


**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**



**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS  
COM POTENCIAL PROBIÓTICO ISOLADAS DE  
DIFERENTES MUCOSAS DE SUÍNOS**

**ORIENTADO: LUIGE BICIATI ALVIM**


**ORIENTADOR: PROF. DR. ÁLVARO CANTINI NUNES**

**BELO HORIZONTE/MG**

**Fevereiro - 2011**

**LUIGE BICIATI ALVIM**

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS  
COM POTENCIAL PROBIÓTICO ISOLADAS DE  
DIFERENTES MUCOSAS DE SUÍNOS**



Dissertação apresentada ao Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do grau de mestre em Genética.

**ORIENTADOR: PROF. DR. ÁLVARO CANTINI NUNES**

**BELO HORIZONTE/MG**

**Fevereiro - 2011**

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Paulo e Leila, pela confiança e apoio incondicional neste e em todos os momentos e, ao meu irmão, Lucas, pela amizade e incentivo.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao meu orientador, professor Álvaro Cantini Nunes, pela oportunidade, amizade, ensinamentos, confiança e todo apoio fornecido.

Aos professores que contribuíram para o desenvolvimento deste projeto, em especial, Dr. Jacques Robert Nicoli, Dra. Elisabeth Neumann e Dra. Ana Lúcia Brunialti Godard.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem o convite.

À coordenação, professores e colegas do curso de Pós-Graduação em Genética do ICB-UFMG.

Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular de Protozoários Parasitas, pelo auxílio e convivência agradável durante estes anos.

Aos amigos da Ecovec, pelos bons momentos.

A todos do Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos, pela ajuda constante.

Aos amigos, Adriana, Alan, Bruna, Bruno, Daniel, Isabelle, João, Karine, Leonardo, Lenice, Pedro, Priscila, Roberta, Sávio e Vitor, pelo companheirismo e suporte indispensável.

À Thaís, pelo amor, compreensão e incentivo.

A todos meus familiares, em especial meu primo Luciano, minha tia Eneida e meu tio José Geraldo.

E principalmente aos meus pais e meu irmão, por todo apoio, carinho e afeto.

**Obrigado!**

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	VII
LISTA DE TABELAS.....	VIII
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	IX
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>3</b>
1.1 SUINOCULTURA.....	3
1.1.1 Manejo de suínos.....	4
1.1.2 Aditivos alimentares na suinocultura.....	4
1.2 PROBIÓTICOS.....	5
1.2.1 Seleção de probióticos .....	7
1.2.2 Mecanismos de Ação dos Probióticos .....	7
1.2.2.1 Inibição de patógenos e restabelecimento da homeostase microbiana.....	8
1.2.2.2 Proteção da barreira epitelial.....	10
1.2.2.3 Modulação da resposta imune.....	10
1.2.3 Probióticos como produtos comerciais.....	12
1.2.4 Mercado dos probióticos.....	13
1.3 O GÊNERO <i>Lactobacillus</i> .....	15
1.4 O GÊNERO <i>Weissella</i> .....	16
1.5 IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁTICO.....	18
<b>2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>19</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	20
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>21</b>
4.1 AMOSTRAS.....	21

4.2 ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS LÁCTICAS DE SUÍNOS LACTENTES E ADULTOS.....	21
4.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOTINTORIAL E FISIOLÓGICA DOS MICRORGANISMOS.....	22
4.4 PURIFICAÇÃO E MANUTENÇÃO DOS MICRORGANISMOS.....	22
4.5 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS.....	22
4.5.1 Extração de DNA genômico.....	22
4.5.2 PCR-ARDRA.....	23
4.6 CARACTERIZAÇÃO PROBIÓTICA.....	23
4.6.1 Reativação.....	24
4.6.2 Resistência ao suco gástrico.....	24
4.6.3 Resistência a sais biliares.....	24
4.6.4 Hidrofobicidade da superfície celular .....	25
4.6.5 Atividade antagonista.....	25
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>27</b>
5.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA.....	27
5.2 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS.....	27
5.3 CARACTERIZAÇÃO PROBIÓTICA.....	32
5.3.1 Resistência ao suco gástrico.....	32
5.3.2 Resistência aos sais biliares.....	34
5.3.3 Hidrofobicidade da parede celular.....	37
5.3.4 Atividade antagonista .....	39
5.4 CRITÉRIOS DE SELEÇÃO.....	41
<b>6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>44</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>45</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>53</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>54</b>

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 - Resumo dos mecanismos de ação dos probióticos.....	9
Figura 2 - Principais vias de imunomodulação promovida por um probiótico.....	11
Figura 3 - Árvore filogenética mostrando as inter-relações entre os gêneros de bactérias do ácido lático.....	17
Figura 4 - Identificação dos isolados bacterianos de suínos por PCR 16S-23S.....	28
Figura 5 - Perfis de restrição dos isolados de suínos pertencentes ao grupo <i>Lactobacillus/Weissella</i> obtidos por PCR-ARDRA (16S-23S).....	30
Figura 6 - Abundância de espécies isoladas de suínos.....	32
Figura 7 - Curva de crescimento do isolado <i>Lactobacillus murinus</i> 1AFA1.....	37
Figura 8 - Atividade antagonista dos isolados bacterianos de suínos contra patógenos Gram positivo.....	40
Figura 9 - Atividade antagonista dos isolados bacterianos de suínos contra patógenos Gram negativo.....	40

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 -	Espécies de microrganismos empregados em produtos probióticos.....	12
Tabela 2 -	Principais produtos contendo bactérias probióticas comercializados no Brasil.....	14
Tabela 3 -	Designação de espécies de <i>Lactobacillus</i> e <i>Leuconostoc</i> para o novo gênero <i>Weissella</i> .....	16
Tabela 4 -	Bactérias Gram positivo e catalase negativo isoladas de boca, focinho e fezes de suínos.....	27
Tabela 5 -	Identificação das espécies bacterianas isoladas de suínos.....	31
Tabela 6 -	Porcentagem de inibição dos isolados bacterianos de suínos na presença de suco gástrico artificial.....	33
Tabela 7 -	Classificação dos isolados bacterianos de suínos quanto à tolerância aos sais biliares.....	35
Tabela 8 -	Porcentagem de inibição dos isolados bacterianos de suínos na presença de sais biliares. ....	36
Tabela 9 -	Teste de Adesão dos Microrganismos a solventes (MATS).....	38
Tabela 10 -	Síntese dos resultados de caracterização probiótica dos isolados de suínos.....	42

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

% - Percentagem

μ – Micro

°C – Grau Célsius

**ABIEPCS** - Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína

**Ala** – Alanina

**ATCC** – “American Type Culture Collection” / Coleções de Cultura Tipo Americano

**BAL** – Bactérias do Ácido Lático

**BHI** – “Brain Heart Infusion” / Infusão de Cérebro e Coração

**CC** – Produção em Ciclo Completo

**CNPISA** – Centro Nacional de Pesquisa em Suínos e Aves

**DNA** – “Deoxyribonucleic acid” / Ácido Desoxirribonucléico

**EMBRAPA** – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

**FAO** – “Food and Agriculture Organization of the United Nations”

**FDA** – “Food and Drug Administration” / Administração de Alimentos e Medicamentos

**g** – Grama

**GRAS** – “Generally Recognized as Safe” / Geralmente Reconhecido como Seguro

**h** – Horas

**Ig** – Imunoglobulina

**Ile** – Interleucina

**ITS** – “Internal Transcribed Spacer” / Espaçador Interno Transcrito

**L** – Litro

**m** – Mili

**M** – Molar

**MAMPs** – “Microorganism Associated Molecular Patterns” / Padrões Moleculares Associados a Microrganismos

**MATS** – “Microbial Adhesion to Solvents” / Adesão Microbiana a Solventes

**MAPA** – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

**MRS** – De Man, Rogosa, Sharpe

**NAFTA** – “North American Free Trade Agreement” / Tratado Norte Americano de Livre Comércio

**NAGE** – Núcleo de Análise de Genoma e Expressão Gênica

**nm** – Nanômetro

**OD** – “Optical Density” / Densidade Óptica

**OECD** – “Organization for Economic Co-Operation and Development”

**p** – Peso

**pb** – Pares de Bases

**PCR** – “Polymerase Chain Reaction” / Reação em Cadeia da Polimerase

**pH** – *Potencial Hidrogeniônico*

**PRRs** – “Pattern Recognition Receptors” / Receptores de reconhecimento padrão

**RNA** – “Ribonucleic acid” / Ácido Ribonucléico

**rpm** – Rotações por Minuto

**TCA** – Taxa de Crescimento Anual

**TGI** – Trato Gastrointestinal

**TSB** – “Trypticase Soy Broth” / Caldo Trypticase Soja

**UFC** – Unidade Formadora de Colônia

**UPLs** – Unidades de Produção de Leite

**UTs** – Unidades de Terminação

**UV** – Ultra Violeta

**v** – Volume

**WHO** – “World Health Organization”

## RESUMO

A possível indução de resistência bacteriana devido à inclusão de antibióticos na alimentação animal tem levado as autoridades competentes a proibir a utilização dos tradicionais promotores de crescimento baseados em drogas antimicrobianas para este fim. Além disso, os consumidores começaram a preferir produtos de origem animal com alta qualidade, sem possíveis resíduos destes antibióticos, promovendo uma pressão no mercado por compostos alternativos. Assim, os probióticos têm emergido como potenciais substitutos, pois proporcionam benefícios à microbiota intestinal e mostram capacidade imunomoduladora em seu hospedeiro. Neste contexto, este estudo teve como objetivo isolar e identificar novas linhagens de bactérias do ácido láctico a partir de diferentes mucosas de suínos que possam ser utilizadas para suplementação alimentar, promoção do crescimento e como adjuvante imune. Cinquenta e seis isolados foram obtidos a partir de fezes, focinho e boca de oito suínos e, em seguida, foram identificadas ao nível de gênero por amplificação das regiões espaçadoras entre os genes 16S-23S do rRNA. Aqueles isolados que apresentaram amplificação típica do grupo *Lactobacillus* e *Weissella* foram identificados ao nível de espécie por digestão com endonucleases de restrição dos amplicons 16S-23S rRNA e caracterizados quanto às suas propriedades probióticas. Vinte e quatro microrganismos do grupo *Lactobacillus*/*Weissella* foram identificados como pertencentes a oito espécies: *Lactobacillus acidophilus*, *L. brevis*, *L. murinus*, *L. reuteri* B, *L. plantarum* A, *L. plantarum* B/ *L. paraplantarum*/ *L. pentosus*, *Weissella paramesenteroides*, *W. cibaria*. Estas bactérias foram selecionadas quanto ao seu potencial probiótico com base na resistência aos sais biliares, tolerância ao baixo pH, hidrofobicidade da superfície celular e produção de substâncias antimicrobianas. Os resultados mostraram a presença de sete isolados com potencial probiótico, com dois destaques, o *Lactobacillus acidophilus* 1ANH4 e a *Weissella paramesenteroides* 1ANK4, que cumpriram plenamente todas as condições testadas, demonstrando maior potencial em relação às propriedades funcionais testadas *in vitro*.

**Palavras chave:** Bactérias do ácido láctico, características probióticas, suínos.

## ABSTRACT

The possible acquisition of bacterial resistance due to the inclusion of antibiotics in animal feed has led the qualified authorities to ban the use of antimicrobial drugs for this purpose. Moreover, consumers began to prefer products of animal origin with high quality, without possible residues of the referred antibiotics. Thus, probiotics have emerged as potential substitutes to the traditional use of antimicrobial drugs because provide intestinal microbiota benefits and show immunomodulatory capacity in its host. Therefore, this study aimed to isolate and identify new strain of lactic acid bacteria from different mucosae of swine select candidates for feed supplementation, growth promotion and as immune adjuvant. Fifty-six isolates were obtained from feces, snout and mouth of eight swines and then were identified to genus level by amplification of the 16S-23S rRNA intergenic spacer. Those isolate that showed typical amplification of *Lactobacillus* and *Weissella* group were identified to the specie level by restriction endonuclease digestion of 16S-23S rRNA amplicons and characterized by their probiotic properties. Twenty-four microorganism of the *Lactobacillus/Weissella* group were identified as belonging to eight species: *Lactobacillus acidophilus*, *L. brevis*, *L. murinus*, *L. reuteri* B, *L. plantarum* A, *L. plantarum* B/ *L. paraplatarum*/ *L. pentosus*, *Weissella paramesenteroides*, *W. cibaria*. These bacteria were selected as potential probiotics based on their bile-salt resistance, low pH tolerance, cell surface hydrophobicity and production of antimicrobial substances. The results showed the presence of seven isolates with probiotic potential features, with two highlights, *Lactobacillus acidophilus* 1ANH4 and *Weissella paramesenteroides* 1ANK4, which fulfilled all conditions tested, proving highest potential with functional properties *in vitro*.

**Key words:** Lactic acid bacteria, probiotic characteristics, swines.

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 SUINOCULTURA

O crescimento da população mundial e o desenvolvimento econômico, associados à urbanização e à diversificação alimentícia nos países em desenvolvimento, geraram uma demanda suplementar, promovendo uma modificação no consumo de alimentos, com uma proporção de produtos animais crescendo em ritmo mais acelerado (OECD-FAO, 2009). A carne suína, que corresponde a 40% do consumo mundial de proteína animal, tem expressiva participação no atendimento deste contingente, tornando necessário encontrar melhor eficiência produtiva a fim de suprir esta demanda (Gheler *et al.*, 2009).

A criação de suínos ocupa lugar de destaque na matriz produtiva do agronegócio nacional. Segundo dados da Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína, atualmente o Brasil está entre os cinco maiores produtores mundiais, com mais de 3,0 milhões de toneladas deste produto em 2010 e um faturamento médio de US\$ 100 milhões por mês (ABIPECS, 2010).

Estudos do Centro Nacional de Pesquisa em Suínos e Aves (CNPISA) mostram que o Brasil apresenta o menor custo de produção mundial, cerca de US\$0,55/kg, e produz carcaças de qualidade comparada à dos grandes exportadores. Dessa forma, pode-se dizer que o mercado internacional sinaliza para o crescimento das exportações brasileiras, com possibilidades de abertura de novos mercados como o do NAFTA, China, África do Sul, Chile, Taiwan, União Européia e Japão, consumidores em potencial (EMBRAPA-CNPISA, 2003).

