabalho.

As amigas e companheiras Mayara Sabedott e Cristiane Meiners que foram imprescindível durante a execução dos trabalhos práticos e teóricos.

Ao professor Dr<sup>o</sup> Cláudio pela disponibilidade e ajuda nos cálculos estatísticos.

À Fundação Araucária pelo auxílio financeiro à nossa pesquisa

A Unioeste – Universidade Estadual do Oeste do Paraná e seus mestres pelos conhecimentos repassados.

A todos os professores e funcionários da UNIOESTE que colaboraram de forma direta ou indireta no desenvolvimento do trabalho.

Àqueles que de alguma maneira, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, a minha enorme gradidão.

## RESUMO

O uso de probiótico na alimentação animal tem sido indicado, por reduzir a mortalidade resultante da colonização intestinal por micro-organismos patógenos, melhorar o desempenho e as características de produção sem deixar resíduos na carne. O experimento teve como objetivo isolar, a partir de amostras de fezes de suínos na fase de aleitamento, cepas de lactobacilos visando sua utilização como probióticos. Foram isoladas 92 colônias, essas colônias pré-selecionadas foram submetidas à prova de catalase onde 60 negativamente. As 60 colônias negativas foram submetidas à coloração de Gram onde foram avaliadas sua morfologia. Destas, 16 apresentaram formas de bacilos. Esses isolados foram comparados pela sua habilidade em resistirem em pH 3,0, crescer na presença de sais biliares, fenol, lisozima, sua capacidade de hidrofobicidade e antagonica. Os isolados L03, L04, L08 e L15, identificados neste trabalho apresentam melhores características para uso como probiótico, em função de demonstrar melhor comportamento sobre as condições ácidas, crescendo na presença de sais biliares e fenol, apresentando alta percentagem de hidrofobicidade e inibindo *Escherichia coli*.

**Palavras chaves:** características probióticas, trato gastrointestinal, leitões

## ABSTRACT

### Potentially probiotic lactobacilli of porcine origin

The use of probiotic in animal nutrition has been identified for reducing mortality resulting from intestinal colonization by pathogenic micro-organisms, improving the performance and characteristics of production, leaving no residue in meat. The experiment aimed to isolate, from faeces samples from swine in the suckling strains of lactobacilli in order to be identified as probiotics. 92 colonies were isolated, these pre-selected colonies were subjected to the catalase which 60 negatively. The 60 colonies were subjected to negative Gram stain were evaluated where their morphology. Of these, 16 had forms of bacilli. These isolates were compared for their ability to resist pH 3.0, to grow in the presence of bile salts, phenol, lysozyme, its ability to hydrophobicity and antagonistic. Isolates L03, L04, L08 and L15, identified in this study show better for probiotic use, according to show better performance on the acidic conditions, growing in the presence of bile salts and phenol, with high percentage of hydrophobicity and inhibiting *Escherichia coli*.

**Key words:** probiotic characteristics, gastrointestinal tract, piglets

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Curva de regressão de crescimento (Log UFC/mL) dos isolados expostos ao ácido clorídrico que resistiram ao 3 horas. ....	24
Figura 2. Curva de crescimento do isolado L 03 em caldo MRS normal e MRS contendo 0,3% de sais biliares. ....	26
FIGURA 3. Curva de crescimento do isolado L14 em caldo MRS normal e MRS contendo 0,3% de sais biliares. ....	26
FIGURA 4. Curva de crescimento do isolado L01 em caldo MRS normal e MRS contendo 0,3% de sais biliares. ....	27
FIGURA 5. Curva de crescimento do isolado L02 em caldo MRS normal e MRS contendo 0,3% de sais biliares. ....	27
FIGURA 6. Curva de crescimento do isolado L05 em caldo MRS normal e MRS contendo 0,3% de sais biliares. ....	28
FIGURA 7. Curva de crescimento do isolado L08 em caldo MRS normal e MRS contendo 0,3% de sais biliares. ....	28

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Crescimento (log UFC/mL) dos isolados expostos ao ácido clorídrico (HCl 0,1M) por até 3 horas. ....	22
Tabela 2. Equações de regressão e estimativa dos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) dos isolados que resistiram após 3 horas em pH 3,0.....	24
Tabela 3. Valores determinados de pH e porcentagem de acidez titulável dos isolados cultivados em LDR (Leite desnatado reconstituído) a 10% sem e com adição de 0,3% de fenol, incubados por 3 dias a 35°C. ....	29
Tabela 4. Crescimento dos isolados na ausência e presença da enzima lisozima após 24h.....	31
Tabela 5. Hidrofobicidade de superfície das culturas isoladas.....	32
Tabela 6. Teste de crescimento em diferentes temperaturas.....	34
Tabela 7. Inibição da <i>Escherichia coli</i> patogênica por Lactobacilos isolados.....	35

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>2 REFERÊNCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>12</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>18</b>
3.1 Coleta e preparo das amostras .....	18
3.2 Isolamento e Seleção das Colônias .....	18
3.3 Reativação .....	19
3.4 Resistência a Condições Ácidas .....	19
3.5 Tolerância aos Sais Biliares .....	19
3.6 Determinação de Tolerância ao Fenol .....	20
3.7 Resistência Enzimática .....	20
3.9 Adesão “ <i>In Vitro</i> ” dos Isolados .....	20
3.9 Crescimento em Diferentes Temperaturas.....	21
3.10 Efeito Antagônico dos Isolados – Método de Multicamadas .....	21
3.11 Análise Estatística .....	21
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>22</b>
4.1 Resistência a Condições Ácidas .....	22
4.2 Tolerância aos Sais Biliares .....	25
4.3 Determinação de Tolerância ao Fenol .....	29
4.4 Resistência à lisozima .....	31
4.5 Adesão “ <i>In Vitro</i> ” dos Isolados .....	32
4.6 Crescimento em Diferentes Temperaturas.....	34
4.7 Efeito Antagônico dos Isolados – Método de Multicamadas .....	35
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	<b>37</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>38</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A sociedade moderna exige, de forma cada vez mais intensa, que os alimentos apresentem qualidade, custo acessível e, acima de tudo, segurança. Além disso, há uma grande preocupação de que esses alimentos não sejam produzidos às custas do uso exacerbado ou do esgotamento dos recursos naturais (FAO-Food and Agriculture Organization, 2004). Nas últimas décadas, a produção de carne suína vem sendo intensificada por avanços significativos nas áreas da genética, nutrição, ambiência e reprodução.

A suinocultura brasileira é uma das mais desenvolvidas do mundo e produz carne a um dos menores custos. Assim, o Brasil é um dos grandes competidores no mercado mundial. A produção de suínos no Sul do Brasil pode ser considerada como a mais tecnicada da América do Sul (ABIPECS, 2006).

Os probióticos, são suplementos alimentares à base de micro-organismos vivos (FULLER, 1989) que, quando administrados em quantidades adequadas, afetam benéficamente o hospedeiro animal por melhorar o equilíbrio da microflora intestinal. Quando estes probióticos são incorporados em alimentos como parte do processo de elaboração ou aditivos, geram alimentos funcionais, que afetam de maneira positiva e promovem um efeito fisiológico ao organismo.

O uso de probióticos na alimentação animal tem sido indicado, por reduzir a mortalidade resultante da colonização intestinal por organismos patógenos, melhorar o desempenho e as características de produção sem deixar resíduos prejudiciais na carne (FÜLLER; COLE, 1988). A manutenção de uma microbiota intestinal estável com o uso de probióticos, serve como barreira contra micro-organismos potencialmente patogênicos e propicia a obtenção de bons resultados zootécnicos (MULDER, 1991).

Os probióticos, quando ingeridos, encontram meio adequado para multiplicação, colonizam o trato digestivo e se estabelecem sobre outros micro-organismos aí presentes. Uma vez estabilizada, a microbiota do trato digestivo previne a colonização por outra bactéria (EDENS et al., 1997). O conjunto de efeitos das ações dos probióticos no trato digestivo promove equilíbrio microbiano a favor da microflora benéfica, o que possibilita a redução do pH e das bactérias enteropatogênicas, melhorando a eficiência alimentar (SILVA et al., 2001).

A ação dos probióticos basicamente melhora a saúde geral e a performance dos animais. Os probióticos são biorreguladores do trato intestinal, tendo ação preventiva. O mecanismo de ação é complexo e pode variar com o micro-organismo, com fatores ambientais e condições físicas do animal hospedeiro. Aspectos positivos na produtividade, na conversão alimentar e no ganho de peso têm sido constatados com o uso desse suplemento (TOURNUT, 1998).

A ação desses microrganismos parece ser através de inibição competitiva, principalmente de *Escherichia coli*, ou alteração do pH intestinal, através da produção de lactato, favorecendo o desenvolvimento dos micro-organismos que beneficiam o hospedeiro, promovendo aumento de ganho de peso e melhora da eficiência alimentar. Vários micro-organismos são usados como probióticos, entre eles bactérias ácido-lácticas, bactérias não ácido lácticas e leveduras. Os probióticos devem ser inócuos, manter-se viáveis por longo tempo durante a estocagem e transporte, tolerar o baixo pH do suco gástrico e resistir à ação da bile e das secreções pancreática e intestinal. Estes micro-organismos não devem transportar genes transmissores de resistência a antibióticos e podem apresentar preferencialmente propriedades anti-mutagênicas e anticarcinogênicas (SALMINEN et al., 1998).

O objetivo do presente trabalho foi isolar, a partir de amostras de suínos, na fase de aleitamento, cepas de lactobacilos para posterior avaliação quanto à tolerância a substâncias inibidoras e condições ácidas, como também avaliar o efeito antagônico em relação à *Escherichia coli*, visando o uso destes isolados como probióticos.

## 2 REFERÊNCIAL TEÓRICO

O período pós-desmama é uma fase extremamente complexa na vida do leitão, trazendo vários desafios para a manutenção de sua homeostase, duração e severidade de acordo com as características de cada granja (STOKES et al., 2001). Durante esse período de transição, é observada uma redução no crescimento dos animais, normalmente associada a alterações histológicas e bioquímicas no intestino delgado, como atrofia das vilosidades e aumento da profundidade de criptas, acarretando em reduzida capacidade de digestão e absorção de nutrientes (McCRACKEN et al., 1999).

No Brasil, os suinocultores vêm, nos últimos tempos, praticando o desmame dos leitões entre 21 e 28 dias de idade, porém com grande interesse em desmamar os leitões cada vez mais cedo, na expectativa de aumentar o número de leitões por porca/ano, o que, em teoria, pode ser obtido pela redução no período de lactação, pois as matrizes em lactação são consideradas improdutivas (MOITA et al., 1994; PASSOS Jr., 1997).

Segundo Cavalcanti (1996) na indústria de rações, nos últimos 50 anos os antibióticos têm sido usado na produção animal para diferentes espécies de interesse zootécnico como terapêuticos, no tratamento de infecções bacterianas do trato gastrointestinal e como agentes promotores de crescimento. A utilização dos antibióticos com o objetivo de melhorar o ganho de peso e conversão alimentar ocorreu inicialmente de forma discreta, evoluindo posteriormente para o uso amplo e generalizado na indústria de nutrição animal.

O uso de antibióticos como moduladores de micro-organismos no trato gastrointestinal ocorreu inicialmente em doses baixas com resultados significativos sobre os parâmetros produtivos e, posteriormente, com o uso continuado, houve a necessidade de doses crescentes, surgindo então efeitos significativos (LANCINI, 1994).

Santos (2002a) afirma que como consequência da seleção de bactérias resistentes, determinados antibióticos deixam de ser ativos contra certas bactérias, segundo o princípio fundamental da evolução das espécies em presença de novas condições ambientais.