Devido a uma maior concorrência por novos mercados consumidores de carne suína, o risco de uma perda econômica relacionada à diminuição do desempenho e da saúde dos animais está cada vez maior (Pancheniak, 2005; OCED-FAO, 2009). Neste sentido, vários países têm buscado o aperfeiçoamento das técnicas de manejo e têm direcionado recursos, a fim de desenvolver aditivos alimentares eficientes que, associados, permitam melhorar e intensificar a produção (Costa, Tse e Miyada, 2007).

### 1.1.1 Manejo de suínos

Na suinocultura moderna e intensiva, um dos aspectos mais importantes na prevenção de doenças é o correto manejo dos animais, visando reduzir a pressão infectiva e a transmissão de agentes patogênicos entre animais de diferentes idades (EMBRAPA-CNPSA, 2003).

Os sistemas de produção empregados para o manejo dos suínos podem ser a produção em ciclo completo (CC), as unidades de produção de leitão (UPLs) ou unidades de terminação (UTs). Na produção em CC, o mesmo estabelecimento desenvolve todas as etapas de produção dos animais, do nascimento ao abate, diferentemente das UPLs e UTs, que apresentam apenas fases específicas. As UPLs envolvem as etapas de reprodução e as UTs somente a fase de crescimento e terminação (Costa, Ludtke e Araújo, 2007).

Os suínos, antes de chegarem ao abate, passam por três fases: maternidade, creche e crescimento-terminação. Estas etapas são definidas levando-se em consideração a idade e o peso do animal ao final das fases. A maternidade é considerada do nascimento até 21 dias, com peso aproximado de 7 Kg, a fase de creche de 21 a 63 dias, com peso de 24 Kg, e crescimento-terminação dos 63 a 160 dias (peso maior que 100 Kg), sendo posteriormente levados para o abate (Pancheniak, 2005).

A fase mais crítica na criação de suínos é a fase de creche, uma vez que os animais são impostos a condições diferentes da que se encontravam, deixando a companhia materna e alimentando-se exclusivamente de ração, em substituição ao leite (Castro *et al.*, 2009). Além disso, visto que a imunidade do animal ainda não é completamente efetiva, observa-se a ocorrência de diarreia e enterite nos leitões, as quais resultam no expressivo atraso do crescimento e na redução da conversão alimentar (Menin *et al.*, 2008).

### 1.1.2 Aditivos alimentares na suinocultura

Entre os componentes que promovem aumento dos custos de produção na atividade suinícola estão a alimentação, os gastos veterinários, a energia, a mão-de-obra e o transporte (EMBRAPA-CNPSA, 2003). Dentre estes, a alimentação exige uma atenção especial dos suinocultores, uma vez que responde a 70% dos gastos totais, implicando na necessidade de uma formulação precisa das rações, e também, na correta mistura dos ingredientes (Zardo e Lima, 1999).

Uma das técnicas utilizadas com resultados significativos para melhorar os índices zootécnicos e aumentar a produtividade tem sido o uso de aditivos nas dietas dos suínos (Costa, Tse e Miyada, 2007). Aditivos alimentares são substâncias que, mesmo não sendo vitais para o organismo, são usadas para proporcionar um incremento no ganho de peso dos animais, apesar do mecanismo de ação de algumas destas substâncias não ser totalmente entendido (Oliveira *et al.*, 2002).

Dentre os aditivos mais empregados na alimentação de suínos, destacam-se os antimicrobianos (antibióticos e quimioterápicos), utilizados a mais de 50 anos como promotores de crescimento em dietas para suínos recém-desmamados para diminuir a incidência de diarreia pós-desmame e promover melhora no desempenho animal (Turner, Dritz e Minton, 2001; Costa, Tse e Miyada, 2007). Entretanto, nos últimos anos os consumidores e autoridades têm exigido carne sem resíduos químicos, restringindo o uso destes promotores devido à constatação da indução de resistência para bactérias, o que resulta em menor eficiência dos antibióticos na terapia animal e humana (Pancheniak, 2005; Chiquieri *et al.*, 2007; Soto *et al.*, 2007).

A União Européia, durante a década de 70, proibiu o uso de vários antibióticos na alimentação animal, alegando que estes poderiam intervir na terapêutica humana (Castanon, 2007). Atualmente, não é aceita a utilização de qualquer antimicrobiano como aditivo alimentar nestes países (Ripamonte *et al.*, 2007; Gallo *et al.*, 2010; Berendsen *et al.*, 2010). No Brasil, as restrições iniciaram em 1992, e desde então o Ministério da Agricultura, por meio de portarias e instruções normativas, vetou a utilização de vários aditivos, dentre eles, avoparcina, cloranfenicol, penicilina, tetraciclina, sulfonamidas, entre outros (MAPA, 2011).

Após estas proibições, tornou-se evidente a necessidade de buscar produtos alternativos aos antimicrobianos para suplementação alimentar de suínos, sendo que estes prováveis substitutos deveriam ser capazes de manter as características benéficas dos antimicrobianos, como a promoção de altos índices de produtividade e a qualidade dos produtos finais, e eliminar as características indesejáveis, como a resistência bacteriana (Loddi *et al.*, 2001).

## 1.2 PROBIÓTICOS

A palavra “probiótico” deriva do grego e significa “pró-vida”. Este termo foi usado pela primeira vez por Lilly e Stillwell (1965) ao verificarem a ação de microrganismos como promotores de crescimento. Posteriormente, em 1974, Parker definiu probióticos como

microrganismos ou substâncias que contribuem para o balanço da microbiota intestinal (Goldin, 2011).

Atualmente, probióticos são definidos como microrganismos vivos com capacidade de conferir benefícios à saúde de seu hospedeiro quando administrado em quantidades adequadas (FAO/WHO, 2002). A maioria dos microrganismos probióticos são bactérias lácticas, Gram positivo, geralmente catalase negativo, não esporulantes, anaeróbios estritos, facultativos ou que crescem em microaerofilia. Assim sendo, os probióticos incluem espécies ácido lácticas dos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Streptococcus* e *Weissella* (Oliveira-Sequeira, Ribeiro e Gomes, 2008).

Um probiótico, para ser considerado efetivo, deve apresentar algumas propriedades básicas, tais como: 1) exercer um efeito benéfico à saúde de seu hospedeiro; 2) conter um grande número de células viáveis; 3) permanecer no ecossistema intestinal do hospedeiro; 4) ser estável durante a estocagem e permanecer viável por longos períodos; 5) ser isolado da mesma espécie animal a que se destina (Salminen *et al.*, 1998; Saarela *et al.*, 2000; Turner, Dritz e Minton, 2001).

Dados experimentais demonstram que os probióticos são capazes de desenvolver benefícios à saúde por meio de mecanismos não previstos através da nutrição convencional (Saad, 2006). Observa-se que a ingestão destas culturas de microrganismos promove o controle e estabilização da microbiota intestinal, resistência gastrointestinal à colonização por patógenos, diminuição da intolerância à lactose, alívio da constipação, aumento da absorção de minerais e produção de vitaminas (Kaur, Chopra, Saini, 2002; Tuohy *et al.*, 2003; Salminen, Ouwehand e Isolauri, 1998).

Atualmente, já existem probióticos como produtos comerciais disponíveis para aves, suínos, bovinos, ovinos, equinos, cães e gatos. A forma mais tradicional de aplicação dos microrganismos probióticos na criação de suínos é por meio de alimentos funcionais. A administração destes produtos geralmente acontece logo após o nascimento, pois nas primeiras horas de vida o trato gastrointestinal do leitão é estéril, havendo pouca secreção de ácido clorídrico, o que permite a proliferação de bactérias patogênicas como *Escherichia coli*, *Streptococcus*, *Salmonella* e *Clostridium*, principais causadores de morte nos suínos (Santos *et al.*, 2003; Menin *et al.*, 2008; Vannucci e Guedes, 2009).

### 1.2.1 Seleção de probióticos

Critérios para a seleção de novas espécies probióticas incluem características relativas à segurança, funcionalidade e aspectos tecnológicos das culturas que serão utilizadas na composição do produto (Saarela *et al.*, 2000; Pancheniak, 2005).

Em relação à segurança, os microrganismos probiótico devem ser provenientes de animais saudáveis, habitantes normais do intestino, não devem ser tóxicos nem patogênicos e, além disso, é preferível que as cepas utilizadas sejam hospedeiro-específicas, para que se obtenha uma eficácia máxima do produto (Salminen *et al.*, 1998; Murarolli, 2008).

A funcionalidade da linhagem probiótica está ligada à sua capacidade de resistir às condições adversas do trato gastrointestinal de seu hospedeiro e de sua habilidade antagonista contra patógenos residentes (Turner, Dritz e Minton, 2001; Ruiz-Moyano *et al.*, 2008). Os microrganismos componentes de um probiótico devem sobreviver à acidez gástrica e a atividade hidrolítica dos sais biliares e, ainda, serem capazes de reduzir os patógenos aderidos na superfície intestinal (ou em outras mucosas), seja pela produção de compostos antagonistas (bacteriocinas e antibióticos) ou pela competição por sítios de adesão (Morelli, 2000; Saarela *et al.*, 2000; Motta *et al.*, 2006).

Outro aspecto importante na seleção de uma nova linhagem probiótica é a observação de suas propriedades tecnológicas. Um probiótico deve conter cepas que apresentam rápido crescimento “*in vitro*”, fácil manipulação, boas condições de produção industrial e que sobrevivam no produto final conservando sua função (Pancheniak, 2005). Além disso, deve ser observada a habilidade da cultura em co-existir com a microbiota indígena do hospedeiro (FAO/WHO, 2002).

### 1.2.2 Mecanismos de Ação dos Probióticos

O modo de ação dos probióticos é bastante diversificado (figura 1), de acordo com Lebeer, Vanderleyden e De Keersmaecker (2008) os mecanismos que promovem os efeitos benéficos relativos à saúde do hospedeiro compõem no mínimo uma das seguintes categorias: 1) Inibição de patógenos e restabelecimento da homeostase microbiana. 2) Proteção da barreira epitelial. 3) Modulação da resposta imune.

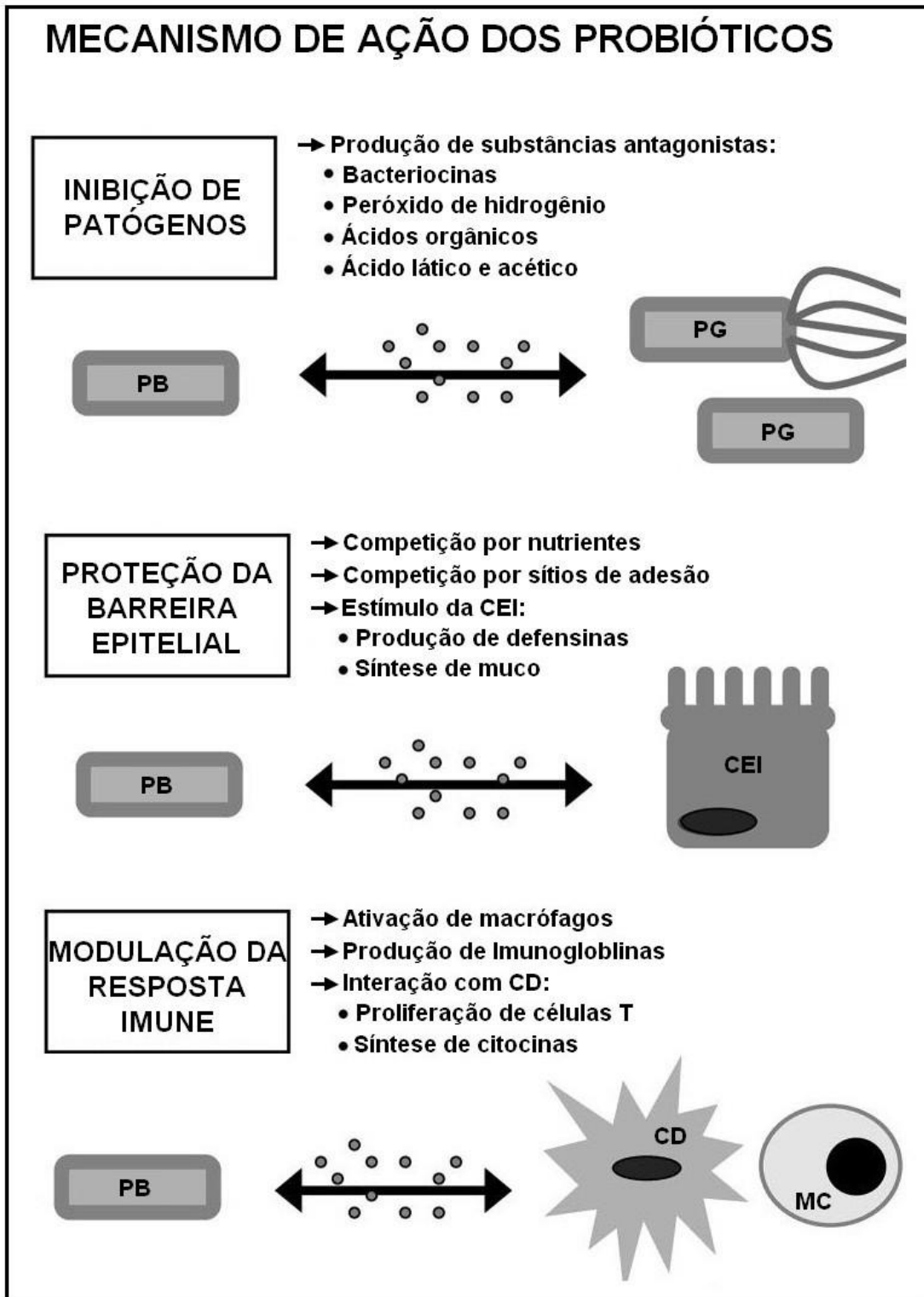
### 1.2.2.1 Inibição de patógenos e restabelecimento da homeostase microbiana

Vários microrganismos probióticos apresentam atividade antagonista contra espécies patogênicas pela síntese de bacteriocinas, peróxido de hidrogênio, ácidos orgânicos voláteis, ácido lático e acético (Jin, Marquard e Baidoo, 2000; Silva *et al.*, 2007).

Bacteriocinas são definidas como substâncias produzidas por bactérias que são capazes de inibir a multiplicação de outras bactérias, mesmo em baixas concentrações (Riley, 1998). No caso dos probióticos, existe na literatura uma ampla gama de trabalhos descrevendo a ação antagonista destas substâncias contra vários patógenos, tais como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, dentre outros (Jamuna, Babusha e Jeevaratnam, 2004; Garcia *et al.*, 2006; Todorov e Dicks, 2007; Todorov, 2009).

O peróxido de hidrogênio é um antagonista cujo espectro de ação inclui a inibição do crescimento de bactérias patogênicas Gram negativo, sendo importante para a manutenção do equilíbrio da microbiota através do combate a bactérias patogênicas, como demonstrado por Pridmore e colaboradores (2008), que observaram a atividade anti-*Salmonella* de *Lactobacillus johnsonii* NCC533 derivada da produção de peróxido. Além disso, ele também pode estar associado à capacidade de colonização vaginal, impedindo o estabelecimento de patógenos nesta região (Vallor *et al.* 2001).

A produção de ácidos orgânicos, bem como de ácido lático e acético pelas bactérias utilizadas como probióticos reduz o pH do trato gastrintestinal, prevenindo o crescimento de vários agentes patogênicos e, conseqüentemente, permitindo o desenvolvimento de certas espécies de lactobacilos (Garcia *et al.*, 2006). Um estudo que destaca a relação entre a produção destas substâncias e a inibição de patógenos é o de De Keersmaecker e colaboradores (2006) que atribui a atividade antimicrobiana da linhagem GG de *Lactobacillus rhamnosus* contra *Salmonella enterica* à produção de ácido lático.



**Figura 1** - Resumo dos mecanismos de ação dos probióticos.

PB: probiótico; PG: patógeno; CEI: célula epitelial intestinal; CD: célula dendrítica; MC: macrófago (Fonte: Adaptada de Lebeer, Vanderleyden e De Keersmaecker, 2008).

### 1.2.2.2 Proteção da barreira epitelial

A capacidade dos probióticos de promover a proteção da barreira epitelial se deve basicamente a duas propriedades: Competição por nutrientes e/ou competição entre linhagens patogênicas e microrganismos probióticos pelos mesmos sítios de adesão (exclusão competitiva), além da indução da síntese de defensinas e muco (Turner, Dritz e Minton, 2001;Oliveira *et al.*, 2002; Saad, 2006).

Na maioria das vezes, os probióticos são selecionados utilizando-se bactérias da microbiota indígena, aumentando as chances de obtenção de bactérias com melhor capacidade adaptativa às condições intestinais do hospedeiro. Assim, um probiótico é capaz de metabolizar de forma mais rápida e eficiente os nutrientes, tornando-os indisponíveis aos patógenos e, conseqüentemente, impedindo a proliferação destes (Spencer e Chesson, 1994; Pancheniak, 2005).

Os microrganismos probióticos presentes no trato gastrointestinal atuam também como uma barreira defensiva do animal, impedindo que microrganismos potencialmente patogênicos exerçam seus efeitos, uma vez que se aderem às paredes intestinais e reduzem a área de ocupação destes (Saad, 2006). De acordo com Kos e colaboradores (2003), a aderência bacteriana envolve vários fatores, sendo que o processo inicial é baseado em interações físico-químicas, que estão relacionadas às cargas elétricas presentes e a hidrofobicidade da parede celular do microrganismo.

A ligação dos probióticos com células epiteliais do intestino como, por exemplo, as células de Paneth e enterócitos, estimulam a produção de defensinas e muco, respectivamente, substâncias importantes na proteção das superfícies mucosas contra invasão por patógenos (figura 2) (Lebeer, Vanderleyden e De Keersmaecker, 2010).

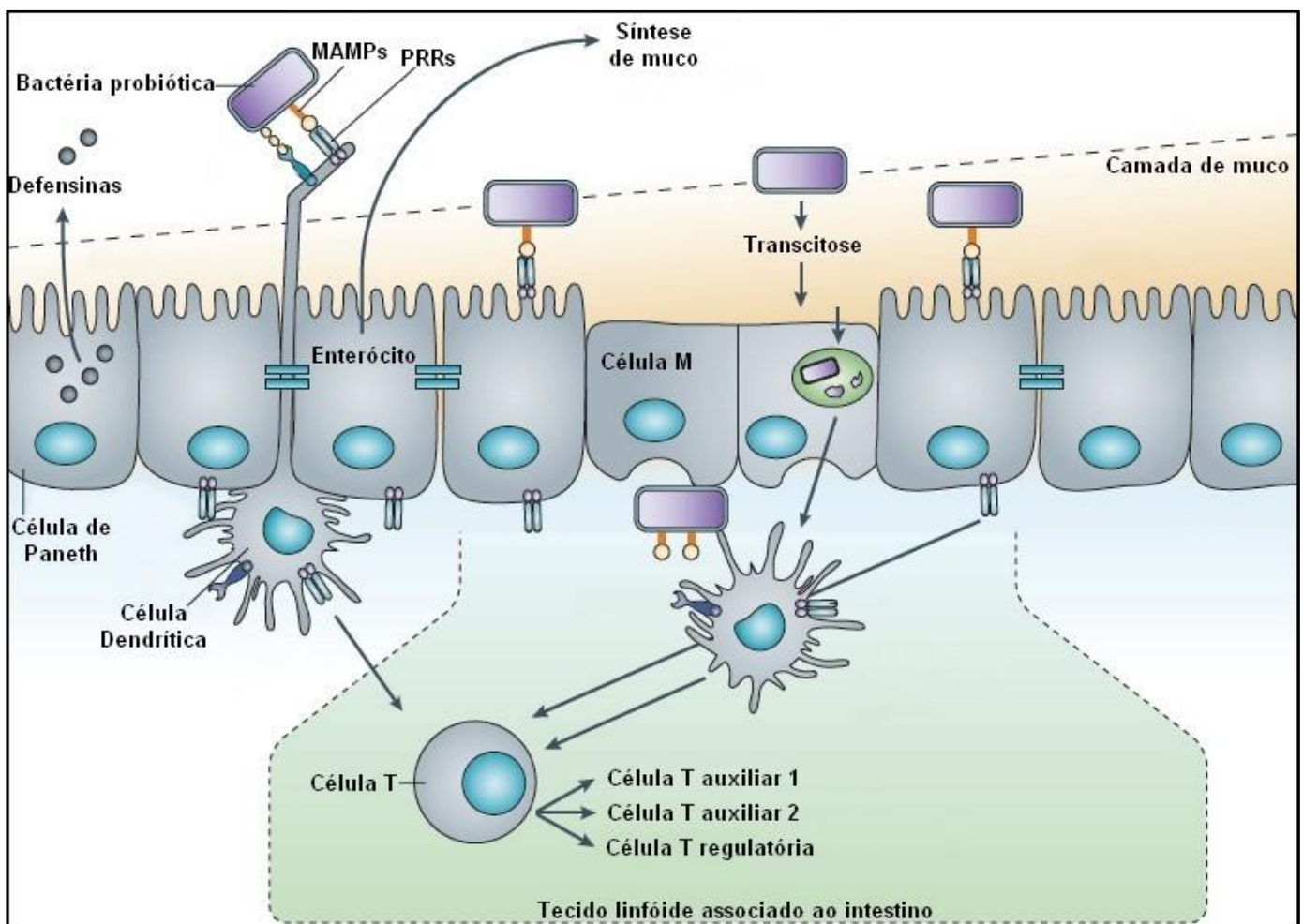
### 1.2.2.3 Modulação da resposta imune

Bactérias probióticas são capazes de modular a resposta imune do hospedeiro por meio da ativação de macrófagos, proliferação de células T e aumento da produção de imunoglobulinas, anticorpos e citocinas (Oliveira *et al.*, 2002; Pancheniak, 2005).

A imunomodulação pelos probióticos é resultado da interação de moléculas conservadas da parede celular destes microrganismos (MAMPs) com receptores de reconhecimento do hospedeiro (PRRs), induzindo as vias de sinalização imune, sendo que o

tipo de resposta imunológica gerada é diretamente dependente da linhagem probiótica ingerida e do tipo celular ao qual ela se liga (Cross, 2002; Oelschlaeger, 2010).

A interação do microrganismo probiótico com as células dendríticas é o fator que promove a produção de citocinas, principais moléculas do complexo de histocompatibilidade principal para apresentação de antígenos, e moléculas co-estimulatórias que polarizam células T em células T regulatórias e auxiliares tipo 1 e 2. Além disso, bactérias probióticas podem atingir o tecido linfóide associado ao intestino atravessando células intestinais especiais (transcitose), chamadas células M, e interagir diretamente com as células dendríticas, modulando a resposta imune (figura 2) (Lebeer, Vanderleyden e Keersmaecker, 2010).



**Figura 2** - Principais vias de imunomodulação promovida por um probiótico.

Um probiótico é capaz estimular a produção de defensinas e muco quando em contato com as células de Paneth e com os enterócitos. Além disso, pode interagir com as células dendríticas na lâmina própria através de suas prolongações entre as células epiteliais intestinais e pela transcitose mediada pelas células M. O tipo de interação é dependente da dinâmica do muco intestinal e, independente da via, é capaz de induzir a produção de citocinas que podem atuar como adjuvante imune (Fonte: Adaptado de Lebeer, Vanderleyden e Keersmaecker, 2010).

Outro aspecto importante é que uma vez estabelecido no TGI, o probiótico promove o estímulo à proliferação de células T regulatórias e imunoglobulinas, principalmente IgA, em neonatos, permitindo um desenvolvimento normal do sistema imune por meio da indução da tolerância a antígenos luminais, auxiliando na prevenção de doenças autoimunes e alergias alimentares (Shi e Walker, 2004).

### 1.2.3 Probióticos como produtos comerciais

Produtos probióticos podem conter bactérias totalmente conhecidas e quantificadas ou culturas bacterianas não definidas (Loddi, 2001). No mercado existem probióticos com diferentes composições de microrganismos e, mesmo aqueles pertencentes à mesma espécie, geralmente apresentam diferentes cepas (Cardoso, 2006). *Enterococcus*, *Bacteroides*, *Eubacterium* e especialmente *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* estão presentes em todas as misturas de culturas definidas (Rivera-Espinoza e Gallardo-Navarro, 2010). A tabela 1 apresenta as principais espécies de microrganismos empregados como probióticos.

**Tabela 1** - Espécies de microrganismos empregados em produtos probióticos.

<b><i>Lactobacillus</i></b>		<b><i>Bifidobacterium</i></b>	<b>Outras</b>
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. gasseri</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>L. helveticus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>L. brevis</i>	<i>L. johnsonii</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>L. paracasei</i>	<i>B. breve</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>L. delbreuckii</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. fermentum</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>L. gallinarum</i>	<i>L. rhamnosus</i>		<i>Weissella confusa</i>

Fonte: Adaptado de Holzapfel e Schillinger, 2002.

De acordo com Oliveira e colaboradores (2002), a eficácia do produto é estritamente dependente da quantidade e características das cepas do microrganismo utilizado na elaboração do probiótico. Além disso, quando as bactérias com capacidade probiótica são isoladas do seu habitat convencional e subcultivadas e/ou liofilizadas, algumas das suas propriedades são perdidas (Loddi, 2001).

Em virtude da diversidade de fatores que afetam a confecção de um probiótico, algumas normas para avaliação da eficácia do produto foram adotadas pela Expert Commission on Animal Feeds (FAO/WHO, 2007).

Primeiramente, os microrganismos constituintes do produto devem ser identificados geneticamente utilizando metodologias reconhecidas internacionalmente e, em seguida, realizados ensaios onde o probiótico analisado deve permanecer estável sob diversas condições: um ano em condições de estoque para apresentação comercial; dois meses no

alimento comercializado sob a forma peletizada; e por três meses quando submetido à temperatura de armazenamento de  $-80^{\circ}\text{C}$ . Além disso, também é recomendada a dose mínima de  $10^6$  microrganismos viáveis por grama de alimento, bem como a contagem de organismos viáveis na ração, no lúmen intestinal, e no trato gastrintestinal depois de finalizada a administração do probiótico (Loddi, 2001).

Após a avaliação os produtos podem ser comercializados, sendo aplicados de várias formas, como por exemplo, adicionadas às rações, na água de bebida, em cápsulas gelatinosas, pulverizado sobre os animais e como spray (Cardoso, 2006).

No Brasil, a avaliação dos produtos com alegações de propriedades funcionais e/ou de saúde compete à Comissão Tecnocientífica de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos, vinculada à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2011). De acordo com a referida comissão, para que um probiótico seja aprovado deve apresentar uma quantidade mínima viável de microrganismos na faixa de  $10^8$  a  $10^9$  UFC na recomendação diária de consumo do produto final, sendo que valores menores podem ser aceitos, desde que a empresa comprove sua eficácia (ANVISA, 2011).

#### 1.2.4 Mercado dos probióticos

Os avanços científicos relacionados ao desenvolvimento de produtos alimentares têm promovido um crescimento do mercado de probióticos, uma vez que proporcionaram melhoras na qualidade das amostras em termos de estabilidade e vida de prateleira e, ainda, uma maior aceitação das propriedades bioterapêuticas por parte dos consumidores (Komatsu, Buriti e Saad, 2008).

O mercado global de probióticos aumentou de US\$ 14,9 bilhões em 2007 para US\$ 15,9 bilhões em 2008 e, de acordo com estimativas, tende a atingir 19,6 bilhões de dólares em 2013, o que corresponde a uma taxa de crescimento anual (TCA) de 4,3% (Ross *et al.*, 2010).

Os produtos probióticos disponíveis no mercado podem ser divididos em: alimentos, suplementos e ingredientes (Agheyisi, 2008). Os alimentos probióticos ocupam a maior parte do mercado, correspondendo a 85% do total, com um faturamento de US\$ 13,8 bilhões em 2008 e estimativa de US\$ 17,0 bilhões em 2013 (Holzapfel e Schillinger, 2002). Analistas de mercado estimam que mais de 500 produtos alimentares e bebidas probióticas têm sido introduzidos ao longo da última década, com os iogurtes representando a maior parcela da produção, 36,6%, seguidos pelos queijos probióticos e bebidas fermentadas (Stanton *et al.*, 2001).

Os suplementos probióticos são o segundo maior segmento, ocupando 9% do mercado, com arrecadação de US\$ 1,2 bilhão em 2007 que deverá atingir US\$ 1,3 bilhão em 2013. Os probióticos são utilizados na fabricação dos suplementos vendidos em forma de cápsulas, comprimidos e pó. Suplementos probióticos em forma de cápsula representaram a maior fatia das vendas, aproximadamente 75% (Agheyisi, 2008).