Fuller (1989) considerou os probióticos como suplementos alimentares que contêm bactérias vivas e que produzem efeitos benéficos ao hospedeiro,

favorecendo o equilíbrio de sua microbiota intestinal, quando administrados em quantidades adequadas. Dentre os mecanismos potenciais para ação dos probióticos pode ser destacada a manutenção da resistência da mucosa intestinal.

Como alternativa ao uso dos antibióticos Hong et al (2005), consideram os probióticos, promotores de crescimento, partindo-se deste princípio, a adição de bactérias benéficas proporciona a manutenção da flora intestinal, ajuda a melhorar a digestão dos alimentos e a resistir à colonização de bactérias prejudiciais por exclusão competitiva.

De modo geral, ao nascer, os animais recebem do organismo materno uma inoculação de micro-organismos benéficos como *Lactobacillus* e *Streptococcus* que, alojados no trato gastrointestinal, irão dar-lhes maior resistência às agressões dos micro-organismos do meio ambiente, como cepas patogênicas de *Salmonella* e *Escherichia coli* (SNOYENBOS et al., 1982).

As culturas probióticas são bactérias não patogênicas que normalmente derivam da microbiota normal e da mesma espécie animal que à elas serão administradas (FULLER, 1989; GARLICH, 1999). Eventos agressores da microbiota como enterites de origem bacteriana ou viral, ação de algumas micotoxinas, estresse, decorrente de modificações drásticas da dieta, jejum, calor ou frio, podem ser evitados pela inoculação contínua de cultivos probióticos que reduziriam a ação bacteriana indesejável, controlando patógenos como *Clostridium*, *Salmonella*, entre outros. Os probióticos quando administrados de forma contínua protegem os vilos e a superfície absorptiva de toxinas irritantes produzidas por micro-organismos patogênicos, permitindo e evitando lesões da mucosa intestinal (GARLICH, 1999).

Segundo Pancheniak (2005) o probiótico poderá, preferencialmente, apresentar as seguintes características:

- Capaz de ser produzido em larga escala e de maneira viável;
- Capaz de ser estocado e manter a sua viabilidade até o momento de uso;
- Ter condições de permanecer no ambiente intestinal;
- Produzir um efeito benéfico no intestino animal e
- Ter habilidade de sobrevivência, não necessariamente de multiplicação, no intestino.

Os probióticos são usados em medicina humana na prevenção de doenças, na regulação da microbiota intestinal, em distúrbios do metabolismo gastrointestinal,

como imunomoduladores, e na inibição da carcinogênese. Na produção animal, além dessas aplicações, podem também ser usados como promotores de crescimento, constituindo-se em uma alternativa aos antibióticos, cujo uso indiscriminado pode selecionar cepas resistentes.

Os micro-organismos probióticos adicionados à dieta podem proteger o intestino dos animais contra micro-organismos patógenos e trazer benefícios por diferentes mecanismos propostos: exclusão competitiva, antagonismo direto, estímulo ao sistema imune e efeito nutricional.

Os micro-organismos probióticos, quando adicionados à dieta e são viáveis, logo passam a prevalecer na microbiota, aderindo-se ao epitélio intestinal. Assim, a adesão de micro-organismos patógenos é dificultada. Ao mesmo tempo, os micro-organismos probióticos aderidos à parede do epitélio intestinal também possuem uma maior facilidade de capturar e metabolizar nutrientes presentes no lúmen, quando comparados com micro-organismos patógenos que não estão aderidos (ROTH, 2000). A prevalência dos micro-organismos probióticos no intestino dificulta a fixação dos patógenos, por exclusão competitiva ou antagonismo direto.

Os mecanismos de ação dos probióticos estão relacionados à competição por sítios de ligação ou à exclusão competitiva, ou seja, as bactérias probióticas ocupam o sítio de ligação na mucosa intestinal formando, uma barreira física às bactérias patogênicas. Assim, as bactérias seriam excluídas por competição de espaço, sendo, as fímbrias os elementos de aderência bacteriana mais conhecidos e estudados. Algumas bactérias somente se aderem à superfície superior dos enterócitos, enquanto que outras residem nas criptas onde são produzidas as novas células epiteliais que migram até o topo das vilosidades (DOBROGOSZ et al., 1989).

Segundo Huyghebaert (2003), a exclusão competitiva se aplica a probióticos à base de microrganismos dos gêneros *Lactobacillus*, *Enterococcus* e *Streptococcus*, pois são bactérias que, como os principais patógenos, colonizam o trato gastrointestinal, aderindo-se por meio de fímbrias ao epitélio intestinal.

De acordo com Roth (2000), os probióticos afetam a permeabilidade do epitélio intestinal, proporcionando maior eficiência na digestão e absorção de nutrientes. Além de proteger o epitélio intestinal, os probióticos evitam que os patógenos utilizem aminoácidos, minerais e carboidratos para fermentação e produção de toxinas (GUILLOT, 2000). Dessa maneira, espera-se que o animal hospedeiro melhore a eficiência alimentar e o desempenho.

Os lactobacilos, grupo de bactérias com muitas linhagens probióticas, são em geral exigentes do ponto de vista nutricional, requerendo ambientes complexos, dos quais obtêm sua energia via catabolismo homo ou heterofermentativo, utilizando preferencialmente carboidratos (GILLILAND, 1996).

Os micro-organismos probióticos são submetidos a várias condições de estresse, durante as etapas de processamento industrial e a passagem pelo trato gastrointestinal, que podem alterar a fisiologia e as características intrínsecas da célula bacteriana. As bactérias do ácido láctico são caracterizadas como cocos ou bastonetes, Gram-positivos, não formadores de esporos, catalase negativos (KLEIN et al., 1998). Os *Lactobacillus*, são considerados probióticos por exercerem efeitos benéficos ao hospedeiro e por ocuparem nichos importantes no trato gastrointestinal de humanos e animais (KLAENHAMMER et al., 2002).

Alguns critérios de seleção para micro-organismos potencialmente probióticos têm sido utilizados como a tolerância e crescimento em condições ácidas e na presença de sais biliares; propriedades de adesão ao epitélio intestinal; atividade antagonista contra patógenos intestinais e resistência a antimicrobianos.

O estômago, primeiro sítio da digestão protéica, deve apresentar um pH de 2,0 a 3,5. A acidez estomacal tem a função de estabelecer uma barreira bacteriana para proteger o intestino delgado contra a entrada de micro-organismos patogênicos e proporcionar pH adequado para ação da pepsina. Como os leitões não alcançam a capacidade adulta de acidificação do estômago até os dois meses e meio de vida, o alto pH do estômago, por causa da insuficiente produção de ácido clorídrico, favorece a proliferação de bactérias patogênicas (FULLER, 1989).

O intestino delgado, principal local de digestão e/ou absorção dos monogástricos, tem como unidade funcional as vilosidades, que são projeções da mucosa, revestidas por células epiteliais colunares, os enterócitos. Essas células exercem função de digestão e de absorção. O número e o tamanho das vilosidades dependem do número de células que as compõem. Assim, quanto maior o número de células, maior o tamanho da vilosidade e, por conseqüência, maior a área de absorção de nutrientes.

As bactérias do ácido láctico possuem alguns mecanismos para manter a homeostase celular em ambiente com pH baixo. Linhagens probióticas são expostas ao estresse ácido extremo quando alcançam o estômago, em razão da presença de ácido clorídrico (ANGELIS; GOBBETTI, 2004). Para que um microrganismo seja

considerado um probiótico, deve ser capaz de atravessar a barreira gástrica para poder multiplicar-se e colonizar o intestino por um tempo curto e produzir compostos antimicrobianos (PARDIO et al, 1994). Alguns autores observaram que espécies de *Lactobacillus acidophilus* apresentaram alta tolerância a pH 3,0. Após a ingestão do alimento, o estômago leva de 2 a 4 horas para esvaziar-se. As bactérias que sobreviverem nas condições ambientais do estômago irão posteriormente, no duodeno enfrentar secreções de sais biliares (PENNACCHIA et al, 2004).

É difícil obter exatidão nos dados simulados em laboratório perante os parâmetros que afetam a sobrevivência do microrganismo *in vivo*. Um fator importante a ser considerado é a resistência à bile, pois essa resistência pode variar entre espécies, e quando transferidos esses micro-organismos para o meio de cultura, não são em sua totalidade as células que permanecem viáveis.

A bile é uma secreção digestiva que possui papel principal na emulsificação e na solubilização de lipídeos e tem a capacidade de afetar fosfolipídios e proteínas da membrana, alterando a homeostase celular. A capacidade de um micro-organismo de tolerar a bile requer um grande conjunto de proteínas, envolvidas na arquitetura do envelope celular e na manutenção da homeostase intracelular (BEGLEY et al., 2005).

A capacidade de tolerar a bile é importante para sobrevivência das bactérias probióticas e subsequente colonização no trato gastrintestinal (BEGLEY et al., 2005). O intestino delgado contém altas concentrações de ácidos biliares que podem inibir ou inativar bactérias, e para um probiótico ser efetivo deveria ser capaz de crescer em concentrações de 0,15 a 0,3% de sais biliares (GOLDIN; GORBACH, 1992). A resistência aos sais de bile varia muito entre as espécies de *Lactobacillus*. Considera-se que a concentração deva ser de 0,3% (p/v) de bile para ser usada como seleção de espécies probióticas para humano (PENNACCHIA et al, 2004).

Os compostos fenólicos podem ser formados no intestino por bactérias que desaminam alguns aminoácidos aromáticos provenientes da dieta ou produzidos por proteínas endógenas. A degradação de proteínas resulta na formação de vários metabólitos potencialmente tóxicos. As bactérias da microbiota intestinal produzem substâncias como aminas, indóis, gás sulfídrico e também o fenol, todos são considerados nocivos e podem causar danos intestinais, portanto a saúde do hospedeiro e o estabelecimento de lactobacilos, por exemplo, podem ser afetadas

pela produção desses compostos tóxicos, sendo estes micro-organismos capazes de crescer na presença de até 0,5% do composto fenol (PAULO, 1991).

Portanto, a resistência ao fenol pode ser usada como indicação da capacidade de sobrevivência intestinal das culturas bacterianas. Alguns autores sugerem que a concentração de 0,4% de fenol causa ação bacteriostática para alguns microrganismos. Espécies de *Lactobacillus acidophilus* mostraram alta tolerância (0,4-0,5%) para com o fenol.

A adesão bacteriana depende em parte de interações reversíveis ou irreversíveis. O estágio inicial é reversível e está envolvido por um complexo de interações físico-químicas, incluindo hidrofobicidade, que é considerada inespecífica, mas uma propriedade importante (PELLETIER, 1997). O estudo da adesão das bactérias à superfície requer o conhecimento das características físico-químicas da bactéria e do substrato e da interação entre elas. Em geral, ambas as superfícies possuem uma carga global negativa, e para que ocorra a adesão é necessário que a barreira de repulsão eletrostática seja superada pela força atrativa.

Segundo Garcia (1999) a característica de hidrofobicidade é um indicativo importante para uma absorção primária, entretanto, há necessidade de que várias outras condições sejam atingidas posteriormente, para que a aderência e colonização ocorram. Assim, os testes *in vitro* precisam ser complementados *in vivo* para que se tenha um quadro mais conclusivo.

A hidrofobicidade é um parâmetro que está associado à patogenicidade, uma vez que relaciona-se com a capacidade das cepas em aderir à superfícies animadas ou inertes (TOGNIN, 1996). Entretanto propõe-se que a hidrofobicidade é o modulador primário para adesão de microrganismos hidrofóbicos (MARIN et al., 1997).

A hidrofobicidade e a carga elétrica da superfície bacteriana são forças físico-químicas envolvidas na aderência de microrganismos às superfícies sólidas. A hidrofobicidade está relacionada a componentes hidrofóbicos presentes na membrana externa do microrganismo. Acredita-se que interações hidrofóbicas apresentam papel relevante na adesão de microrganismos (DENYER et al. 1993).

A capacidade de aderir às células derivadas da mucosa intestinal ou à própria mucosa, foi demonstrada em trabalhos pela maioria das cepas de *Lactobacillus* e utilizadas como probióticos (TRABULSI; SAMPAIO, 2000).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi conduzido no Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *Campus* Marechal Cândido Rondon, onde se laborou o isolamento e identificação de cepas de lactobacilos para posterior avaliação quanto tolerância de substâncias inibidoras, condições ácidas dos isolados como também efeito de inibição de bactérias lácticas isoladas sobre a bactéria patogênica (*Escherichia coli*).

#### **3.1 Coleta e preparo das amostras**

Foram coletadas por meio de swab nove amostras das fezes de nove leitões sem sinais clínicos de patogenia na fase de maternidade possuindo de 3 a 10 dias de idade. Os animais pertenciam a uma propriedade localizada no Município de Marechal Cândido Rondon, no Oeste do Paraná. Foram pesadas um grama da amostra e adicionada em 10 mL de caldo Rogosa (LBS) estéril em autoclave a 121°C por 15 minutos e incubado a 37°C por 24 horas sob microaerofilia. Para o isolamento das bactérias foi realizado estrias por esgotamento com auxílio da alça de platina sendo utilizado o Agar MRS estéril (de MANN; ROGOSA; SHARPE, 1962), com pH ajustado para 5,4 adicionado de acetato e púrpura de bromocresol, com incubação a 37°C.

#### **3.2 Isolamento e Seleção das Colônias**

As colônias que mostraram características típicas de *Lactobacillus spp* no Agar MRS, foram transferidas assepticamente com alça de platina, para tubos contendo caldo MRS estéril (121°C/15 min). Após incubação dos tubos a 37°C durante 24 horas, os tubos que apresentaram crescimento (turvação), foram submetidos a coloração de Gram, de esporos (utilizando corante verde malaquita) e ao teste de catalase (produção de catalase verificada pela adição de peróxido de hidrogênio nas lâminas). Todos os cultivos que apresentaram formas de bastonetes

Gram positivos, catalase negativa, não esporogênicos e estáveis às repicagens em termos de manutenção da atividade foram selecionados.

### **3.3 Reativação**

A reativação dos isolados foi realizada a partir de 1% (v/v) das culturas congeladas (um mL da amostra, dois mL de caldo MRS estéril e dois mL de glicerol 20% estéril) em um freezer convencional a -18° C, inoculadas em caldo MRS e posteriormente incubadas a 37° C durante 24 horas. Este procedimento foi repetido três vezes.

### **3.4 Resistência a Condições Ácidas**

Foi realizado um experimento em esquema fatorial 2x4x16, sendo dois valores de pH (caldo MRS com pH 3,0 e 6,5 ajustado através da adição de HCl), 4 tempos (0, 1, 2, 3 horas) e 16 isolados. Determinou-se a contagem das células viáveis através da semeadura em Agar MRS (LIN; CHEN, 2000).

### **3.5 Tolerância aos Sais Biliares**

Para a avaliação da habilidade de crescimento na presença de sais biliares das culturas isoladas foi utilizada a técnica descrita por Lin et al (1991) e Neumann e Ferreira (1995). Assim, após três reativações em caldo MRS (idem 3.3), as culturas foram repicadas na proporção de 1% (v/v) mL caldo MRS adicionado de 0,3% de sais de bile (p/v) e incubadas a 37°C. A absorbância do cultivo foi determinada em espectrofotômetro a 620 nm, nos tempos 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 horas. Paralelamente, foi determinada a absorbância de um cultivo controle inoculado e incubado sob as mesmas condições porém, isento de bile.

### 3.6 Determinação de Tolerância ao Fenol

A tolerância ao fenol foi determinada por técnica descrita por Paulo (1991). A tolerância ao fenol foi verificada inoculando-se 1%(v/v) da cultura ativa em 100mL de leite desnatado reconstituído (LDR) estéril a 10%, contendo 0,3% de solução fenol, posteriormente foram incubadas por 48 horas e após este período foi determinado o pH e acidez titulável por titulação com NaOH 0,1N.

### 3.7 Resistência Enzimática

Na determinação de resistência dos isolados a enzima lisozima foi inoculado 2 % (v/v) da cultura ativa em 10mL de caldo MRS sem e com lisozima e incubados a 37° C por 24 horas. O crescimento foi verificado nos tempos 0 e após 24 horas em placas de Petri contendo Agar MRS.

A enzima lisozima foi preparada 0,1 % mg/L, onde dissolveu-se 0,1 g de lisozima em 65 mL de HCl 0,01 N, aquecido por 20 minutos a uma temperatura de 100° C, posteriormente adicionado assepticamente 35 mL HCl 0,01 N estéril.

### 3.9 Adesão “*In Vitro*” dos Isolados

A hidrofobicidade relativa de superfície celular das culturas dos lactobacilos foi determinada usando o teste de adesão do micro-organismo ao hidrocarboneto, de acordo com Flint et al (1997). As culturas foram centrifugadas a 3.000xg durante 10 minutos e as células assim obtidas foram ressuspensas em 10 mL de água destilada estéril até atingir uma D.O<sub>600</sub> entre 1,2 a 1,6. Alíquotas de 3mL de cada suspensão de células foram adicionadas a igual volume de xileno e homogeneizadas aproximadamente 5 segundos em um vortex. Em seguida, após 10 minutos de incubação a 30° C, as amostras foram vigorosamente agitadas em vortex por 2 minutos à temperatura ambiente. Após repouso de 20 minutos, houve uma separação das fases e a absorbância da fase aquosa foi medida a 600 nm. A porcentagem de hidrofobicidade foi determinada a partir da D.O inicial da suspensão

bacteriana ( $A_1$ ) e da D.O da fase aquosa após a separação ( $A_f$ ) usando a fórmula  $(A_1 - A_f) A_1 \times 100$ .

### 3.9 Crescimento em Diferentes Temperaturas

A capacidade dos isolados de crescerem em diferentes temperaturas foi avaliada utilizando-se culturas ativas inoculadas na proporção de 1% (v/v) em tubos contendo 10mL de caldo LDR (leite desnatado reconstituído a 10%) e incubadas a 15° C por 15 dias, a 37° C por dois dias e a 45° C por três dias. O crescimento foi observado pela formação de coágulo no leite no tempo indicado.

### 3.10 Efeito Antagônico dos Isolados – Método de Multicamadas

Primeiramente foram adicionados sete (7) mL de caldo MRS com 1,4% de Agar estéril distribuídos de forma asséptica em placas de Petri constituindo assim a primeira camada de meio. Após a solidificação, foi colocada uma segunda camada de caldo MRS contendo 0,7% de Agar, inoculado com os lactobacilos e diluídas para obter um número entre 20 e 100 UFC por placa. A terceira camada era constituída de caldo MRS com 0,7% de Agar com inóculo (isolados ativos). As placas assim preparadas foram incubadas a 37° C durante três dias e após esse período colocada uma última e quarta camada de MRS com 0,7% de Agar, inoculado com cepas patogênicas de *Escherichia coli* (obtidas do Banco de Culturas Fiocruz-RJ), incubadas em caldo BHI (Infusão de Cérebro e coração) por 20 horas a 37° C (DIEP et al., 1995, modificada), sendo observado se houve crescimento da bactéria patogênica.

### 3.11 Análise Estatística

Os dados foram analisados pelo programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2002). As médias dos tratamentos foram comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram isoladas 92 colônias, de amostras de fezes de leitões, essas colônias pré-selecionadas foram submetidas à prova de catalase onde 60 reagiram negativamente. As 60 colônias catalase negativas foram submetidas à coloração de Gram onde foram avaliadas suas morfologia. Destas, 16 apresentaram formas de bacilos.

### 4.1 Resistência a Condições Ácidas

Os resultados de resistência à acidez dos isolados selecionados se apresentam na Tabela 01.

Tabela 1. Crescimento (log UFC/mL) dos isolados expostos ao ácido clorídrico (HCl 0,1M) por até 3 horas.

Isolados	Tempo (hs)			
	0	1	2	3
L01 cont	7,58 a	6,65 a	7,30 a	7,30 a
L01 pH 3,0	7,09 b	5,63 b	0,00 b	0,00 b
L02 cont	7,55 a	7,67 a	7,65 a	6,09 a
L02 3,0	6,33 b	5,43 b	0,00 b	0,00 b
L03 cont	6,08 b	7,41 a	7,03 a	7,13 a
L03 pH 3,0	7,25 a	6,24 b	6,71 b	4,99 b
L04 cont	6,95 a	5,6 a	6,56 a	7,05 a
L04 pH 3,0	6,78 b	6,62 b	4,63 b	4,44 b
L05 cont	6,70 b	6,59 a	6,41 a	6,62 a
L05 pH3,0	7,34 a	3,35 b	0,00 b	0,00 b
L06 cont	6,75 a	7,40 a	7,19 a	6,96 a
L06 pH3,0	6,23 a	4,42 b	0,00 b	0,00 b
L07 Cont	8,26 a	7,53 a	8,09 a	8,14 a
L07 pH3,0	8,01 b	4,41 b	1,98 b	0,00 b
L08 Cont	6,99 a	7,26 a	7,21 a	7,52 a
L08 pH3,0	6,95 b	3,53 b	3,27 b	3,55 b
L09 Cont	8,00 b	8,02 a	7,41 a	7,16 a
L09 pH3,0	8,38 a	4,45 b	2,19 b	0,00 b
L10 Cont	7,28 b	6,20 a	7,69 a	8,02 a
L10 pH3,0	7,29 a	2,27 b	1,19 b	0,00 b
L11 Cont	6,99 a	7,07 a	7,05 a	7,04 a
L11 pH3,0	6,80 b	5,33 b	2,67 b	0,00 b
L12 Cont	6,60 a	6,70 a	6,70 a	6,74 a

<b>L12 pH3,0</b>	5,94 b	5,20 b	0,00 b	0,00 b
<b>L13 Cont</b>	6,72 b	6,99 a	7,02 a	6,85 a
<b>L13 pH3,0</b>	6,81 a	3,71 b	0,00 b	0,00 b
<b>L14 Cont</b>	6,79 a	6,76 a	6,84 a	6,76 a
<b>L14 pH3,0</b>	6,10 b	5,24 b	2,61 b	2,56 b
<b>L15 Cont</b>	6,80 a	7,13 a	6,96 a	6,77 a
<b>L15 pH3,0</b>	6,34 a	5,37 b	4,37 b	4,33 b
<b>L16 Cont</b>	6,57 a	6,69 a	6,77 a	6,88 a
<b>L16 pH3,0</b>	6,49 b	6,20 b	0,00 b	0,00 b

\* Valores médios provenientes de 3 repetições em log (UFC/mL).  
Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% (p<0,05).

Através da Tabela 1, pode ser observado que os isolados L03, L04, L07, L08, L09, L10, L11, L14 e L15 resistiram ao pH 3,0 nos tempos de 0, 01 e 02 horas, já os isolados L03, L04, L08, L14, L15 resistiram ao pH 3,0 até o tempo de 03 horas, indicando que esses isolados suportam melhor a passagem pelo estômago do animal.

Verificou-se que no tempo 0 não houve diferença significativa nas contagens, pelo teste de Tukey ( $p \geq 0,05$ ), entre pH controle e pH 3,0 nos isolados L 06 e L15, respectivamente. Para todos os isolados houve diferença significativa nos tempos 01, 02 e 03 horas (Tabela 01). Para todos os isolados foram encontrada diferença significativa entre o controle e o pH 3,0.