Já os ingredientes probióticos ocupam apenas 6% dos produtos disponíveis, com um faturamento de US\$ 797,6 milhões em 2008 e estimativa de US\$ 917 milhões para 2013. Os ingredientes compreendem as cepas com propriedades probióticas que são vendidas por empresas desenvolvedoras para companhias alimentícias como, por exemplo, a dinamarquesa Danisco, a japonesa Morinaga e a sueca BioGaia que fornecem produtos para Nestlé e Attune. Dentre os gêneros das bactérias probióticas, os *Lactobacillus* representam a maior parte das vendas, cerca de 60% em 2007 (Agheyisi, 2008).

O mercado dos probióticos no Brasil ainda é incipiente, sendo comercializados alguns produtos alimentícios, como leite fermentado e iogurte, além de alguns produtos probióticos considerados como farmacêuticos na forma de suplemento alimentar, suspensão oral e comprimidos (tabela 2) (Oliveira *et al.*, 2002).

**Tabela 2** - Principais produtos contendo microrganismos probióticos comercializados no Brasil.

<b>Categoria do Produto</b>	<b>Produto</b>	<b>Produtor</b>	<b>Probióticos</b>
Leite Fermentado	Yakult	Yakult	<i>L. casei</i> cepa Shirota
	Chamyto	Nestlé	<i>L. johnsonii</i> <i>L. helveticus</i>
	Leite Fermentado Parmalat	Parmalat	<i>L. casei</i> <i>B. lactis</i> <i>L. acidophilus</i>
	Vigor Club	Vigor	<i>L. casei</i> <i>L. acidophilus</i>
Leite Fermentado Aromatizado	Batavito	Batavo	<i>L. casei</i>
	LC1 Active	Nestlé	<i>S. thermophilus</i> <i>L. bulgaricus</i> <i>L. acidophilus</i> NCC 208
Iogurte	Iogurte Biofibras	Batavo	<i>B. lactis</i> <i>L. acidophilus</i>
	Diatalact	Parmalat	<i>B. lactis</i> <i>L. acidophilus</i>
Suplemento Alimentar	Biotura	Chr. Hansen	<i>B. lactis</i> <i>L. acidophilus</i>
Suspensão Oral	Leiba	União Química	<i>L. acidophilus</i>
Comprimidos	Floratil	Merck	<i>Saccharomyces boulardii</i>

Fonte: Adaptado de Oliveira *et al.*, 2002.

### 1.3 O GÊNERO *Lactobacillus*

O gênero *Lactobacillus* compreende um grupo grande e heterogêneo de microrganismos em forma de cocobacilos ou bastonetes, de baixo conteúdo G+C, Gram positivo, geralmente catalase negativo, não esporulantes e anaeróbicos (Bernardeau *et al.*, 2008). Taxonomicamente, os lactobacilos são eubactéricas que pertencem ao filo *Firmicutes*, classe *Bacilli*, ordem *Lactobacillales*, família *Lactobacillaceae* (Lebeer, Vanderleyden e De Keersmaecker, 2008).

O gênero *Lactobacillus* apresenta 167 espécies e 27 subespécies, ocupando diversos nichos em que carboidratos fermentáveis encontram-se disponíveis, como o trato gastrointestinal e vaginal, a pele e os pulmões dos animais, além da matéria orgânica dos solos e associados aos vegetais (Felis e Dellaglio, 2007). Estão presentes em muitos tipos de alimentos como cereais, bebidas fermentadas, queijos e produtos lácteos, carnes e derivados, dentre outros (Hammes e Hertel, 2006).

Dependendo da capacidade de fermentar os açúcares, os lactobacilos podem ser divididos em dois grupos: espécies homofermentativas, que convertem açúcares principalmente em ácido lático; e heterofermentativas, que promovem a conversão de açúcares em ácido lático, ácido acético, etanol e CO<sub>2</sub> (Giraffa, Chanshvili e Widyastuti, 2010).

O fato destas bactérias apresentarem como produto principal do metabolismo o ácido lático, em associação com outras características do gênero, faz com que os *Lactobacillus* sejam considerados Bactérias do Ácido Lático (BAL), bactérias utilizadas desde tempos imemoriais na confecção, processamento e preservação de diversos produtos alimentícios (Cross, 2002).

As bactérias pertencentes ao gênero *Lactobacillus* são mais frequentemente empregadas como probióticos por serem consideradas seguras (GRAS - “generally recognized as safe”) pela FDA (Food and Drug Administration), pois não são patogênicas e nem capazes de transmitir os fatores de resistência para bactérias patogênicas, o que dificultaria a cura de infecções, um aspecto importante em relação aos riscos da saúde pública e segurança dos produtos. (Gomes & Malcata, 1999; Oliveira *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2003). Alguns gêneros de BAL como, por exemplo, *Enterococcus* e *Streptococcus*, apresentam alguns patógenos oportunistas que podem causar eventuais infecções (Salminen *et al.*, 1998).

Além disso, os lactobacilos são os principais microrganismos encontrados por todo o trato gastrointestinal dos suínos, mostrando serem fortes candidatos como probióticos para estes animais (Rojas, Ascencio e Conway, 2002; Pancheniak, 2005).

#### 1.4 O GÊNERO *Weissella*

Collins e colaboradores (1993), trabalhando com bactérias de salsichas gregas, perceberam que um grupo de microrganismos isolados apresentava características peculiares que não enquadravam em nenhuma classificação existente.

Segundo estes autores, em uma identificação preliminar por meio de testes bioquímicos, as bactérias desconhecidas assemelhavam-se aos microrganismos do gênero *Leuconostoc* pelo tipo de ácido láctico produzido, mas diferiam das espécies deste gênero em várias outras características fisiológicas.

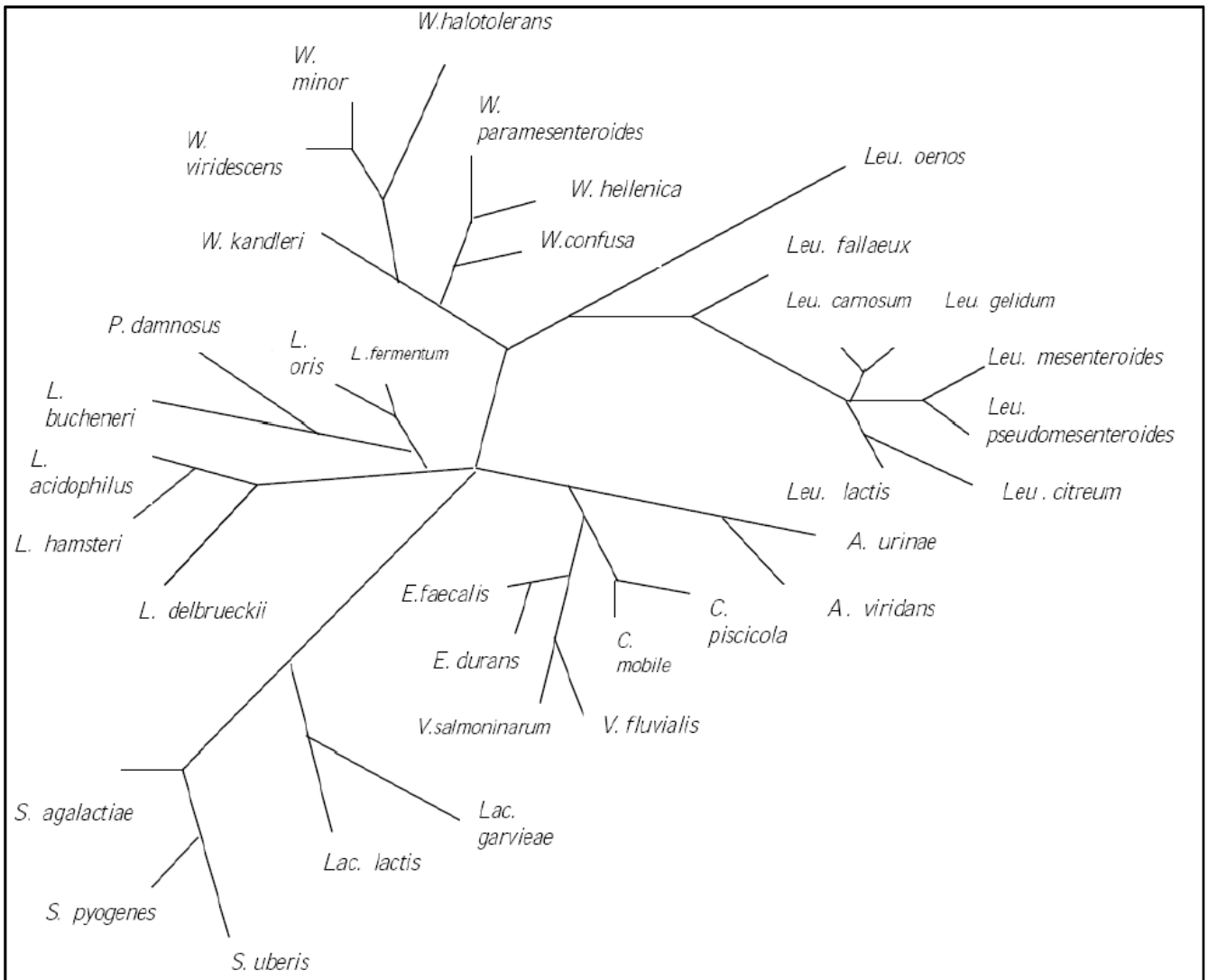
Deste modo, a fim de esclarecer os resultados obtidos, os pesquisadores realizaram o sequenciamento do gene 16S de rRNA destas bactérias. As análises dos valores correspondentes às distâncias evolucionárias entre os microrganismos desconhecidos e grupos de bactérias do ácido láctico, evidenciaram uma forte relação filogenética entre as cepas isoladas de salsicha, algumas linhagens de *Lactobacillus* e a espécie *Leuconostoc paramesenteroides*. Assim, o gênero *Weissella* foi proposto com o intuito de abranger estes microrganismos, sendo a linhagem desconhecida classificada como *Weissella hellenica* (Viegas, 2008).

A designação de espécies de *Lactobacillus* e *Leuconostoc* para o novo gênero *Weissella* e as inter-relações entre os membros deste gênero e outras bactérias do ácido láctico são mostradas na tabela 3 e na figura 3, respectivamente.

**Tabela 3** - Designação de espécies de *Lactobacillus* e *Leuconostoc* para o novo gênero *Weissella*.

<b>Antiga Designação</b>	<b>Nova Designação</b>
<i>Leuconostoc paramesenteroides</i>	<i>Weissella paramesenteroides</i>
<i>Lactobacillus confusus</i>	<i>Weissella confusa</i>
<i>Lactobacillus halotolerans</i>	<i>Weissella halotolerans</i>
<i>Lactobacillus kandleri</i>	<i>Weissella kandleri</i>
<i>Lactobacillus minor</i>	<i>Weissella minor</i>
<i>Lactobacillus viridescens</i>	<i>Weissella viridescens</i>

Fonte: Collins *et al.*, 1993.



**Figura 3** - Árvore filogenética mostrando as inter-relações entre os gêneros de bactérias do ácido láctico. A, *Aerococcus*; C, *Carnobacterium*; E, *Enterococcus*; L, *Lactobacillus*; Lac, *Lactococcus*; Leu, *Leuconostoc*; P, *Pediococcus*; S, *Streptococcus*; V, *Vagococcus*; W, *Weissella*. (Fonte: Collins *et al.*, 1993).

O gênero *Weissella* pertence à família *Leuconostocaceae*, ordem *Lactobacillales*, classe *Bacilli* e filo *Firmicutes* (Collins *et al.*, 1993). Assim como os lactobacilos, também é considerado um grupo de bactérias do ácido láctico, incluindo microrganismos heterofermentadores obrigatórios, com formato de cocos ou bastonetes, gram positivo, catalase negativo, não esporulantes, microaerófilos e geralmente imóveis (Chelo, Zé-Zé e Tenreiro, 2010).

Até o momento foram descritas 13 espécies (Fusco *et al.*, 2011), isoladas de fontes variadas como o solo, vegetais, carnes, peixes, alimentos fermentados, além do trato gastrointestinal e vaginal humano e de animais (Sirirat, Thosaporn, e Somkiat, 2008; Valerio *et al.*, 2009). Além disso, alguns trabalhos já mostraram a possibilidade do desenvolvimento de probióticos a partir de representantes deste gênero, como *W. confusa* e *W. kimchii* (Nam *et al.*, 2002 e Lee, 2005).

### 1.5 IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁTICO

As bactérias do ácido lático são um grupo de microrganismos de grande diversidade ecológica e fenotípica, conseqüentemente, uma grande diversidade taxonômica pode ser notada como reflexo destas características (figura 3) (Berger *et al.*, 2007). Devido a isto, a identificação destas por métodos fenotípicos é uma tarefa árdua, sendo necessários, por exemplo, cerca de dezessete testes para determinar com alguma precisão um isolado de *Lactobacillus* ao nível de espécie (Tannock *et al.*, 1999).

De acordo com Klein e colaboradores (1998), a aplicação de ensaios fenotípicos visando à designação das culturas probióticas empregadas em produtos comerciais tem promovido divergências na identificação, sendo observados erros como, por exemplo, espécies de *L. johnsonii* e *L. gasseri* relatadas como *L. acidophilus* e cepas de *L. paracasei* descritas como *L. casei*. Como alternativa a utilização dos vários testes fenotípicos, técnicas moleculares tem sido aplicadas com sucesso para análise filogenética, estudo de ecologia microbiana de ecossistemas e identificação de microrganismos dos gêneros de BAL (Floresta, 2003; Lee *et al.*, 2008).

Dentre as abordagens moleculares, a técnica conhecida como ARDRA (análise de restrição do DNA ribossômico amplificado), que utiliza-se das características dos operons ribossomais (*rrn*) é uma das mais recomendadas na determinação de gêneros de BAL e espécies de *Lactobacillus* (Junior, Teixeira e Reis, 2004). De acordo com Nour (1998), os genes dos operons *rrn* estão organizados na seguinte ordem: 5'-16S-ITS1-23S-ITS2-5S-3' (ITS - sigla em inglês para "espaçador interno transcrito"), sendo que a região ITS 1 pode apresentar a inserção de um gene de tRNA-Ala (espaçador médio), dos genes tRNA-Ala e tRNA-Ile (espaçador longo) ou nenhuma inserção (espaçador curto) (Magalhães, Floresta e Moraes, 2005). Assim, a amplificação da região intergênica dos genes 16S e 23S presentes no operon *rrn* permite a distinção entre os gêneros *Streptococcus* (uma única ITS 1), *Enterococcus* (duas ITS 1 diferentes), *Lactobacillus/Weissella* (cada um com três ITS 1 diferentes).