Houve interação significativa entre os fatores tempo e pH sendo demonstrado na Figura 1, através de uma curva de regressão o crescimento dos isolados que resistiram as 3 horas em pH 3,0.

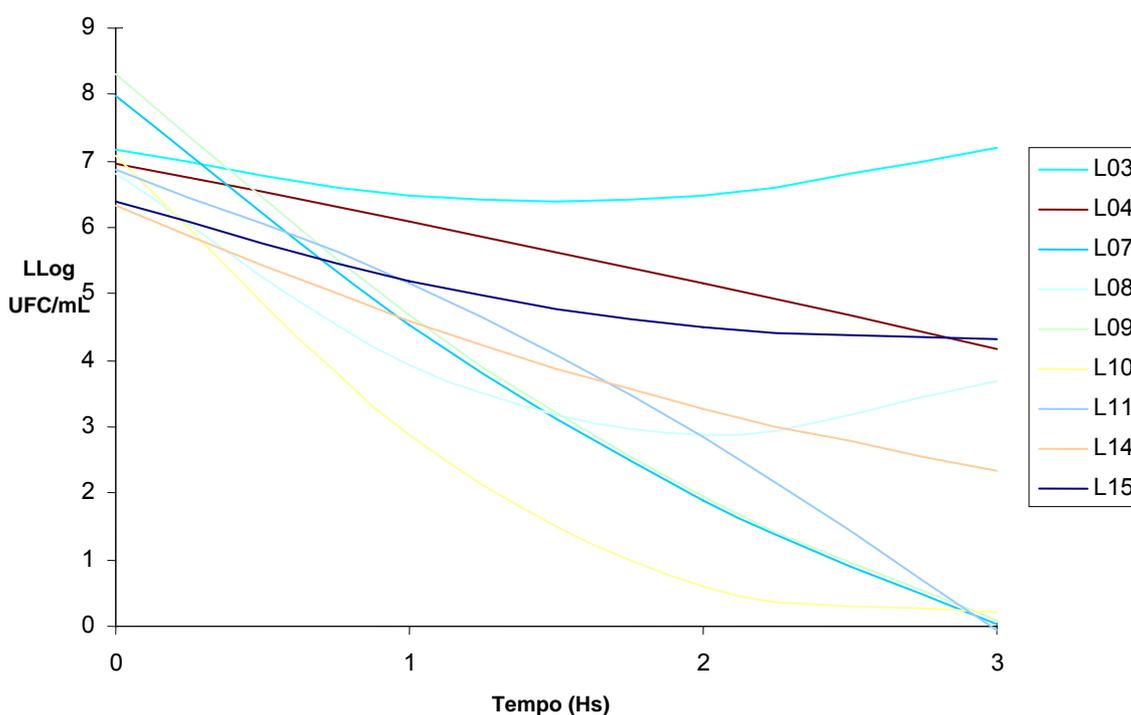


FIGURA 1. Curva de regressão de crescimento (Log UFC/mL) dos isolados expostos ao ácido clorídrico que resistiram ao 3 horas.

Na tabela 2 estão expressas as equações de regressão.

Tabela 2. Equações de regressão e estimativa dos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) dos isolados que resistiram após 3 horas em pH 3,0.

Isolados	Equação	Coefficiente de determinação $R^2$
L03	$0,3608x^2 - 1,0715x + 7,18017$	0,50*
L04	$-0,02833x^2 - 0,84433x + 6,964$	0,83**
L07	$0,4025x^2 - 3,85317x + 7,9735$	0,99**
L08	$0,92417x^2 - 3,81683x + 6,81983$	0,96**
L09	$0,435x^2 - 4,045x + 8,3$	0,99**
L10	$0,95667x^2 - 5,16667x + 7,0933$	0,97**
L15	$0,2525x^2 - 1,45517x + 6,40483$	0,96**
L14	$0,20417x^2 - 1,93817x + 6,3235$	0,90**
L11	$-0,30167x^2 - 1,40233x + 6,86267$	0,99**

\* e \*\* significativo pelo teste F ao nível de 1 e 5% de significância.

Martins et al (2006) avaliando o perfil de resistência a pH baixo das culturas isoladas de fezes de suínos, verificou que apenas 18% dos isolados obtiveram menos que 1 RD (Redução Decimal) quando cultivados em meio com pH ajustado a 3,0. Cerca de 36,5% apresentaram RD entre 1 e 2 e 45,5% tiveram mais que 2 RD. Nenhum dos isolados avaliados teve capacidade de crescer em meios específicos com o pH ajustado para 3,0.

Du Toit et al. (1998), avaliou a capacidade de lactobacilos isolados das fezes de suínos crescerem em diferentes valores de pH e observou que algumas cepas analisadas tiveram capacidade de crescer em pH 3,0 e 4,0, em contrapartida, outras não resistiram a pH 3,0. Estes últimos isolados passariam pelo estômago, porém em menor número. Algumas cepas tiveram a vantagem de tolerarem condições mais ácidas, e sobreviveriam no estômago em casos extremos (pH 2,0).

Oliveira (2006), constatou que as células de *Lactobacillus acidophilus* se mostram pouco resistentes às condições ácidas estudadas, já que após o período de 3 horas de incubação foi verificada uma redução significativa na contagem das mesmas, de até 3 ciclos logarítmicos em pH 1,0 e de 1 ciclo logarítmico em pH 3,0.

Fuchs (2006), verificou *Lactobacillus casei* resistentes a condições ácidas, onde os valores de pH testados foram 6,0, 4,0 e 2,0 nos tempos 0, 1,5 e 3,0 horas, evidenciando assim uma importante característica probiótica. Desta forma, o micro-organismo é capaz de ultrapassar a primeira barreira fisiológica do organismo que possui um baixo valor de pH encontrado no estômago (GIBSON, 2004).

Segundo Lin et al. (2006), as bactérias ácido lácticas são significativamente afetadas pela acidez pois células viáveis decrescem de 14,33 a 33,30% após 3 e 6 horas de incubação, respectivamente, em pH 2,5; em pH 3,0, apresentaram decréscimos menores que 11,35%.

## 4.2 Tolerância aos Sais Biliares

O limite de concentração de sais biliares, a que culturas deveriam suportar, não é um valor definido e deve estar na faixa de 0,03 a 0,3%, simulando a concentração do trato gastrointestinal segundo Fujisawa e Mori (1996). Segundo Gilliliand et al (1984), para uma bactéria ser considerada resistente à bile está deverá atingir, o valor de 0,3 de absorbância após seis horas de incubação.

As culturas L03 e L14 são consideradas resistentes, por apresentarem um crescimento rápido, onde atingem um valor de densidade óptica (D.O) 0,513 e 0,525 em cinco e seis horas, porém verificou-se que as curvas de crescimento destas culturas não são semelhantes pois o isolado L03 apresentou um rápido crescimento entre o tempo quatro e cinco horas, onde o valor da D.O. foi de 0,038 para 0,513 e

assim manteve-se até o tempo de seis horas, já a cultura L14, manteve um crescimento gradativo e uniforme atingindo um valor de D.O. 0,525 em 6 horas.

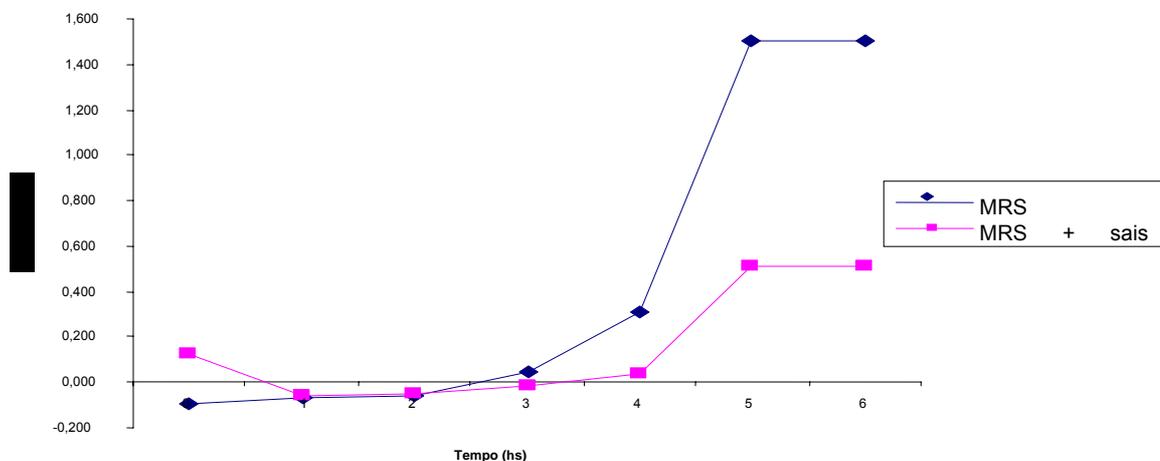


Figura 2. Curva de crescimento do isolado L 03 em caldo MRS normal e MRS contendo 0,3% de sais biliares.

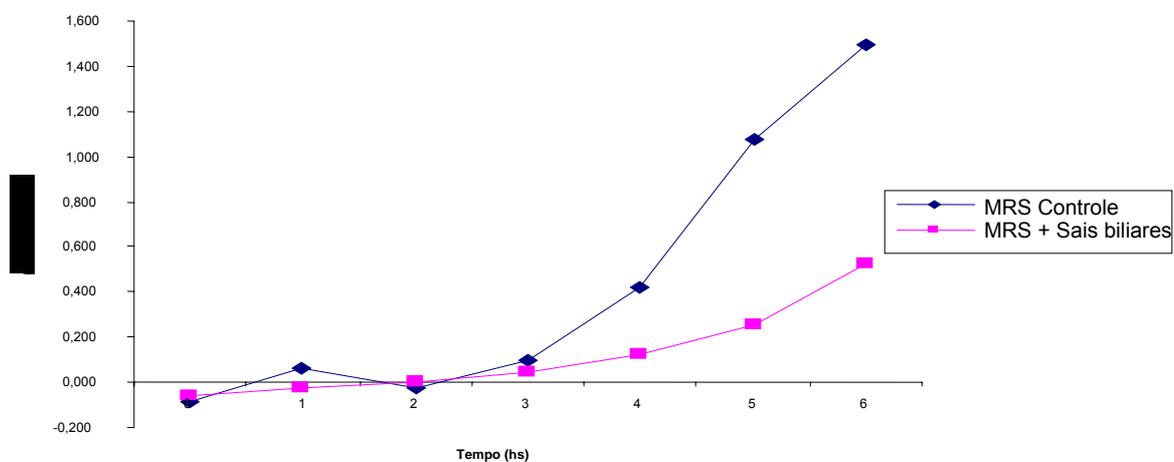


FIGURA 3. Curva de crescimento do isolado L14 em caldo MRS normal e MRS contendo 0,3% de sais biliares.

As culturas que apresentaram desenvolvimento rapidamente foram consideradas tolerantes, sendo estas as cepas L01, L02, L05, e L08. Esses isolados não atingiram valor de D.O. 0,3 em seis horas, obtendo os seguintes valores 0,122, 0,127, 0,132 e 0,129 respectivamente. **As figuras 4, 5, 6 e 7** representam a curva de crescimento das mesmas.