Após esta diferenciação, pode-se realizar a digestão dos amplicons gerados com um conjunto de enzimas de restrição para designação das espécies (PCR-ARDRA), sendo que um conjunto de 12 enzimas devem ser usadas distinguir as espécies de *Lactobacillus* (Moreira *et al.*, 2005) e 3 para identificar espécies de *Weissella* (Jang *et al.*, 2002), ou ainda os microrganismos podem ser identificados pelo sequenciamento do gene 16S do rRNA (Viegas, 2008).

## 2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

A taxa de crescimento é um dos principais indicadores que afetam a rentabilidade da produção de carne de porco. Redução na taxa de crescimento e no índice de conversão alimentar pelo animal irá resultar em menor rentabilidade, devido à menor produção e aumento dos custos.

Com a intensificação da produção suinícola os criadores passaram a adotar um desmame antecipado dos leitões, visando aumentar o potencial produtivo da matriz (Castro *et al.*, 2009). Este fator, associado a problemas imunológicos que também afetam os animais nesta fase, visto que sua imunidade ainda não é completamente efetiva, promovem à diminuição no consumo de alimento, ausência ou redução de ganho de peso e frequentemente diarréias, morbidez e morte (Pancheniak, 2005; Gheler, 2009).

Os antibióticos e quimioterápicos tradicionalmente usados para o tratamento de diarréias (como tetraciclina, estreptomicina, neomicina, cloranfenicol e sulfas) mostram-se ineficazes no controle da disenteria, pois se verifica uma tendência à apresentação de casos de resistência, como consequência do uso frequente de alguns princípios ativos (Santos *et al.*, 2003).

Neste sentido, o uso de probióticos na alimentação de suínos visando um melhor desempenho no crescimento e no índice de conversão alimentar dos animais, sem a utilização dos tradicionais promotores de crescimento, pode ser visto como uma alternativa eficaz, uma vez que estes permitem a eliminação de resíduos dos antimicrobianos nas carcaças, atendendo as exigências do mercado para a exportação, além de outros benefícios relevantes, como o controle de diarreia e a imunoestimulação.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Selecionar novas linhagens de bactérias lácticas com potencial probiótico isoladas de diferentes mucosas de suínos para possível uso em suplementação alimentar, promoção de crescimento ou como adjuvante imune.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Isolar bactérias lácticas de amostras de campo coletadas da boca, trato gastrointestinal e vias aéreas de suínos;
2. Identificar as espécies de lactobacilos pela amplificação e restrição da região 16S-23S do rRNA;
3. Caracterizar as propriedades probióticas dos isolados de suínos: teste de resistência a ácido gástrico e a sais biliares, avaliação da natureza hidrofóbica da superfície celular e capacidade antagonista contra espécies patogênicas;
4. Selecionar as linhagens com melhores respostas frente aos testes de caracterização probiótica para possível utilização como aditivo alimentar.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 AMOSTRAS

As amostras foram coletadas de suínos (*Sus domesticus*) presentes em uma granja da empresa Piglândia, localizada no Sítio Boa Vista, município de Coimbra, Minas Gerais. A granja é de ciclo completo, sendo os animais provenientes de cruzamento industrial, onde as principais raças envolvidas na linhagem macho são o Pietrain e Duroc e na linhagem fêmea Large White e Landrace. O desmame é precoce, realizado aos 21 dias, e a ração utilizada é composta basicamente com uma parte de milho e soja associados ao *premix* (compostos produzidos por empresas de nutrição com os valores dos complexos vitamínicos e minerais já estabelecidos).

Seis leitões, com aproximadamente 14 dias de vida que não receberam outra dieta a não ser o leite materno, foram usados para o isolamento de bactérias lácticas do trato gastrointestinal, nasal e oral. Além disso, foram coletadas amostras da boca e focinho de duas porcas adultas também isentas de tratamento com antimicrobianos.

Após a coleta o material experimental foi armazenado a 4°C e transportado para o Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos (LEFM), localizado no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, onde foi realizado o processamento imediato das amostras.

### 4.2 ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS LÁCTICAS DE SUÍNOS LACTENTES E ADULTOS

As amostras de fezes, swabs bucais e nasais foram suspensas e homogeneizadas em função do peso, numa diluição  $10^{-2}$  em salina tamponada estéril (5,61g NaCl, 1,0g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,11g KCl por litro). As amostras foram diluídas seriadamente e plaqueadas em meio De Man, Rogosa e Sharpe (MRS) ágar Merck (56 g/L MRS e 1,5% ágar bacteriológico Biobrás) e incubadas a 37°C em câmara de anaerobiose (Forma Scientific, Marietta, USA) contendo uma atmosfera de 85% de  $\text{N}_2$ , 10% de  $\text{H}_2$  e 5% de  $\text{CO}_2$ , durante 24 a 48 horas.

Em placas contendo em torno de 100 UFCs, colônias morfologicamente diferentes foram isoladas com o auxílio de uma alça de platina e plaqueadas por esgotamento em meio MRS ágar Difco (56g/L MRS e 1,5% ágar bacteriológico Biobrás) nas mesmas condições anteriores. Uma colônia deste isolado foi repicada e crescida em 5 mL de MRS caldo Difco.

### *4.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOTINTORIAL E FISIOLÓGICA DOS MICRORGANISMOS*

Os isolados foram submetidos a uma observação microscópica após coloração de Gram para caracterização morfotintorial. As bactérias que se apresentaram como Gram positivo e com formato bacilar foram selecionadas. Os microrganismos selecionados foram então submetidos ao teste de catalase em lâmina, utilizando-se H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30%.

### *4.4 PURIFICAÇÃO E MANUTENÇÃO DOS MICRORGANISMOS*

Os microrganismos isolados que possuíam as características morfotintoriais e fisiológicas de interesse (Gram positivo, formato bacilar e catalase negativo), foram inoculados em 5 mL de MRS caldo (Merck), incubados em câmara de anaerobiose, à 37°C durante 24 a 48 horas, sendo em seguida utilizada uma alíquota de 1 mL adicionada de glicerol esterilizado (30%) para manutenção em Deep Freezer a -80°C (Bio Freezer, Forma Scientific, Marietta, USA).

### *4.5 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS*

A identificação molecular das bactérias lácticas isoladas de suínos foi realizada no Laboratório de Genética Molecular de Protozoários Parasitas (LGMPP), localizado no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

#### *4.5.1 Extração de DNA genômico*

O DNA foi extraído de culturas puras de 18 horas crescidas em 10 mL de meio MRS. Antes da extração do DNA genômico com o kit NucleoSpin Tissue XS (Macherey-Nagel) as bactérias foram submetidas a um pré-tratamento, no qual os isolados bacterianos foram centrifugados, lavados com 1 mL de água deionizada e ressuspensos em 1 mL de LiCl 5M sob agitação por uma hora. Depois disto, foi realizada outra centrifugação, seguida do descarte do sobrenadante, lavagem com 1 mL de água deionizada e o pellet ressuspensado

em tampão TES (50mM de Tris-HCl pH 8.0, 10mM de EDTA e 25mM de Sacarose) contendo lisozima (10 mg/mL) e mantido a 37°C durante uma hora.

#### 4.5.2 PCR-ARDRA

A identificação dos isolados ao nível de espécie foi realizada a partir da Análise de Restrição do DNA Ribossômico Amplificado (PCR-ARDRA), conforme descrito por Moreira e colaboradores (2005). O espaçador interno transcrito 1 (ITS 1) foi amplificado utilizando-se um par de iniciadores que se anelam a regiões conservadas dos genes 16S e 23S, 16-1A (5' GAATCGCTAGTAATCG 3') e 23-1B (5' GGGTTCCCCCAT TCGGA 3') (Tilsala-Timisjarvi e Alatosava, 1997).

O programa utilizado para amplificação foi: 1 ciclo (95°C por 2 minutos), 35 ciclos (95°C por 30 segundo, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto) e o último ciclo (72°C por 5 minutos). Os amplicons foram digeridos utilizando 12 enzimas de restrição (*SphI*, *NcoI*, *NheI*, *SspI*, *SfiI*, *EcoRV*, *DraI*, *VspI*, *HinII*, *EcoRI*, *HindIII* e *AvrII*), sendo em seguida submetidos à eletroforese em gel de agarose (1,4%) e visualizados em transiluminador de UV, após coloração com brometo de etídio. O perfil de digestão obtido foi comparado com um perfil de digestão teórico das sequências depositadas no *GenBank* (Anexo 1).

Os isolados que não apresentaram perfil compatível com o existente no Anexo 1 foram encaminhados para sequenciamento no Núcleo de Análise de Genoma e Expressão Gênica (NAGE), localizado no Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Estes isolados tiveram o gene 16S rRNA sequenciado pelo método de Sanger, utilizando-se um sequenciador automático MegaBACE™ 1000 (GE HealthCare). Os primers usados foram o 27F (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') e 1492R (5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3') (Reysenbach, Longnecker, e Kirshtein, 2000).

#### 4.6 CARACTERIZAÇÃO PROBIÓTICA

Todos os experimentos para caracterização probiótica dos isolados foram realizados três vezes independentemente, em triplicata, com exceção do teste de antagonismo, conduzido duas vezes em duplicata.

#### 4.6.1 Reativação

Para cada um dos testes de caracterização probiótica os isolados estocados a  $-80^{\circ}\text{C}$  foram reativados por meio de duas passagens em meio MRS caldo a partir de um inóculo de 2% (v/v). Em cada uma das passagens os isolados foram mantidos em câmara de anaerobiose por 18 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  para o crescimento.

#### 4.6.2 Resistência ao suco gástrico

A técnica utilizada foi adaptada de Neumann (1991). As culturas foram distribuídas em dois microtubos e então diluídas 10X em solução salina 0,9%, pH 7.0 (controle) e em suco gástrico artificial ( $\text{NaCl}$  2  $\text{g.L}^{-1}$ , pepsina 3.2  $\text{g.L}^{-1}$ , pH 2.5). Os microtubos foram incubados a  $37^{\circ}\text{C}$  por 3h e, posteriormente, foram centrifugados (13000rpm/1minuto), o sobrenadante descartado e as colônias ressuspendidas em meio MRS caldo.

A fim de avaliar a viabilidade das células, foram aplicados 200  $\mu\text{L}$ /poço dos inóculos do controle e das colônias tratadas com suco gástrico artificial em uma microplaca que foi incubada em espectrofotômetro (Microplate Spectrophotometer System SpectraMax 340 - Molecular Devices) a  $37^{\circ}\text{C}$ . A absorbância do cultivo foi determinada pela leitura de  $\text{OD}_{620\text{nm}}$  a cada 30 minutos, durante 12 horas, e a porcentagem de inibição de crescimento foi calculada utilizando o programa Origin 7.0 pela fórmula  $(1-\text{SG}/\text{CT}) \times 100$ , onde SG e CT correspondem a área sob a curva de crescimento das bactérias tratadas com suco gástrico artificial e do controle, respectivamente.

#### 4.6.3 Resistência a sais biliares

Para o teste de resistência a sais biliares utilizou-se o protocolo estabelecido por Walker e Gilliland (1993), adaptado para microplacas. Os isolados foram crescidos a uma  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  de 0,6 e 2% (v/v) inoculados em MRS caldo puro e MRS contendo 0,3% (p/v) de sais biliares (oxgall). As condições de incubação da placa, a determinação da densidade óptica do cultivo e o cálculo da porcentagem de inibição seguiram o mesmo procedimento descrito para o teste de resistência ao suco gástrico artificial (item 4.6.2).

#### 4.6.4 Hidrofobicidade da superfície celular

A hidrofobicidade da superfície celular dos isolados foi avaliada pelo método de Adesão Microbiana a Solventes (MATS – “Microbial Adhesion to Solvents”) (Kos *et al.*, 2003). Culturas em fase estacionária foram centrifugadas (3500rpm/10minutos), lavadas duas vezes com 1 mL de PBS (137 mM de NaCl, 2.7 mM de KCl, 4.3 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 1.47 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH de 7.4) e ressuspensas em 1 mL de solução de KNO<sub>3</sub> (0,1 M, pH 6,2), sendo a OD<sub>600nm</sub> ajustada para valores entre 0,5 e 0,9 (A<sub>0</sub>). Posteriormente, 20 µL de xileno foram adicionados a 120 µL da suspensão bacteriana.

Após uma pré-incubação de 10 minutos à temperatura ambiente, o sistema de duas fases foi homogeneizado em vórtex por 2 minutos e, em seguida, mantido em repouso durante 50 minutos. A fase aquosa foi removida e sua absorbância a 600nm foi medida (A<sub>1</sub>). A MATS foi calculada pela porcentagem de bactérias associadas ao xileno de acordo com a fórmula:  $MATS = (1 - A_1/A_0) \times 100$ .

#### 4.6.5 Atividade antagonista

O ensaio para detecção do efeito antagonista dos isolados de suínos foi realizado pela técnica de difusão em sobrecamada de ágar, utilizando patógenos Gram positivo e negativo: *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25723, *Salmonella entérica* sorovar typhimurium ATCC 14028, e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853.

As cepas patogênicas utilizadas como reveladoras foram ativadas com inóculo de 2% (v/v) em caldo BHI (“Brain Heart Infusion” – Acumedia) e crescidas em aerobiose a 37°C por 24 horas, com exceção da bactéria *Listeria monocytogenes* que foi ativada em meio TSB (“Trypticase Soy Broth” – Acumedia) suplementado com 0,5% levedura (p/v) e crescida a 28°C.

As placas contendo ágar MRS 1,5% foram preparadas e armazenadas 24 horas a 4°C e, em seguida, incubadas durante 12 horas a 37°C. Os isolados foram reativados (item 4.6.1) e, passado o período de incubação das placas, foram feitos spots de 5 µL na superfície do ágar MRS. As placas foram incubadas por um período de 24 horas em anaerobiose a 37°C.

Após o período de crescimento dos isolados, as placas foram retiradas da câmara de anaerobiose e os isolados expostos ao vapor de clorofórmio (1 mL em papel filtro), por 30

minutos, para promover a morte das células. Em seguida, as placas foram abertas, por 40 minutos, para evaporação do clorofórmio residual e uma sobrecamada de meio contendo ágar semi-sólido (0,75%), previamente inoculado com as amostras reveladoras, foi vertida sobre a placa.

Posteriormente, as placas foram incubadas em condições específicas para o crescimento de cada uma das bactérias patogênicas e o halo de inibição formado ao redor do *spot* foi medido com o auxílio de um paquímetro digital, a fim de determinar a capacidade antagonista dos isolados.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA

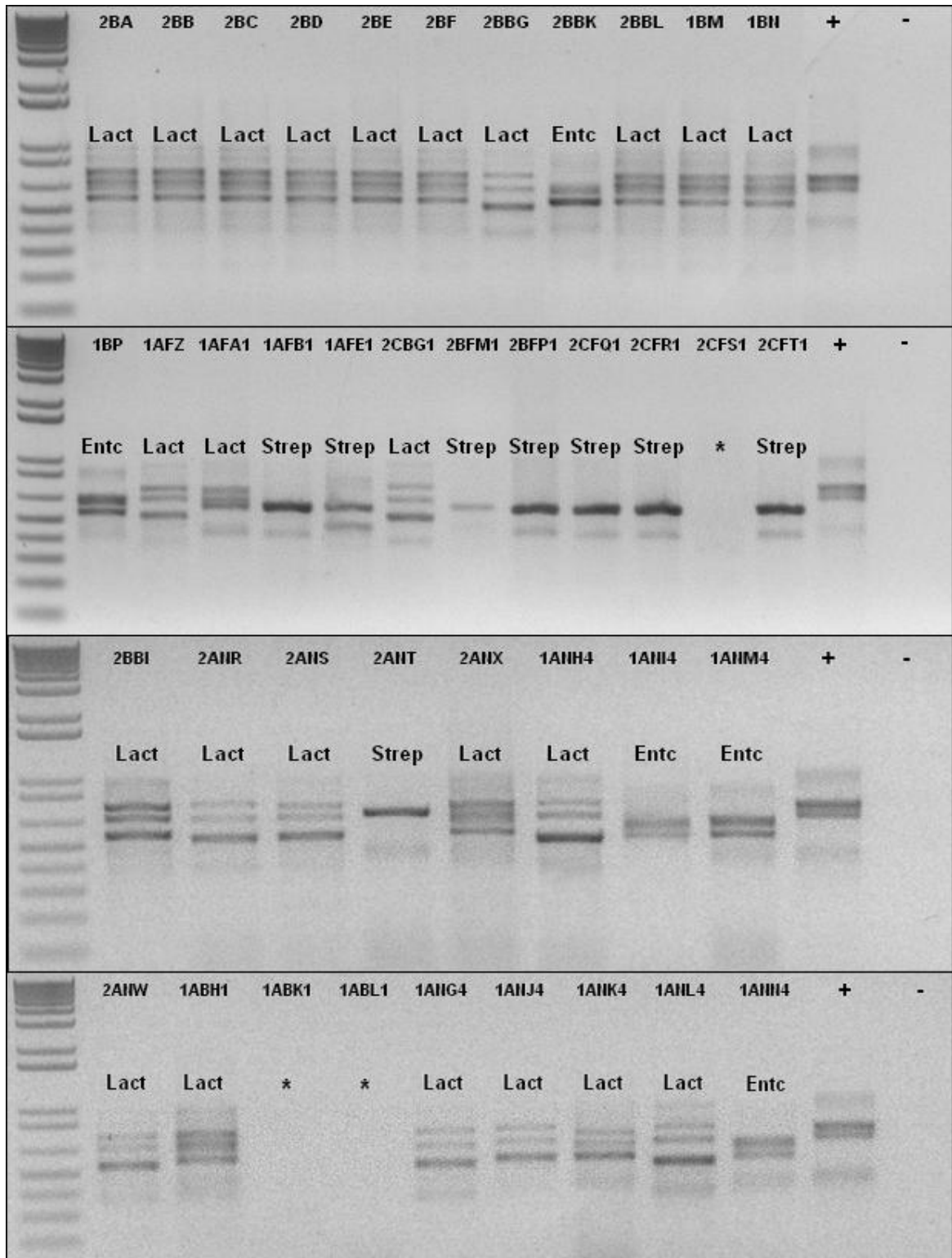
Cinquenta e seis isolados bacterianos foram obtidos das amostras de boca, focinho e fezes de oito suínos e submetidos à coloração de Gram e prova de catalase. Dez microrganismos se apresentaram como Gram negativo e seis como catalase positivo, sendo estes retirados do *pool* de amostras por não estarem em conformidade com as características fenotípicas de bactérias láticas (Bernardeau *et al.*, 2008). Assim, permaneceram 40 isolados, dos quais 17 referentes à boca, 13 ao focinho e 10 às fezes dos suínos, como mostra a tabela 4.

**Tabela 4** - Bactérias Gram positivo e catalase negativo isoladas de boca, focinho e fezes de suínos.

Boca			Focinho		Fezes	
2BA	2BBI	1ABH1	1ANG4	1ANN4	1AFZ	2CFR1
2BB	2BBK	1ABK1	1ANH4	2ANR	1AFA1	2CFS1
2BC	2BBL	1ABL1	1ANI4	2ANS	1AFB1	2CFT1
2BD	1BM		1ANJ4	2ANT	1AFE1	
2BE	1BN		1ANK4	2ANW	2BFM1	
2BF	1BP		1ANL4	2ANX	2BFP1	
2BBG	2CBG1		1ANM4		2CFQ1	

### 5.2 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS

Há um consenso na comunidade científica de que métodos fenotípicos não são suficientes para permitir uma classificação acurada ao nível de espécie das bactérias do ácido láctico (Klein *et al.*, 1998; Tannock, 1999; Saarela, 2000; Oliveira *et al.*, 2002). Portanto, os isolados pré-selecionados pela caracterização morfofisiológica foram submetidos à identificação molecular por PCR dos espaçadores 16S-23S, o qual evidenciou a presença de quatro gêneros de BAL: *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Lactobacillus/Weissella* (figura 4).



**Figura 4** - Identificação dos isolados bacterianos de suínos por PCR 16S-23S. Strep: *Streptococcus*. Entc: *Enterococcus*. Lact: *Lactobacillus/Weissella*. (+) Controle positivo. (-) Controle negativo. \* isolados com baixo rendimento na obtenção do DNA genômico. As bandas localizam-se entre 500 e 750 pb.

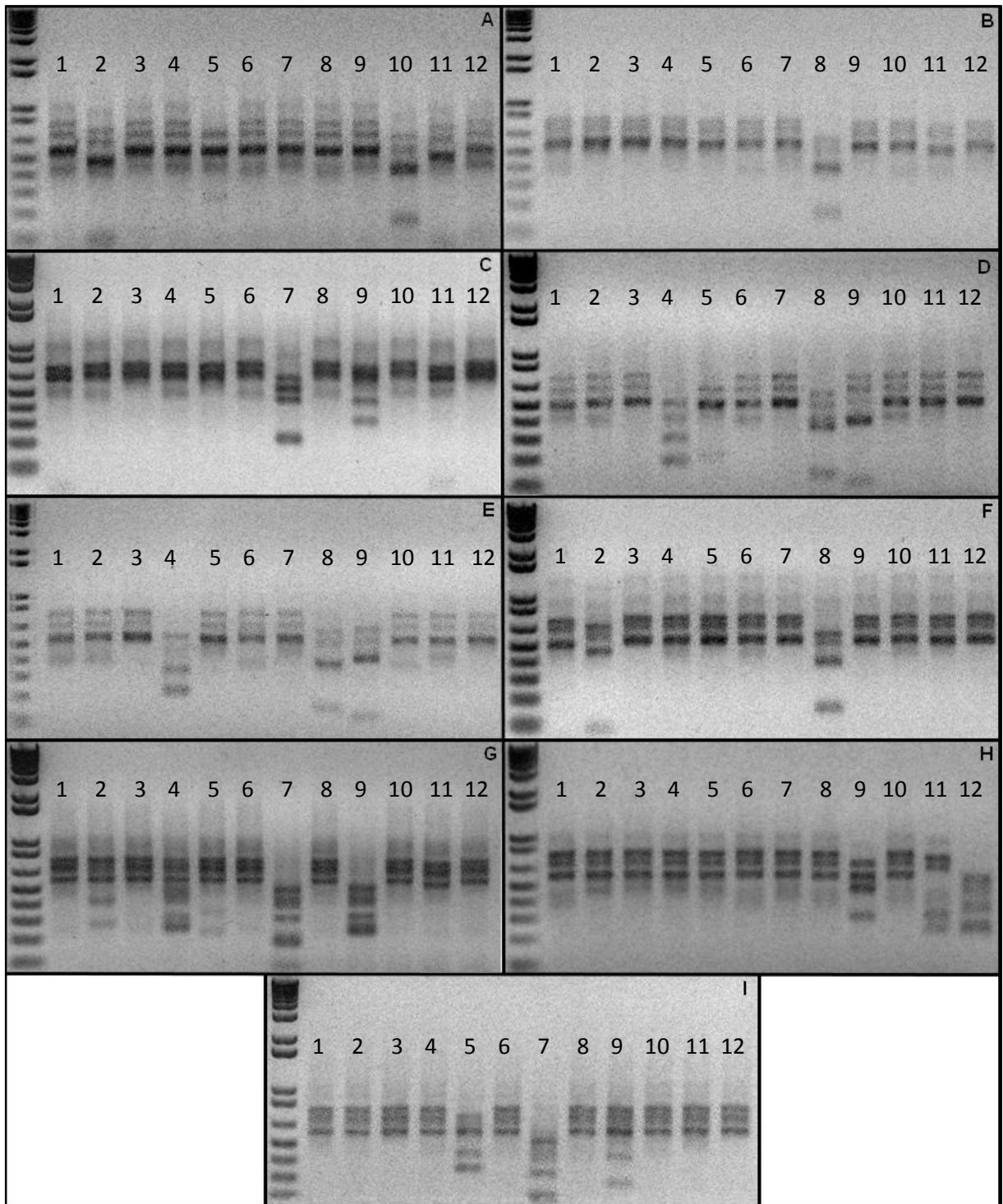
A distinção destes gêneros é possível devido às duplicações e inserções de sequência presentes no espaçador interno transcrito 1 (ITS 1) da região 16S-23S do rRNA (Nour, 1998; Magalhães, Floresta e Moraes, 2005). Os *Streptococcus* spp. apresentam apenas uma destas regiões, os *Enterococcus* spp. possuem dois espaçadores diferentes e as espécies de *Lactobacillus* e *Weissella* mostram três ITS 1 distintas. Assim, como demonstrado na figura 4, dos 40 isolados, a princípio, 8 são *Streptococcus*, 5 *Enterococcus* e 24 *Lactobacillus/Weissella*.

As amostras pertencentes ao grupo *Lactobacillus/Weissella* tiveram seus amplicons tratados com doze enzimas de restrição (item 4.5.2 metodologia), e o perfil obtido foi comparado com um perfil de digestão teórico (Anexo 1), a fim de identificá-los ao nível de espécie (Moreira *et al.*, 2005).

A digestão enzimática mostrou seis espécies de lactobacilos (*L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. murinus*, *L. plantarum* A, *L. paraplantarum/pentosus/plantarum* B e *L. reuteri* B) e três grupos que não apresentaram perfis de restrição compatíveis com o perfil teórico analisado (denominados LAB 1 a 3) (figuras 5 e 6), que foram encaminhados para o sequenciamento do gene 16S do rRNA no Núcleo de Análise de Genoma e Expressão Gênica (NAGE/UFMG). Além disso, três isolados não foram identificados devido ao baixo rendimento na obtenção do DNA genômico (2CFS1, 1ABK1, 1ABL1).

As sequências obtidas pelo sequenciamento foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados do *GenBank* utilizando o algoritmo BLAST (Apêndice A). A análise demonstrou que os isolados descritos como LAB 1 (2BA, 2BB, 2BC, 2BD, 2BE, 2BF, 1ABH1 e 2ANX) e LAB 2 (2BBI), apesar de apresentarem perfis de restrição diferentes (figura 5) são pertencentes a mesma espécie, identificada como *Weissella paramesenteroides*. Já os isolados LAB 3 (2BBL, 1BM e 1BN) foram identificados como *Weissella cibaria*. A relação dos isolados e sua respectiva identificação encontra-se na tabela 5.

A espécie mais frequente, considerando-se todos os isolados, foi *Weissella paramesenteroides*, com 30% de abundância, seguida pelos *Streptococcus* spp. com 22% (figura 6). Em relação aos nichos de isolamento, observou-se o predomínio das espécies de *Weissella paramesenteroides* na boca, dos *Streptococcus* spp. nas fezes e nenhuma espécie se destacou quando comparada as demais no focinho.



**Figura 5** - Perfis de restrição dos isolados de suínos pertencentes ao grupo *Lactobacillus/Weissella* obtidos por PCR-ARDRA (16S-23S). (A) *L. acidophilus*, (B) *L. brevis*, (C) *L. murinus*, (D) *L. plantarum* A, (E) *L. paraplantarum/pentosus/plantarum* B e (F) *L. reuteri* B, (G) LAB 3, (H) LAB 2, (I) LAB 1. As enzimas (1 a 12) são apresentadas no anexo 1.

Tabela 5 - Identificação das espécies bacterianas isoladas de suínos.