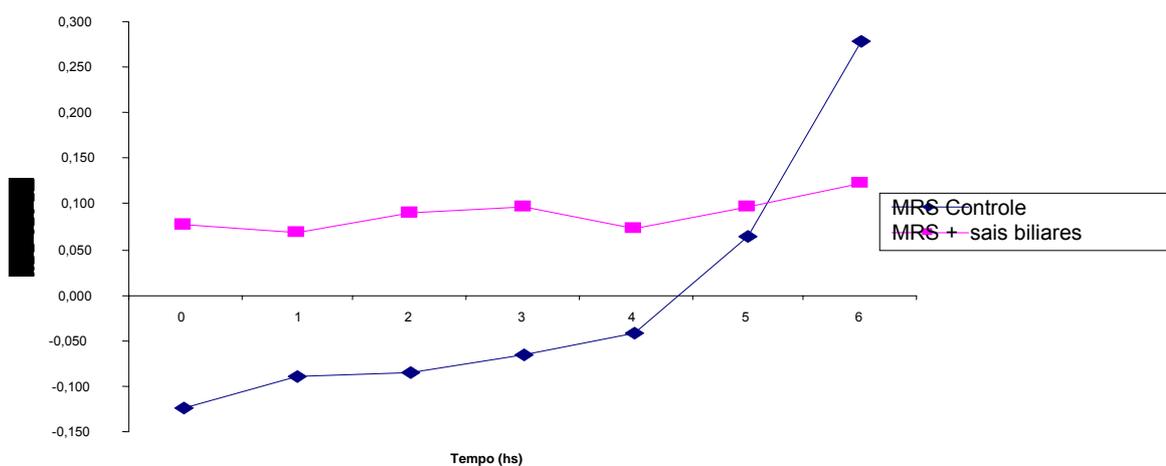


FIGURA 4. Curva de crescimento do isolado L01 em caldo MRS normal e MRS contendo 0,3% de sais biliares.

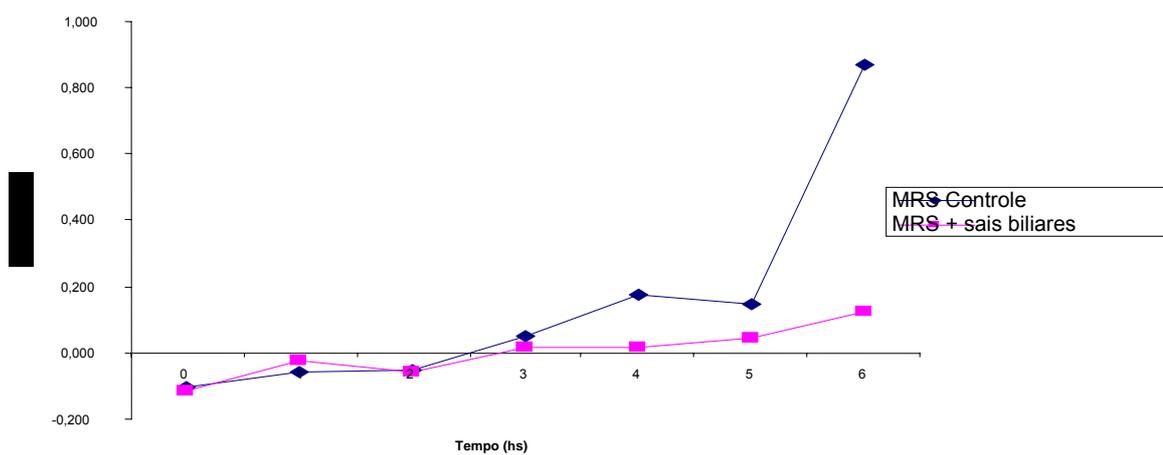


FIGURA 5. Curva de crescimento do isolado L02 em caldo MRS normal e MRS contendo 0,3% de sais biliares.

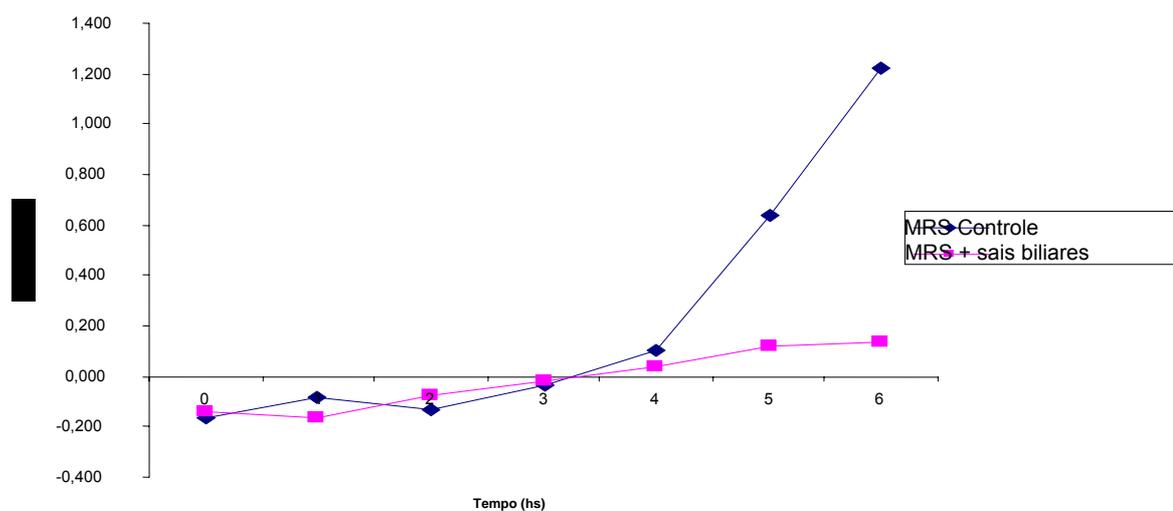


FIGURA 6. Curva de crescimento do isolado L05 em caldo MRS normal e MRS contendo 0,3% de sais biliares.

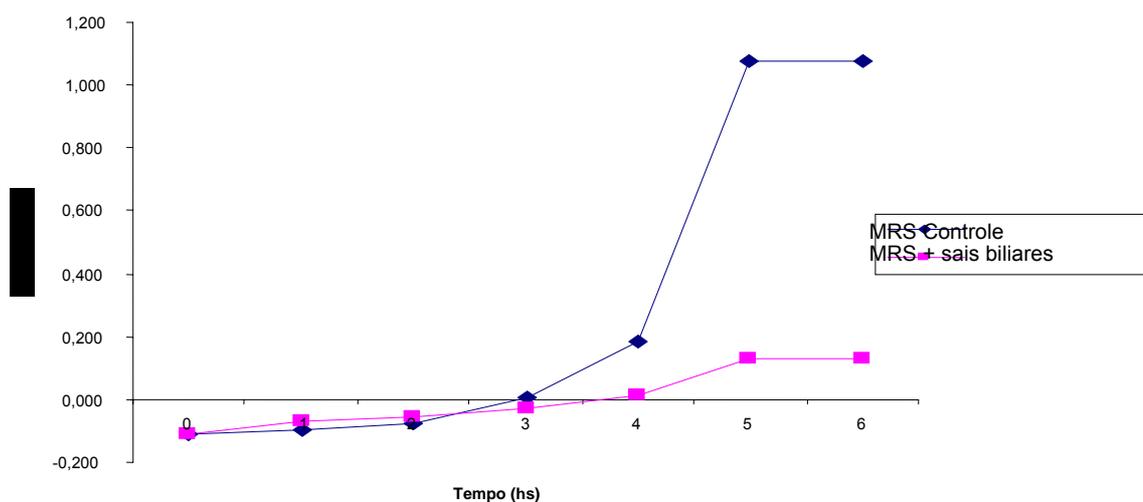


FIGURA 7. Curva de crescimento do isolado L08 em caldo MRS normal e MRS contendo 0,3% de sais biliares.

As culturas L10 e L15 obtiveram um crescimento baixo perante aos outros isolados na presença de sais biliares se mantendo ativas, porém, sem um crescimento contínuo, apresentando-se pouco tolerantes. Já as culturas L04, L06, L07, L09, L11, L12 e L13 não apresentaram crescimento em nenhum dos tempos estudado, considerando-as intolerantes a presença de sais biliares.

Em um estudo realizado por Martins et al. (2006), somente cerca de 36,5% dos isolados cresceram em meio de cultivo adicionado de 0,3% de sais biliares. Du Toit et al. (1998), isolando lactobacilos das fezes de suínos observaram que nem

todas as cepas apresentaram crescimento na presença de sais biliares, das cepas encontradas, estes autores constataram que 64,3% tiveram capacidade de hidrolisar sais biliares.

Chateau et al. (1994) avaliaram o efeito dos sais de bile em 38 cepas de *Lactobacillus* (principalmente *L. rhamnosus*) isolados de probióticos comerciais, sendo observado variação de sensibilidade. Das 22 cepas de *Lactobacillus rhamnosus*, três foram classificadas como resistentes, cinco como tolerantes, três com baixa tolerância e onze como sensíveis.

Jin et al (1998) estudou a tolerância a bile de lactobacilos isolados do intestino de aves, e das 10 linhagens, uma delas foi pouco afetada por 0,3% de sais biliares e duas não foram afetadas. Garcia (1999) observou que 52% das culturas (11 isolados), apresentaram uma absorvância maior do que 0,3 e segundo Gilliland (1996), seriam consideradas resistentes a bile.

### 4.3 Determinação de Tolerância ao Fenol

Os isolados selecionados foram testados verificando sua tolerância ao fenol, seus respectivos resultados estão apresentados na Tabela 3

Tabela 3. Valores determinados de pH e porcentagem de acidez titulável dos isolados cultivados em LDR (Leite desnatado reconstituído) a 10% sem e com adição de 0,3% de fenol, incubados por 3 dias a 35°C.

Isolados	pH controle	pH com fenol	% Acidez controle	% Acidez com fenol	% Redução da acidez
L 01	5,41	5,61	0,4213	0,3933ab	6,64
L 02	5,70	5,89	0,3536	0,3094b	12,50
L 03	5,54	5,64	0,3992	0,2725b	31,73
L 04	5,69	5,89	0,3421	0,3094b	9,55
L 05	5,75	5,86	0,2666	0,2460b	7,72
L 06	5,99	6,07	0,3550	0,2950b	22,91
L 07	5,34	5,55	0,4965	0,4331a	12,76
L 08	5,54	5,70	0,4207	0,4036a	4,06
L 09	5,51	5,59	0,5180	0,4243a	18,05
L 10	5,54	6,01	0,3903	0,2976b	23,75
L 11	5,65	5,77	0,6568	0,3642ab	44,54
L 12	5,54	5,76	0,4081	0,3801ab	6,86
L 13	5,58	5,84	0,4198	0,3727ab	11,21

L 14	5,60	5,92	0,5186	0,3727ab	28,13
L 15	5,63	5,92	0,3885	0,3535ab	9,00
L 16	5,49	5,80	0,4115	0,3948ab	4,05

\*Valores médios provenientes de 3 repetições.

% redução= % de acidez sem fenol- % de acidez com fenol/ % de acidez sem fenol.

Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Os isolados L07, L08, L09 apresentaram uma maior percentagem de acidez na presença de fenol e assemelham-se estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, diferindo dos isolados L02, L03, L04, L05, L06 e L10 os quais apresentaram uma baixa acidificação na presença de fenol, seus respectivos valores de pH foram: 5,89, 5,64, 5,89, 5,86, 6,07, 6,01.

Os isolados L03, L06, L10, L11, L14 apresentaram uma maior percentagem de redução da acidez. Entretanto os isolados L01, L04, L05, L08, L12, L15 e L16, por apresentarem uma menor percentagem de redução, pois são os que melhor resistiram a este composto.

Garcia (1999), verificou em um estudo que as linhagens de *Lactobacillus acidophilus* apresentaram sensibilidade ao fenol diminuindo a produção de ácido em 45,79 a 79,46%. Conseqüentemente os valores de pH também foram afetados, porém as cepas selecionadas, LC22b e RL24c, relevaram uma maior resistência a este composto.