ISOLADO	LOCAL	ESPÉCIE	ISOLADO	LOCAL	ESPÉCIE
2BA	Boca	<i>W. paramesenteroides</i>	1ANJ4	Focinho	<i>W. paramesenteroides</i>
2BB	Boca	<i>W. paramesenteroides</i>	1ANK4	Focinho	<i>W. paramesenteroides</i>
2BC	Boca	<i>W. paramesenteroides</i>	1ANL4	Focinho	<i>L. acidophilus</i>
2BD	Boca	<i>W. paramesenteroides</i>	1ANM4	Focinho	<i>Enterococcus</i> sp.
2BE	Boca	<i>W. paramesenteroides</i>	1ANN4	Focinho	<i>Enterococcus</i> sp.
2BF	Boca	<i>W. paramesenteroides</i>	2ANR	Focinho	<i>L. plantarum</i> B/ pentosus/ <i>paraplantarum</i>
2BBG	Boca	<i>L. plantarum</i> A	2ANS	Focinho	<i>L. brevis</i>
2BBI	Boca	<i>W. paramesenteroides</i>	2ANT	Focinho	<i>Streptococcus</i> sp.
2BBK	Boca	<i>Enterococcus</i> sp.	2ANW	Focinho	<i>L. brevis</i>
2BBL	Boca	<i>W. cibaria</i>	2ANX	Focinho	<i>W. paramesenteroides</i>
1BM	Boca	<i>W. cibaria</i>	1AFZ	Fezes	<i>L. reuteri</i> B
1BN	Boca	<i>W. cibaria</i>	1AFA1	Fezes	<i>L. murinus</i>
1BP	Boca	<i>Enterococcus</i> sp.	1AFB1	Fezes	<i>Streptococcus</i> sp.
2CBG1	Boca	<i>L. plantarum</i> A	1AFE1	Fezes	<i>Streptococcus</i> sp.
1ABH1	Boca	<i>W. paramesenteroides</i>	2BFM1	Fezes	<i>Streptococcus</i> sp.
1ABK1	Boca	Não determinado*	2BFP1	Fezes	<i>Streptococcus</i> sp.
1ABL1	Boca	Não determinado*	2CFQ1	Fezes	<i>Streptococcus</i> sp.
1ANG4	Focinho	<i>L. plantarum</i> B/ pentosus/ <i>paraplantarum</i>	2CFR1	Fezes	<i>Streptococcus</i> sp.
1ANH4	Focinho	<i>L. acidophilus</i>	2CFS1	Fezes	Não determinado*
1ANI4	Focinho	<i>Enterococcus</i> sp.	2CFT1	Fezes	<i>Streptococcus</i> sp.

\* não determinado devido ao baixo rendimento na obtenção do DNA genômico.

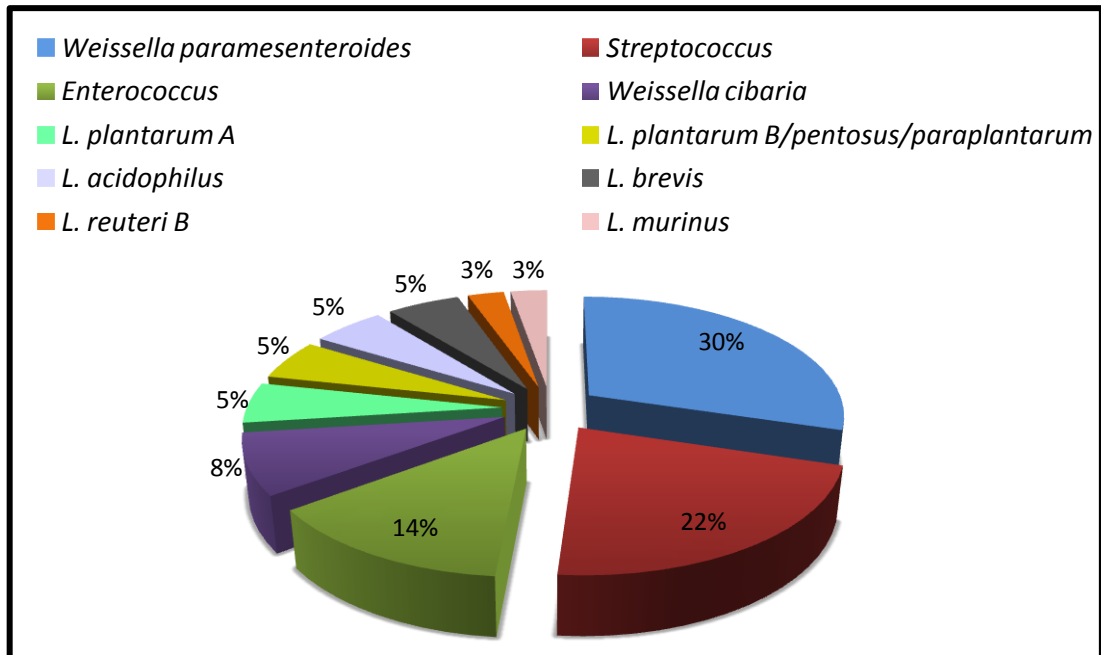


Figura 6 - Abundância de espécies isoladas de suínos.

### 5.3 CARACTERIZAÇÃO PROBIÓTICA

A caracterização probiótica constou da determinação das propriedades funcionais *in vitro* dos isolados de suínos pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Weissella*, pelo fato destes microrganismos já estarem descritos na literatura como probióticos efetivos (Nam *et al.*, 2002 e Lee, 2005; De Keersmaecker *et al.*, 2006; Pridmore *et al.*, 2008; Todorov, 2009; Rivera-Espinoza e Gallardo-Navarro, 2010).

#### 5.3.1 Resistência ao suco gástrico

A primeira barreira fisiológica do organismo à entrada das bactérias no intestino é o suco gástrico secretado no estômago (Morelli *et al.*, 2000). Nos suínos, a secreção do ácido clorídrico inicia-se por volta dos oito dias e o pH do estômago varia de aproximadamente 2,80 a 4,20 dependendo da idade do animal, sendo o tempo de contato do alimento com as condições de acidez em torno de 3 horas (Martins *et al.*, 2006).

Desta forma, a fim de analisar a resistência dos isolados de suínos ao ácido gástrico, estes microrganismos foram expostos ao suco gástrico artificial pH 2,5 por 3 horas e o crescimento em MRS dos microrganismos tratados acompanhado durante 18 horas. Os

dados foram plotados em gráficos e a porcentagem de inibição calculada pela diferença da área sob a curva de crescimento gerada do controle em relação às bactérias tratadas com suco gástrico (tabela 6). Os gráficos referentes à cinética de crescimento são apresentados no Apêndice B.

**Tabela 6** - Porcentagem de inibição dos isolados bacterianos de suínos na presença de suco gástrico artificial.

ISOLADO	INIBIÇÃO (%)	ISOLADO	INIBIÇÃO (%)
<i>W. paramesenteroides</i> 2BA	100	<i>W. paramesenteroides</i> 1ABH1	100
<i>W. paramesenteroides</i> 2BB	100	<i>L. plantarum</i> B/ pentosus/ <i>paraplantarum</i> 1ANG4	100
<i>W. paramesenteroides</i> 2BC	99,66	<i>L. acidophilus</i> 1ANH4	7,49
<i>W. paramesenteroides</i> 2BD	99,41	<i>W. paramesenteroides</i> 1ANJ4	99,18
<i>W. paramesenteroides</i> 2BE	100	<i>W. paramesenteroides</i> 1ANK4	0
<i>W. paramesenteroides</i> 2BF	100	<i>L. acidophilus</i> 1ANL4	93,76
<i>L. plantarum</i> A 2BBG	30	<i>L. plantarum</i> B/ pentosus/ <i>paraplantarum</i> 2ANR	100
<i>W. paramesenteroides</i> 2BBI	96,51	<i>L. brevis</i> 2ANS	72,81
<i>W. cibaria</i> 2BBL	27,89	<i>L. brevis</i> 2ANW	92,49
<i>W. cibaria</i> 1BM	56,80	<i>W. paramesenteroides</i> 2ANX	100
<i>W. cibaria</i> 1BN	92,88	<i>L. reuteri</i> B 1AFZ	86,13
<i>L. plantarum</i> A 2CBG1	0	<i>L. murinus</i> 1AFA1	100

Como pode ser observado na tabela 6, a exposição dos isolados ao suco gástrico artificial mostrou ser um fator altamente discriminatório, com dezessete isolados (70,83%) sendo fortemente inibidos (inibição  $\geq 75\%$ ), cinco isolados (20,83%) com baixas taxas de inibição ( $\leq 50\%$ ) e apenas duas cepas (8,33%) mostrando certa tolerância às condições testadas (inibição entre 50 e 75%).

A origem intestinal tem sido relatada como um critério relevante para a seleção de linhagens probióticas, pois é esperado um melhor funcionamento das cepas em um ambiente semelhante àquele em que ela foi isolada (Morelli, 2000; Saarela, 2000). Entretanto, observando os isolados de fezes *Lactobacillus murinus* 1AFA1 e *Lactobacillus reuteri* B 1AFZ, nota-se que este fato não deve ser generalizado, uma vez que estas duas cepas mostraram-se sensíveis ao suco gástrico artificial e provavelmente não sobreviveriam ao trânsito gastrointestinal.

Além disso, experimentos têm demonstrado que linhagens de BAL geralmente são tolerantes às condições ácidas em estudos *in vitro* (Du Toit *et al.*, 1998; Jacobsen *et al.*, 1999; De Angelis *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2007; Mirlohi *et al.*, 2009). Mais uma vez, observa-se que esta característica apresenta suas exceções, já que há evidente variabilidade entre as cepas probióticas aqui estudadas.

Guo e colaboradores (2010), triando lactobacilos isolados das fezes e intestino de leitões, para aplicação como probiótico, observaram significativa inibição de crescimento dos microrganismos frente ao desafio com suco gástrico artificial. Estes autores acreditam que a baixa resistência de bactérias probióticas frequentemente constatada é consequência das condições extremas utilizadas para simular o ambiente gástrico, sendo muitas vezes usados valores de pH inferiores e tempo de exposição superiores aos encontrados *in vivo*.

Além disso, Ruiz-Moyano e colaboradores (2008), analisando bactérias lácticas isoladas de suínos em condições de acidez semelhantes às empregadas neste trabalho, registraram resultados equivalentes, com apenas 16,34% de isolados ácido-tolerantes.

### 5.3.2 Resistência aos sais biliares

A bile é um importante componente antimicrobiano do sistema digestivo formada por várias substâncias, dentre as quais se destacam os sais biliares que são moléculas capazes de promover danos na membrana e na estrutura do DNA bacteriano (Merritt e Donaldson, 2009). Portanto, a tolerância a estes compostos é fundamental para sobrevivência do probiótico no trato gastrointestinal (Lebeer, Vanderleyden, e De Keersmaecker, 2008).

Gilliland, Staley e Bush (1984) descreveram que para uma bactéria ser considerada resistente à bile ela deve atingir uma absorbância de 0,3 após seis horas de incubação com 0,3% de sais biliares (oxgall). Utilizando-se deste parâmetro, curvas de crescimento dos isolados na presença (MRS + 0,3% oxgall) e ausência de sais biliares (MRS puro) foram avaliadas e os isolados bacterianos suínos classificados como resistentes, tolerantes ou sensíveis. Os gráficos referentes à cinética de crescimento são apresentados no Apêndice C e a classificação dos isolados é mostrada na tabela 7.

Baseando-se na proposta dos autores citados, a maioria dos isolados analisados são considerados tolerantes aos sais biliares (66,66%), sendo que uma parcela menor é sensível (12,5%) e alguns se apresentaram resistente (20,83%).

Dentre as seis espécies resistentes, a *Weissella paramesenteroides* 1ANK4 teve melhor crescimento, alcançando uma absorbância de 0,6 em seis horas de incubação com um crescimento rápido e gradativo. Já os isolados tolerantes não atingiram um valor de OD

0,3 no tempo determinado, entretanto, apresentaram crescimento na presença dos sais biliares, diferentemente dos microrganismos sensíveis, que tiveram o crescimento praticamente inibido (Apêndice C).

**Tabela 7** - Classificação dos isolados bacterianos de suínos quanto à tolerância aos sais biliares.

ISOLADO	CLASSIFICAÇÃO <sup>1</sup>	ISOLADO	CLASSIFICAÇÃO <sup>1</sup>
<i>W. paramesenteroides</i> 2BA	Tolerante	<i>W. paramesenteroides</i> 1ABH1	Tolerante
<i>W. paramesenteroides</i> 2BB	Tolerante	<i>L. plantarum</i> B/ pentosus/ <i>paraplantarum</i> 1ANG4	Tolerante
<i>W. paramesenteroides</i> 2BC	Tolerante	<i>L. acidophilus</i> 1ANH4	Resistente
<i>W. paramesenteroides</i> 2BD	Tolerante	<i>W. paramesenteroides</i> 1ANJ4	Tolerante
<i>W. paramesenteroides</i> 2BE	Tolerante	<i>W. paramesenteroides</i> 1ANK4	Resistente
<i>W. paramesenteroides</i> 2BF	Tolerante	<i>L. acidophilus</i> 1ANL4	Tolerante
<i>L. plantarum</i> A 2BBG	Tolerante	<i>L. plantarum</i> B/ pentosus/ <i>paraplantarum</i> 2ANR	Tolerante
<i>W. paramesenteroides</i> 2BBI	Sensível	<i>L. brevis</i> 2ANS	Resistente
<i>W. cibaria</i> 2BBL	Sensível	<i>L. brevis</i> 2ANW	Tolerante
<i>W. cibaria</i> 1BM	Resistente	<i>W. paramesenteroides</i> 2ANX	Tolerante
<i>W. cibaria</i> 1BN	Sensível	<i>L. reuteri</i> B 1AFZ	Tolerante
<i>L. plantarum</i> A 2CBG1	Resistente	<i>L. murinus</i> 1AFA1	Tolerante

<sup>1</sup> A classificação foi baseada na observação da absorbância após seis horas de incubação.

Durante a realização dos testes, observou-se a ocorrência de uma relação direta entre a quantidade de microrganismos presentes no inóculo inicial utilizado no experimento e a velocidade com que a cultura atinge a absorbância 0,3. Quanto maior o número de bactérias presentes inicialmente na cultura analisada, maior a absorbância alcançada em seis horas de incubação. Portanto, existe uma necessidade de padronização do inóculo, fato que não é notado em trabalhos (Jacobsen *et al.*, 1999; Ruiz-Moyano *et al.*, 2008; Mirlohi *et al.*, 2009) que aplicaram a metodologia proposta por Gilliland e colaboradores (1984). Deste modo, pode haver uma variação na interpretação dos resultados relativa à classificação dos isolados quanto a sua capacidade de sobreviver na presença de sais biliares.

Em virtude deste problema, neste estudo optou-se por uma metodologia alternativa, onde a interpretação das curvas de crescimento não é baseada na capacidade de uma linhagem atingir uma absorbância específica em determinado tempo e sim na área formada sob as curvas (idem 4.6.3 metodologia). Os resultados são apresentados na tabela 8.