Pozza (2006), encontrou valores encontrados neste estudo, onde obteve pH entre 5,17; 5,20; 5,25, mas segundo Ronka et al. (2003) esses valores de pH estão acima do considerado desejado a um produto fermentado pois esses deveriam oscilar entre 4,4 e 4,6 portanto esses isolados apresentaram uma baixa acidificação do leite durante o período de incubação.

Alguns autores sugerem que a concentração de 0,4% de fenol causa ação bacteriostática para alguns micro-organismos. Espécies de *Lactobacillus acidophilus* mostram alta tolerância (0,4-0,5%) frente ao fenol (PANCHENIAK, 2005). Baseado em pesquisas visando o isolamento de probióticos para suínos, algumas cepas de *Lactobacillus acidophilus* possuem crescimento na presença de 0,3% de fenol reforçando a importância dessa característica nas cepas probióticas (PAULO, 1991).

Chaves (1999) em sua pesquisa verificou que 50% dos isolados obtiveram um crescimento na concentração de 0,3% de fenol; mesmo nas concentrações de 0,4%

e 0,5% de fenol, alguns isolados apresentaram algum crescimento e os resultados foram semelhantes aos resultados encontrados por Paulo (1991), que utilizou *Lactobacillus acidophilus* isolados de fezes de suínos.

#### 4.4 Resistência à lisozima

Com relação à resistência dos isolados à enzima lisozima, pode-se observar que os isolados L03, L05, L06, L09, L10, L11, L12, L13, L14 e L16 tiveram seu desenvolvimento afetado ( $p < 0,05$ ) quando na presença deste agente inibidor (crescimento-Delta) sendo as demais cepas consideradas resistentes.

Tabela 4. Crescimento dos isolados na ausência e presença da enzima lisozima após 24h.

Isolados	Lisozima	
	Ausência (MRS controle)	Presença (MRS + lisozima)
L 01	2,00a	1,91a*
L 02	2,36a	2,15a
L 03	2,16a	1,79b
L 04	1,18a	0,97a
L 05	2,31b	2,60a
L 06	1,14a	0,85b
L 07	1,83a	2,49a
L 08	1,88a	1,34a
L 09	2,91a	1,80b
L 10	1,28b	1,80a
L 11	1,53a	1,02b
L 12	1,28a	0,75b
L 13	2,48a	1,66b
L 14	3,08a	1,41b
L 15	1,68a	1,50a
L 16	2,31a	1,69b

\* Valores médios provenientes de 3 repetições, expressos em log (UFC/mL)

Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível 5% de probabilidade.

Crescimento (Delta) =  $\log_{10}$  (População Final) -  $\log_{10}$  (População Inicial).

Santos (1984), caracterizou o isolado *Lactobacillus* UFV H2b20 apresentando resistência a condições semelhantes às do trato gastrointestinal, com altas concentrações a presença de lisozima (AGOSTINHO, 1988).

Vakil et al. (1969), trabalhando com diversos micro-organismos em testes de resistência a lisozima proveniente do leite bovino, constataram que o *Lactobacillus casei* é um dos menos sensíveis a este lisozima.

Chassy e Giuffrida (1980) reportaram que os lactobacilos são mais resistentes à lisozima que os estreptococos; esta menor sensibilidade se deve à maior espessura e densidade da parede celular dos lactobacilos.

Segundo Vakil et al. (1969), a lisozima promove lise de certas bactérias, por hidrolisar a  $\beta$ -ligação entre o ácido murâmico e a glicosamina dos glicopolissacarídeos das paredes celulares destas bactérias.

Chaves (1999), verificou que os isolados, na sua totalidade, apresentaram taxas de lises bem inferiores à do *Micrococcus lysodeikticus* (microrganismo usado como controle de lise), que foi de 0,63% de transmitância/minuto para a lisozima do ovo e 1,82% para a lisozima do leite bovino.

#### 4.5 Adesão “*In Vitro*” dos Isolados

A partir do teste de adesão *in vitro* foram utilizados apenas os nove isolados que são: L03, L04, L07, L08, L09, L10, L11, L14, e L15.

Nos resultados obtidos, que estão apresentados na Tabela 04, verificou-se que o isolado L15, apresentou a maior média sendo estatisticamente semelhante aos isolados L09, L10, L11 por apresentar maior porcentagem de hidrofobicidade, porém, o L15 difere-se estatisticamente dos isolados L07 e L08 pois apresentaram uma menor média de hidrofobicidade.

Tabela 5. Hidrofobicidade de superfície das culturas isoladas.

Isolados	Média	
L03	75,793	b
L04	78,550	b
L07	5,020	c
L08	11,330	c
L09	82,920	ab
L10	82,120	ab
L11	80,715	ab
L14	76,810	b
L15	92,600	a

\* Valores obtidos sob curva de crescimento medido a 620nm.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, nas colunas, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A presença de determinados microrganismos no trato gastrointestinal é dependente de sua capacidade de adesão sobre as mucosas intestinais (FULLER, 1992). De acordo com Servi et al, (2003) o processo de aderência microbiana de

bactérias lácticas, inclui fatores com interação eletrostática, hidrofóbica e presença de ácidos lipoteicóicos.

Gopal et al., (2001), comparou as propriedades de adesão *in vitro* de três cepas probióticas de *Lactobacillus*, entre elas, o *L. helveticus*, em diferentes células intestinais humanas, incluindo HT-29 e Caco-2 e HT29-MTX, encontraram uma forte adesão das três cepas.

A hidrofobicidade é considerada um fator importante na adesão primária dos microrganismos hidrofóbicos a superfícies, existindo, para *Lactobacillus*, uma correlação entre esta e a capacidade de adesão (WADTRON et al., 1987).

Sabe-se que a aderência das bactérias à mucosa intestinal, sejam patogênicas ou não, envolve a participação de receptores específicos e inespecíficos. A interação entre esses elementos promove a fixação da bactéria à mucosa (aderência) o que impede sua eliminação pelo peristaltismo intestinal e pelas correntes de fluidos que tendem levá-las para o exterior do organismo. A capacidade de aderir às células derivadas da mucosa intestinal ou à própria mucosa, já foi demonstrada, para a maioria das cepas utilizadas como probióticos (TRABULSI; SAMPAIO, 2000).

O efeito protetor da microbiota intestinal tem sido estudado por muitos pesquisadores e tem sido relacionado com antagonismo bacteriano, efeito barreira, resistência à colonização ou exclusão competitiva (FULLER, 1995).

A propriedade de exclusão ou redução da aderência de enteropatógenos já foi demonstrada para vários probióticos, provavelmente sendo conseqüência do bloqueio de receptores que seriam utilizados pelos mesmos. A importância dessa propriedade é óbvia, pois ela contribui para o efeito protetor dos probióticos contra infecções intestinais (WALKER, 1998).

Pedersen et al (1989) citam que a aderência observada *in vitro* não implicaria em uma aderência *in vivo*. Esta afirmativa poderiam estar envolvendo a técnica utilizada para determiná-la já que, os resultados dos valores obtidos dos testes empregados são contestados (DEL RE et al. 1998).

De acordo com Lonnerdal (1998), a nutrição possui importante papel e causa efeitos sobre a microbiota intestinal. Alguns elementos presentes na alimentação irão atuar como estimuladores de crescimento para alguns microrganismos e como inibidores para outros, promovendo diferenças significativas na microbiota de um indivíduo e conseqüentemente de seu organismo como um todo.

Sabe-se que, dependendo das condições de cultivo, os lactobacilos produzem expolissacarídeos (SEVERO, 1995), e que uma vez aderindo-se à superfície corporal estes poderiam condicionar e alterar as características originais da superfície, permitindo uma posterior adesão (NEU, 1996).

#### 4.6 Crescimento em Diferentes Temperaturas

Os isolados L03, L04, L07, L08, L19, L10, L11, L14, L15 não cresceram a 15 °C em meio LDR, já a 45 °C os isolados L03, L07, L08, L19, L10 apresentaram um bom desenvolvimento e a 37 °C somente os isolados L08 e L11 apresentaram crescimento, os respectivos resultados estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Teste de crescimento em diferentes temperaturas

Isolado	Temperaturas °C		
	15°C	37°C	45°C
L03	-	-	+
L04	-	-	-
L07	-	-	+
L08	-	+	+
L09	-	-	+
L10	-	-	+
L11	-	+	-
L14	-	-	-
L15	-	-	-

\*Resultados médios provenientes de incubação ao LRD (Leite Reconstituído Desnatado) nas temperaturas de 15°C, 37°C e 45°C.

Os resultados foram expressos em positivos (presença) e negativos (ausência) de crescimento.

Gilliland (1996) verificou que o *Lactobacillus acidophilus* se caracteriza por não crescer a temperaturas de 15°C ou menores. De acordo com Reque (2000) os *Lactobacillus fermentum* tiveram um crescimento à temperatura de 45°C, mas não obteve crescimento em seus isolados a 15°C.

O fato de alguns isolados não apresentarem crescimento em LDR, poderia estar relacionado ao substrato nele contido, como insuficiência de nutrientes essenciais para o desenvolvimento dos micro-organismos estudados. Martins (1998) cita que o LRD pode apresentar suprimentos limitados de aminoácidos essenciais livres, porém, sabe-se que algumas enzimas fundamentais que atuam na

degradação da lactose só atuam em temperaturas em 25-35°C, o que pode-se considerar uma das causas do não crescimento desses isolados.

#### 4.7 Efeito Antagônico dos Isolados – Método de Multicamadas

Para verificar a inibição das nove bactérias isoladas sobre bactérias patogênicas, foi utilizado o método de Multicamadas. Este teste foi utilizado para verificar o antagonismo entre os isolados selecionados e a bactéria *Escherichia coli*, sendo as culturas separadas uma das outras por uma camada de ágar semi-sólido, o que impede o contato direto entre elas. Desta forma, qualquer substância inibidora deve difundir-se no ágar para exercer seu efeito sobre a bactéria indicadora. ou seja, deve ser extracelular e difusível (GONZÁLEZ et al., 1993; GARCIA, 1999).

As bactérias isoladas foram testadas com relação a sua capacidade de inibir *Escherichia coli*. Os resultados são mostrados na Tabela 06. Os testes realizados para verificar a atividade inibidora das culturas probióticas apresentaram resultados negativos (ausência), onde os isolados L03, L04, L08 e L09 foram capazes de inibir a *Escherichia coli*.

Tabela 7. Inibição da *Escherichia coli* patogênica por Lactobacilos isolados

Isolado	Inibição
L3	-
L4	-
L7	+
L8	-
L9	-
L10	+
L11	+
L14	+
L15	+

\* Resultados médios provenientes de incubação ao caldo MRS com Agar na temperatura de 37°C. Os resultados foram expressos em positivos quando há presença de crescimento(+) e negativos para ausência de crescimento(-).

Martins (2006), não detectou nenhum halo de inibição no teste de antagonismo realizado entre os isolados, indicando a possibilidade de cultivo simultâneo. Por outro lado, Dabés et al. (2001), isolou BAL (bactéria ácido lácticas) de produtos cárneos, verificaram que 79,5% das cepas estudadas não apresentaram atividade antimicrobiana frente aos microrganismos avaliados.

Gopal et al. (2001), observaram zonas claras de mesmo diâmetro ao redor de *Escherichia coli*, na presença de *L. rhamnosus* DR20 e *L. acidophilus*, indicando níveis similares de inibição. Tsai et al. (2005), observou que quando *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *S. aureus* foram usadas como bactérias indicadoras, *L. acidophilus* isolado de suínos inibiu o crescimento dessas bactérias.

Pereira (2007), realizou testes para verificar a atividade inibidora da cultura probiótica a partir da metodologia de multicamadas e encontrou resultados positivos, verificando a inibição de dois microrganismos indicadores utilizados, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Fang et al. (1996) adotaram duas variáveis da metodologia de multicamadas, cultivando o *L. acidophilus* em três meios de cultivo diferentes. Todas as variações demonstraram a inibição de *S. aureus* e *E. coli*.

Resultados semelhantes foram descritos anteriormente por Garcia (1999), onde o *L. acidophilus* La5 inibiu duas linhagens de *E. coli* de origem humana (*E. coli* 29.1 O119 e *E. coli* 64.1 OH7) e duas cepas de origem suína. González et al. (1993) verificaram a inibição de *E. coli*, cultivando uma cepa de *L. acidophilus* pela metodologia de multicamadas.

## 5 CONCLUSÃO

Os isolados L03, L04, L08, L09, L14 e L15, identificados neste trabalho apresentam melhores características para uso como probióticos, em função de demonstrarem um comportamento satisfatório sobre as condições ácidas, crescendo na presença de sais biliares e fenol, apresentando uma significativa percentagem de hidrofobicidade e inibindo *Escherichia coli*, portanto, cumprindo de modo eficiente as características desejadas no processo de seleção.

## REFERÊNCIAS

ABIPECS. Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína. 2006. Disponível em: <www.abipecs.com.br>. Acesso em: 19 jan. 2009.

AGOSTINHO, S.M.M. **Comportamento do *Lactobacillus acidophilus* H2B20 sob condições do trato digestivo “in vitro” e efeito de métodos de preservação em sua atividade**. Viçosa: UFV,1998. 70p. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de Viçosa, 1998.

ANDREATTI FILHO, R.L.; SAMPAIO, H.M. Probióticos e Prebióticos. **Revista Educação Continuada do CRMV-SP**, São Paulo, v.2, p.59-71, 1999.

ANGELIS, M.D.; GOBETTI, M. Environmental stress responses in *Lactobacillus*: A review. **Proteomics**, v.4, p. 106-122, 2004.

ARIHARA, K.; CASSENS, R.G.; LUCHANSKY, J.B. Characterization of bacteriocins from *Enterococcus faecium* with activity against *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, Chicago, n. 19, p. 123-134, 1993.

ÁVILA, F.A. et al. Use of vaccine and probiotic in the control of swine diarrhea caused by enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 50, n. 5, p. 505-511, 1998.

BEGLEY, M.; GAHAN, C.G.M.; HILL, C. The interaction between bacteria and bile. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 625-651, 2005.

BEGLEY, M.; HILL, C.; GAHAN, C.G.M. Bile Salt Hydrolase Activity in Probiotics. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 72, n. 3, p. 1729–1738, 2006.

BOLDUAN, G. Feeding weaner pigs without feed antibiotics. In: BIOTECHNOLOGY in the feed industry. Nottingham: Nottingham University Press, 1999. p. 223-230.

BOMBA, A. et al. Inhibitory effects of *Lactobacillus casei* upon the adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K99 to the intestinal mucosa in gnotobiotic lambs. **Small Ruminant Research**, v.23, p.199-206, 1996.

CAVALCANTI, S.S. **Produção de suínos**. São Paulo: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola. 299p. 1996.

CHASSY, B.M.; GIUFFRIDA, A. Method for the lysis of gram-positive, asporogenous bacteria with lysozyme. **Applied and Environmental Microbiology**, v.39, p.153-158, 1980.

CHATEAU, N.; DESCHAMPS, A.M.; HADJ SASSI, A. Heterogeneity of bile salts of *Lactobacillus* isolates of a probiotic consortium. **Letters Applied Microbiology**, v.18, p.42-44, 1994.

CHATEAU, N.; CASTELLANOS, I.; DESCHAMPS, A.M. Distribution of pathogen inhibition in the *Lactobacillus* isolates of a commercial probiotic consortium. **Journal of Applied Bacteriology**, v.74, p.36-40. 1993.

CHAVES, A.H. et al. Seleção de Isolados de *Lactobacillus acidophilus* Usados como Probiótico em Bezerros. **Rev. Bras. Zootec.**, Viçosa, v.28, n.5, p.1093-1101, 1999.

CROSS, M.L. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v.34, n.4, p.245-253. 2002.

DABÉS, A.C.; SANTOS, W.L.M.; PEREIRA, E.M. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de produtos cárneos frente a *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, p.136-140, 2001.

DE MAN, J.C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M.E. A medium for the cultivation of lactobacilli. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 23, p. 130-135, 1960.

DEL RE, B. et al. Autoaggregation and adhesion ability in a Bifidobacterium suis strain. **Lett. Appl. Microbiol.**, v.27, n.5, p.307-310, 1998.

DENYER, S.P.; GORMAN, S.P.; SUSSMAN, M. **Microbial biofilms**: formation and control. Londres: Blackwell Scientific Publications, 1993. 333p.

DIEP, D.B.; HAVARSTEIN, L. S.; NES, I.F. A bacteriocin-like peptide induces bacteriocin synthesis in *Lactobacillus plantarum* C11. **Mol. Microbiol.**, v.18, n. 4, p. 631-639, 1995.

DOBROGOSZ, W.J. et al. *Lactobacillus reuteri* and the enteric microbiota. In: GRUBB, R.; MIDTVELDT, T.; NORIN, E. eds. **The Regulatory and Protective Role of the Normal Microflora**. London: Macmillan Ltd, 1989. p. 69-96.

DU TOIT, M. et al. Characterisation and selection of probiotic lactobacilli for a preliminary minipig feeding trial and their effect on serum cholesterol levels, faeces pH and faeces moisture content. **International Journal Food Microbiology**, v.40, p.93-104, 1998.

EDENS, F.W.; PARKHURST, C.R.; CASA, I.A.; DOBROGOSZ, W. J. Principles of *ex ovo* competitive exclusion and *in ovo* administration of *Lactobacillus reuteri*. **Poultry Science**, v. 76, p. 179-196, 1997.

FANG, W. et al. Antagonism of lactic acid bacteria towards *Taphylococcus aureus* and *Escherichia coli* on agar plates and milk. **Veterinary Research**, Paris, v.27, n.1, p.3-12, 1996.

FAO- Food and Agriculture Organisation. Disponível em: <<http://apps.fao.org/page/collections=agriculture>>. Acesso em: 21 jan. 2009.

FERREIRA, C.L.L.F. **Prebióticos e probióticos**: atualização e prospecção. Viçosa: Suprema, 2000. 205p.

FERREIRA, D.F. **SISVAR**: Sistemas de análises de variância para dados balanceados: programa de análises estatísticas e planejamento de experimentos. Versão 4.3. Lavras: UFLA. 2002.

FUCHS, B.H.R, et al, Utilização de *Lactobacillus casei* e cultura iniciadora na obtenção de iogurte suplementado com inulina e oligofrutose. **B CEPRA**, v. 24,n 1, p. 83-98, 2006.

FUJISAWA, T.; MORI, M. Influence of bile salts on  $\beta$ -gluuronidase activity of intestinal bacteria. **Lett. Appl. Microbiol.**, v.22, p.271-274,1996.

FUKUSHIMA, Y. et al. Effect of a probiotic formula on intestinal immunoglobulin A production in healthy children. **International Journal of Food and Microbiology**, v.42, p.39-44. 1998.

FULLER, R. **Problems and prospects, in probiotics**: the scientific basis. London: Chapman & hall, 1995. p. 377-386.

FULLER, R. Probiotics in man and animals: a review. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 66, p. 365-378.1989.

FULLER, R. Probiotics: their development and use. In: OLD HERBORN UNIVERSITY SEMINAR MONOGRAPH, 1995, Herborn-Dill. **Probiotics: Prospects of Use in Opportunistic Infections**. Herborn-Dill: Institute for Microbiology and Biochemistry, 1995. p. 1-8.

FÜLLER, R.; COLE, C.B. The scientific basis of the probiotic concept. In: STARK, B.A.; WILKINSON, J.M. **Probiotic**: theory and applications. Marlaws: Chalcombe Publitions, 1988. p. 1-14.

GARCIA, S. **Isolamento e caracterização de bactérias lácticas para uso como probiótico**. Londrina, 1999. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina.

GARLICH, J.D. Microbiologia do tracto intestinal aviar. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE AVICULTURA, 1999, Lima. **Anais...** Lima: 1999. p.110-120.

GIBSON, G. R. Fibre and effects on probiotics (the probiotic concept). **Clinical Nutrition Supplements**, v.1. p. 25-31, 2004.

GILLILAND, S.E. Special Additional Cultures. In: COGAN, T.M.; ACCOLAS, J.P. (eds) **Dairy Starter Cultures**. London: VHC Publishers, p.233-247, 1996.

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

GOLDIN, B.R.; GORBACH, S.L.; SAXELIN, M. et al. Survival of *Lactobacillus species* (Strain GG) in human gastrointestinal tract. **Dig. Dis. Sci.**, v.37, n.1, p. 121-128, 1992.

GONZÁLEZ, S. N. et al. Inhibition of enteropathogens by lactobacilli strains used in fermented milk. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.56, n.9, p.773-776, 1993.

GOPAL, P.K. et al. In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR 20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. **International Journal of Food Microbiology**, v.67, p.207-216, 2001.

GUILLOT, J.F. The pros and cons of probiotics: make probiotics work for poultry. **Feed Mix**, v.23, n.8, p.28-30. 2000.

HOLZPAFEL, W.H. et al. Overview of gut flora and probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v.41, p.85-101. 1998.

HONG, H.A.; DUC, L.H.; CUTTING, S.M. The use of bacterial spore formers as probiotics. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 29, p. 813-835. 2005.

HUYGHEBAERT, G. Replacement of antibiotics in poultry. In: EASTERN NUTRITION CONFERENCE, 2003, Quebec City. **Anais...** Quebec City: UON, 2003. p.1-23.

ITO, N.M.K. et al. Saúde gastrointestinal, manejo e medidas para controlar as enfermidades gastrointestinais. In: PRODUÇÃO DE FRANGOS DE CORTE, 2004, Campinas. **Anais...** Campinas: FACTA, 2004. p 206-260.

JIN, L.Z.; HO, Y.W.; ZHAO, X. Probiotics in poultry: modes of action. **World's Poultry Science Journal**. v.53, p.351-368. 1997.

JIN, L.Z. et al. Acid and bile tolerance of *Lactobacillus* isolated from chicken intestinal. **Lett Appl. Microbiol.**, v.27, n.3, p. 183-185, 1998.

JOEGER, R.D. Alternatives to antibiotics: Bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. **Poult. Sci.**, v. 82, p. 640-647, 2003.

KAILA, M. et al. Enhancement of circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by human *Lactobacillus* strain. **Pediatric Research**, v. 32, p. 141-144, 1992.

KELLY, D.; KING, T.P. Digestive physiology and development in pigs. In: VARLEY, M.A.; WISEMAN, J. (Ed.). **The weaner pig: nutrition and management**. Nottingham, UK: CABI Publishing, 2001. cap.9, p. 179-206.

KLAENHAMMER, T. et al. Discovering lactic acid bacteria by genomics. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 82, p. 29-58, 2002.

KLEIN, G. et al. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. **International of Journal Food Microbiology**, v.41, p.103-125, 1998.

LANCINI, J.B. Fatores exógenos na função gastrointestinal, aditivos. In: FUNDAÇÃO APINCO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA. **Fisiologia da digestão e absorção das aves**. Campinas, 1994. p. 99-126.

LEEDLE, J. Intestinal microbiology: action mechanisms. In: SIMPÓSIO SOBRE ADITIVOS ALTERNATIVOS NA NUTRIÇÃO ANIMAL. Campinas, 2000. **Anais...** Campinas: CBNA, 2000a. p.1-14.

LEEDLE, J. Probiotics and DFM's: mode of action in the gastrointestinal tract. In: SIMPÓSIO SOBRE ADITIVOS ALTERNATIVOS NA NUTRIÇÃO ANIMAL, Campinas, 2000. **Anais...** Campinas: CBNA, 2000b. p.25-40.

LEMIEUX, F.M.; SOUTHERN, L.L.; BIDNER, T.D. Effect of mannan oligosaccharides on growth performance of weanling pigs. **J. Anim Sci.**, v. 81, p. 2482-2487. 2003.

LIN, M.Y.; CHEN, T.W. Reduction of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus* in culture broth. **J. Food Drug Anal.**, v. 8, p. 97-102, 2000.

LIN, M.Y.; SAVAIANO, D.; HARLANDER, S. Influence of non fermented dairy products containing bacterial starter cultures on lactose maldigestion in humans. **J. Dairy Sci.**, v.74, n. 1, p. 87-95, 1991.

LIN, W. H. et al. Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products. **Food Microbiology**, v. 23, p. 74-81, 2006.

LONNERDAL, B. **Efeitos da nutrição sobre a flora microbiana dos lactentes**: papel da lactoferrina, do ferro e dos nucleotídeos, Probióticos, Outros Fatores Nutricionais e a Microflora Intestinal. Vevey: Nestlé, 1998.

MAASSEN, C.B.M. et al. Strain-dependent induction of cytokine profiles in the gut by orally administered *Lactobacillus strains*. **Vaccine**, Oxford, v.18, n.23, p.2613-2623, 2000.

MARIN, M.L. et al. Lactic acid bacteria: hydrophobicity and strength of attachment to meat surfaces. **Lett. Appl. Microbiol.**, v.24, n.1, p.14-18, 1997.

MARTINS, J.F.P. Metabolismo protéico de aminoácidos. In: \_\_\_\_\_. **Bactérias lácticas no processamento de alimentos e nutracêutica**. Rio de Janeiro: UFRRJ, 1998.

MARTINS. O.D.A. et al. Resistência de bactérias lácticas, isoladas de fezes de suínos e sua capacidade antagônica frente a microorganismos indicadores. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.5, n.1, p. 53-59, 2006.

McCRACKEN, B.A. et al. Weaning anorexia may contribute to local inflammation in the piglet small intestine. **Journal of Animal Nutrition**, v.129, p.613-619, 1999.

MENTEN, J.F.M. Aditivos alternativos na produção de aves: probióticos e prebióticos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38, 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 2001. p.141-157.

MILES, R. D. Manipulation of the microflora of the gastrointestinal tracts: natural ways to prevent colonization by pathogens. In: ALLTECH'S NINTH ANNUAL SYMPOSIUM: biotechnology in the feed industry. **Proceedings...** Nicholasville Technical, 1993. p. 133-150.

MOITA, A. M. S. et al. Exigência de proteína bruta de leitões de 12 a 28 dias de idade. **Rev. Bras Zoot**, Viçosa, v. 23, n. 5, p. 792-801, set./out. 1994.

MOLLY, K. Formulating to solve the intestinal puzzle. **Pig Progress**, v.17, p.20-22, 2001.

MULDER, R. W. A. W. Probiotics as a tool against Salmonella contamination. **World Poultry**, Misset, v. 7; p. 36-37, 1991.

NABUURS, M.J.A. Microbiological, structural and functional changes of the small intestine of pigs at weaning. **Pig News Information**, v.16, p.93-97, 1995.

NABUURS, M.J.A.; ZIJDERVELD, F.G.; DE LEEUW, P.W. Villus height and crypt depth in weaned and unweaned pigs, reared under various circumstances in the Netherlands. **Research in Veterinary Science**, v.55, p-78-84, 1993.

NEU, T.R. Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. **Microbiological Reviews**, v. 60, n.1, p.151-166, 1996.

NEUMANN, E.; FERREIRA, C.L.L.F. *Lactobacillus acidophilus* as dietary adjunct: in vitro susceptibility to gastric juice, bile salts, lysozyme and chemotherapeutic agents. **Rev. Microbiol.**, v. 26, n.1, p.59-65, 1995.

OHASHI, Y. et al. Strain gauge force transducer and its application in a pig model to evaluate the effect of probiotic on colonic motility. **J Nutr Sci Vitaminol**, Tokyo, v. 47, p. 351-356, 2001.

OLIVEIRA, A.A.P. **Pesquisa de substâncias tipo bacteriocina produzidas por amostras do gênero Fusobacterium isoladas da cavidade oral de primatas humanos e não humanos**, Belo Horizonte, 2006. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais.

OUWEHAND, A.C. et al. Adhesion of probiotic micro-organisms to intestinal mucus. **International Dairy Journal**, v. 9, p. 623-630, 1999.

PANCHENIAK, E.F.R. **Isolamento, Seleção, Caracterização Bioquímica e Molecular para Produção e Avaliação do Potencial Probiótico de *Lactobacillus Reuteri* Lpb P01-001 em Suínos**. Curitiba, 2005. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná.

PARDIO, V.T. et al. Los probióticos y su futuro. **Arch. Latinoam. Nutr.**, v. 4681, p.6-10, 1994.

PASSOS, JR. H. S. Nutrição e meio ambiente para leitões em sistema de produção com desmame precoce segregado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 8, 1997, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: ABRAVES, 1997. p. 41-54.

PAULO, E.M. **Isolamento e caracterização de *Lactobacillus acidophilus* de fezes de suínos para uso como probiótico.** Viçosa, 1991. 73 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

PEDERSEN, K.; TANNOCH, G.W. Colonization of the porcine gastrointestinal tract by lactobacilli. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.55, n.2, p.279-283, 1989.

PEDROSO, A.A. **Estrutura da comunidade de bactéria do trato intestinal de frangos suplementados com promotores de crescimento.** Piracicaba, 2003. 103p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

PELLETIER, C., et al. Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. **Applied Environmental Microbiology**, v. 63, p. 1725-1731, 1997.

PENNACCHIA, C. et al. Selection of *Lactobacillus* strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. **Meat Science**, v. 67, p. 309-317, 2004.

PEREIRA, V.G.; GÓMEZ R.J.H.C. Atividade antimicrobiana da *Lactobacillus acidophilus*, contra microrganismos patogênicos veiculados por alimentos. **Revista Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.28, n.2, p.229-240, abr./jun. 2007.

POUWELS, P.H.; LEAR, R.J.; BOERSMA, W.J. The potencial of *Lactobacillus* as a carrier for oral immunization: development and preliminary characterization of vector systems for targeted delivery of antigens. **Journal of Biotechnology**, v. 44, p. 183-192, 1996.

POZZA, M.S.S. **Análise da variabilidade genética, susceptibilidade a condições do trato gastrintestinal e fermentação de oligofrutose, inulina e goma acácia por isolados de lactobacilos.** Londrina, 2006. 91p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Londrina.

REQUE, E.F. et al. Isolation, identification and physiological study os *Lactobacillus fermentum* LPB for use as probiotic chickens. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 303-307, nov. 2000.

RONKA, E.; MALINEN, E.; SAARELA, M. Probiotic and milk technological properties of *Lactobacillus brevis*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 83, p. 63-74, 2003.

ROTH, L. The battle of the bugs – the direct fed microbial concept. **Pig Progress**, v. 16, p. 12-15, 2000.

SALMINEN, S., et al. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. **Brit. J. Nutr. Suppl.**, v. 1, p. 147–171, 1998.

SANTOS, N. S. **Isolamento e caracterização de *Lactobacillus acidophilus* de fezes de crianças alimentadas ao seio e de bezerros, visando a sua utilização como adjunto dietético**. Viçosa, 1984. 69p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, 1984.

SANTOS, W.G. et al. Efeito da monose como prebiótico sobre a morfologia intestinal de leitões na fase de creche. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 34., 2002, Recife. **Anais...** Recife: SBZ, 2002a.

SANTOS, W.G. et al. Efeito da monose como prebiótico sobre a morfologia intestinal (relação vilosidade/cripta) de leitões na fase de creche. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 34., 2002, Recife. **Anais...** Recife: SBZ, 2002b.

SCHREZENMEIR, J.; DE VRESE, M. Probiotics, prebiotics and synbiotics – approaching a definition. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 73, p. 361S-364S, 2001.

SEVERO, L.M.B. **Desenvolvimento de uma bebida láctea à base de soro de leite fermentado**. Londrina, 1995. 74p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, 1995.

SILVA da, E.N. Probióticos e prebióticos na alimentação de aves. In: CONFERÊNCIA APINCO'2000 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS. 2000, Campinas. **Anais...** Campinas: FACTA, 2000. p.241–251.

SILVA, E.N. Antibióticos intestinais naturais: bacteriocinas. In: SIMPÓSIO SOBRE ADITIVOS ALTERNATIVOS NA NUTRIÇÃO ANIMAL, Campinas, 2001. **Anais...** Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2001. p.15-24.

SILVA, S.H.; VIEIRA, E.C.; DIAS, R.S.; NICOLI, J.R. Antagonism against *Vibrio cholerae* by diffusible substances produced by bacterial components of the human faecal microbiota. **J. Med. Microbiol.**, v. 50, p. 161-164, 2001.

SNOEYENBOS, G.H.; SOERJADI, A.S.; WEINACK, O.M. Gastrointestinal colonization by salmonellae and pathogenic *Escherichia coli* in monoxenic and holoxenic chicks and poults. **Avian Dis.**, v. 26, p. 566–575, 1982.

SNOEYENBOS, G.H.; SOERJADI, A.S.; WEINACK, O.M. Gastrointestinal colonization by salmonella and pathogenic *Escherichia coli* in monoxenic and holoxenic chicks and poultry. **Avian Dis.**, Illinois, n. 26, p. 566, 1982.

STEWART, C.S.; CHESSON, A. Making sense of probiotics. **Pig Veterinary Journal**, v.31, p.11-33, 1993.

STOKES, C.R.; BAILEY, M.; HABERSON, K. Development and function of the pig gastrointestinal immune system. In: LINDBERG, J.E.; OGLE, B (Ed.). **Digestive physiology of pigs**. Wallingford: CABI Publishing, 2001. cap.16, p.59-66.

TOGNIN, M.C.B. Aconetobacter baumannii de origem hospitalar. **Caracterização bioquímica, resistência a antimicrobianos e fatores de virulência**. Londrina, 1996. Tese (Mestrado) - Universidade Estadual de Londrina.

TOURNUT, J. R. Probiotics. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA 35, 1998, Botucatu. **Anais...** Botucatu: SBZ, p. 179-199.1998.

TRABULSI, L.R.; SAMPAIO, M.M.S.C. **A composição e papel da microflora intestinal na saúde e proteção do organismo**: os probióticos e a saúde infantil. Brasil: Nestlé, 2000. v.1, p. 3-11, 2000.

TSAI, C.C. et al. Antagonistic activity against Salmonella infection in vitro and in vivo for two Lactobacillus strains from swine and poultry. **International Journal Food Microbiology**, v.102, n.2, p.185-194, 2005.

VAKIL, J.R. et al. Susceptibility of several microorganisms to milk lysozymes. **J. Dairy Sci.**, v. 52, p. 1192-1197, 1969.

VANBELLE, M.; TELLER, E.; FOCANT, M. Probiotics in animal nutrition: a review. **Archives of Animal Nutrition**, v. 40, p.543-567, 1990.

VIOLA, E.S.; VIEIRA, S.L. Ácidos orgânicos e suas misturas em dietas de suínos. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE AVES E SUÍNOS. 2003, Campinas. **Anais...** Campinas: CBNA. p.255-284.

WADTROM, T. et al. Surface properties of lactobacilli isolated from the small intestines of pigs. **J. Appl. Bacteriol.**, v.62, p.513-520, 1987.

WALKER, W.A.; DUFFY, L.C. Diet and bacterial colonization: role of probiotics and prebiotics. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 9, p 668-675, 1998.