**Tabela 8** - Porcentagem de inibição dos isolados bacterianos de suínos na presença de sais biliares.

ISOLADO	INIBIÇÃO (%) <sup>1</sup>	ISOLADO	INIBIÇÃO (%) <sup>1</sup>
<i>W. paramesenteroides</i> 2BA	68,27	<i>W. paramesenteroides</i> 1ABH1	64,74
<i>W. paramesenteroides</i> 2BB	71,81	<i>L. plantarum</i> B/ pentosus/ <i>paraplantarum</i> 1ANG4	45,96
<i>W. paramesenteroides</i> 2BC	63,31	<i>L. acidophilus</i> 1ANH4	29,37
<i>W. paramesenteroides</i> 2BD	65,42	<i>W. paramesenteroides</i> 1ANJ4	33,49
<i>W. paramesenteroides</i> 2BE	73,03	<i>W. paramesenteroides</i> 1ANK4	27,56
<i>W. paramesenteroides</i> 2BF	54,94	<i>L. acidophilus</i> 1ANL4	66,42
<i>L. plantarum</i> A 2BBG	57,12	<i>L. plantarum</i> B/ pentosus/ <i>paraplantarum</i> 2ANR	50,05
<i>W. paramesenteroides</i> 2BBI	93,00	<i>L. brevis</i> 2ANS	36,75
<i>W. cibaria</i> 2BBL	100	<i>L. brevis</i> 2ANW	47,80
<i>W. cibaria</i> 1BM	33,63	<i>W. paramesenteroides</i> 2ANX	77,27
<i>W. cibaria</i> 1BN	94,48	<i>L. reuteri</i> B 1AFZ	59,13
<i>L. plantarum</i> A 2CBG1	28,38	<i>L. murinus</i> 1AFA1	15,65

<sup>1</sup> O cálculo da porcentagem de inibição foi baseado na área sob a curva de crescimento na presença e ausência de oxgall 0,3%.

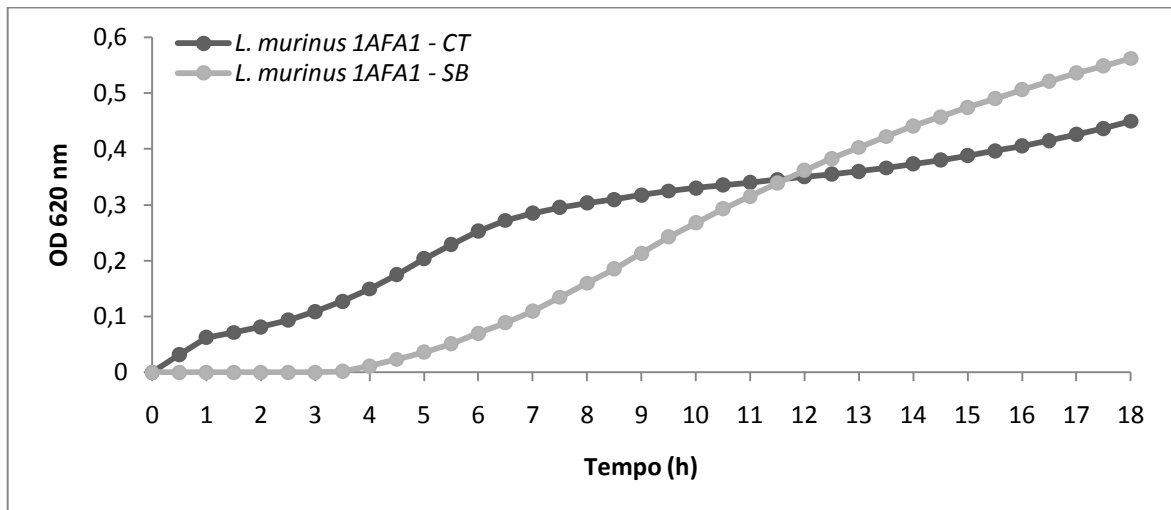
Observam-se quatro isolados (16,67%) com alta sensibilidade aos sais biliares (inibição  $\geq$  75%), treze (54,16%) sendo inibidos de forma moderada (entre 40 e 75%) e sete linhagens (29,17%) que praticamente não foram inibidas pelas condições analisadas (inibição  $\leq$  40%).

A análise das curvas de crescimento dos isolados (Apêndice C) demonstra que os dados expostos na tabela 8 refletem de maneira mais fidedigna os resultados obtidos do que a classificação apresentada na tabela 7. Como exemplo, observa-se o isolado *Lactobacillus murinus* 1AFA1 que não é classificado como resistente na tabela 7 (por não atingir OD<sub>620nm</sub> 0,3 em seis horas), entretanto, sua inibição calculada pela área sob a curva é de apenas 15% e ainda, em determinado momento, este isolado apresenta um crescimento superior na presença de oxgall em relação ao controle, revelando sua resistência aos sais biliares (figura 7).

Na literatura, vários trabalhos apontam que o atraso detectado na curva de crescimento de bactérias do ácido lático desafiados com oxgall é dependente da linhagem e não da espécie (Jacobsen et al, 1999; Mirlohi et al, 2000; Ruiz-Moyano et al., 2008; Mangoni, 2009). Esta afirmação pode ser notada nos dados disponíveis neste estudo, onde microrganismos da mesma espécie demonstram comportamento diferente frente ao desafio

com oxgall como, por exemplo, as espécies de *Weissella cibaria* que apresentaram linhagens sensíveis (2BBL e 1BN) e resistente (1BM) e *Weissella paramesenteroides* que demonstrou alta variabilidade entre suas linhagens.

Além disso, assim como constatado por Ruiz-Moyano e colaboradores (2008), as linhagens com melhor desempenho no teste de ácidos (item anterior) foram as que mostraram boa sobrevivência na presença de sais biliares.



**Figura 7** - Curva de crescimento do isolado *Lactobacillus murinus* 1AFA1.

Observar que apesar de não ser classificado como resistente na tabela 7 (por não atingir OD<sub>620nm</sub> 0,3 em seis horas), o isolado apresenta ótimo crescimento na presença de sais biliares, com inibição de apenas 15% quando calculada a área sob a curva.

CT: crescimento na ausência de oxgall 0,3%. SB: crescimento na presença de oxgall 0,3

### 5.3.3 Hidrofobicidade da parede celular

A hidrofobicidade da superfície bacteriana é uma característica apontada como um importante indicador do potencial de adesão do microrganismo ao epitélio intestinal (Bellon-Fontaine, Rault e Oss, 1996; Pelletier *et al.*, 1997). De acordo com Kos e colaboradores (2003) superfícies hidrofóbicas possuem maior capacidade de adesão quando comparadas a superfícies hidrofílicas.

Avaliar a capacidade de adesão das bactérias lácticas à parede intestinal constitui uma etapa fundamental no processo de seleção de cepas probióticas, uma vez que a fixação da bactéria à mucosa do intestino impede sua eliminação pelo peristaltismo e pelas correntes de fluidos (Turner, Dritz e Minton, 2001; Tahmourespour *et al.*, 2008).

Neste trabalho, avaliou-se a hidrofobicidade da superfície celular dos isolados pelo teste de Adesão Microbiana a Solventes (MATS), sendo utilizado o hidrocarboneto xileno como solvente (Pelletier *et al.*, 1997; Kos *et al.*, 2003). Os isolados foram classificados em

altamente hidrofóbicos (MATS  $\geq$  70%), moderadamente hidrofóbicos (70% < MATS  $\geq$  50%) ou pouco hidrofóbicos (MATS < 50%) (Nostro *et al.*, 2003; Tahmourespour *et al.*, 2008). Os resultados são apresentados na tabela 9.

**Tabela 9** - Teste de Adesão dos Microrganismos a solventes (MATS).

ISOLADO	MATS (%) <sup>1</sup>	ISOLADO	MATS (%) <sup>1</sup>
<i>W. paramesenteroides</i> 2BA	46.32	<i>W. paramesenteroides</i> 1ABH1	49.67
<i>W. paramesenteroides</i> 2BB	45.55	<i>L. plantarum</i> B/ pentosus/ <i>paraplantarum</i> 1ANG4	47.42
<i>W. paramesenteroides</i> 2BC	45.65	<i>L. acidophilus</i> 1ANH4	75.35
<i>W. paramesenteroides</i> 2BD	62.59	<i>W. paramesenteroides</i> 1ANJ4	51.82
<i>W. paramesenteroides</i> 2BE	47.35	<i>W. paramesenteroides</i> 1ANK4	72.93
<i>W. paramesenteroides</i> 2BF	45.65	<i>L. acidophilus</i> 1ANL4	85.41
<i>L. plantarum</i> A 2BBG	48.70	<i>L. plantarum</i> B/ pentosus/ <i>paraplantarum</i> 2ANR	45.98
<i>W. paramesenteroides</i> 2BBI	63.26	<i>L. brevis</i> 2ANS	72.65
<i>W. cibaria</i> 2BBL	43.01	<i>L. brevis</i> 2ANW	98.66
<i>W. cibaria</i> 1BM	43.59	<i>W. paramesenteroides</i> 2ANX	44.56
<i>W. cibaria</i> 1BN	57.93	<i>L. reuteri</i> B 1AFZ	54.49
<i>L. plantarum</i> A 2CBG1	44.65	<i>L. murinus</i> 1AFA1	71.28

<sup>1</sup> O valor de MATS foi calculado pela porcentagem de adesão dos isolados ao hidrocarboneto xileno.

Observou-se uma predominância de microrganismos pouco hidrofóbicos (54,17%), sendo que o isolado *Weissella cibaria* 2BBL foi o que demonstrou menor capacidade de ligação ao solvente (MATS = 43,01%). Isolados altamente e moderadamente hidrofóbicos corresponderam a 25% e 20,83%, respectivamente. O *Lactobacillus brevis* 2ANW teve a maior porcentagem de hidrofobicidade (MATS = 98,66%), seguido pelo *L. acidophilus* 1ANL4 (MATS = 85,41%).

Pelletier e colaboradores (1997), investigando a hidrofobicidade da superfície celular de oito linhagens de *Lactobacillus* de três diferentes espécies, relataram que a natureza hidrofílica destes microrganismos, independentemente da espécie, é frequentemente encontrada. Este fato é corroborado em parte por este trabalho, como pode ser notado pelas duas cepas de cada uma das espécies de *Lactobacillus plantarum* A e *Lactobacillus plantarum* B/pentosus/paraplantarum que apresentaram comportamento hidrofílico. Entretanto, duas diferentes espécies de lactobacilos isolados (*L. acidophilus*, *L. brevis*)

apresentaram comportamento hidrofóbico entre suas linhagens, contrastando com a afirmação dos autores (tabela 10).

#### 5.3.4 Atividade antagonista

A inibição do crescimento de bactérias patogênicas é uma das principais propriedades desejáveis para linhagens probióticas de bactérias do ácido láctico (Lin et al., 2007; Guo et al., 2010).

Na técnica de difusão em sobrecamada de ágar, utilizada neste trabalho para verificar a capacidade antagonista dos isolados, as culturas probióticas são separadas dos microrganismos indicadores por uma camada de ágar semi-sólido que impede o contato direto entre elas. Desta forma, é possível avaliar a produção de substâncias extracelulares e difusíveis, uma vez que o composto gerado deve difundir-se no ágar para exercer seu efeito sobre as bactérias patogênicas (González *et al.*, 1993 apud Pereira e Gómez, 2007).

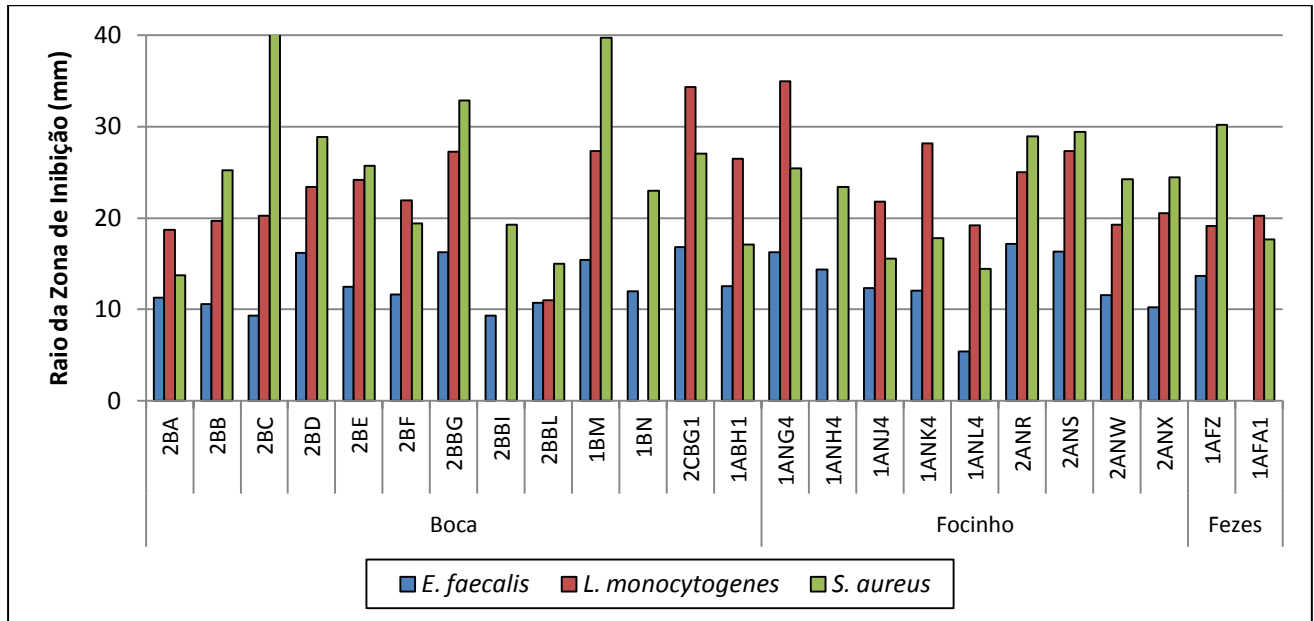
As figuras 8 e 9 apresentam os resultados referentes ao antagonismo dos vinte e quatro isolados frente às bactérias Gram positivo (*Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213) e Gram negativo (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853, *Escherichia coli* ATCC 25723 e *Salmonella enterica* ATCC 14028), respectivamente.

Todos isolados estudados apresentaram a formação de halos de inibição contra ao menos cinco dos seis patógenos analisados, sendo que dezoito (75%) mostraram capacidade antibacteriana contra todas as cepas indicadoras. Este resultado é semelhante ao encontrado em outros trabalhos (Martins *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2010) que demonstraram amplo espectro de inibição de *Lactobacillus* isolados de suínos contra bactérias de gêneros diferentes.

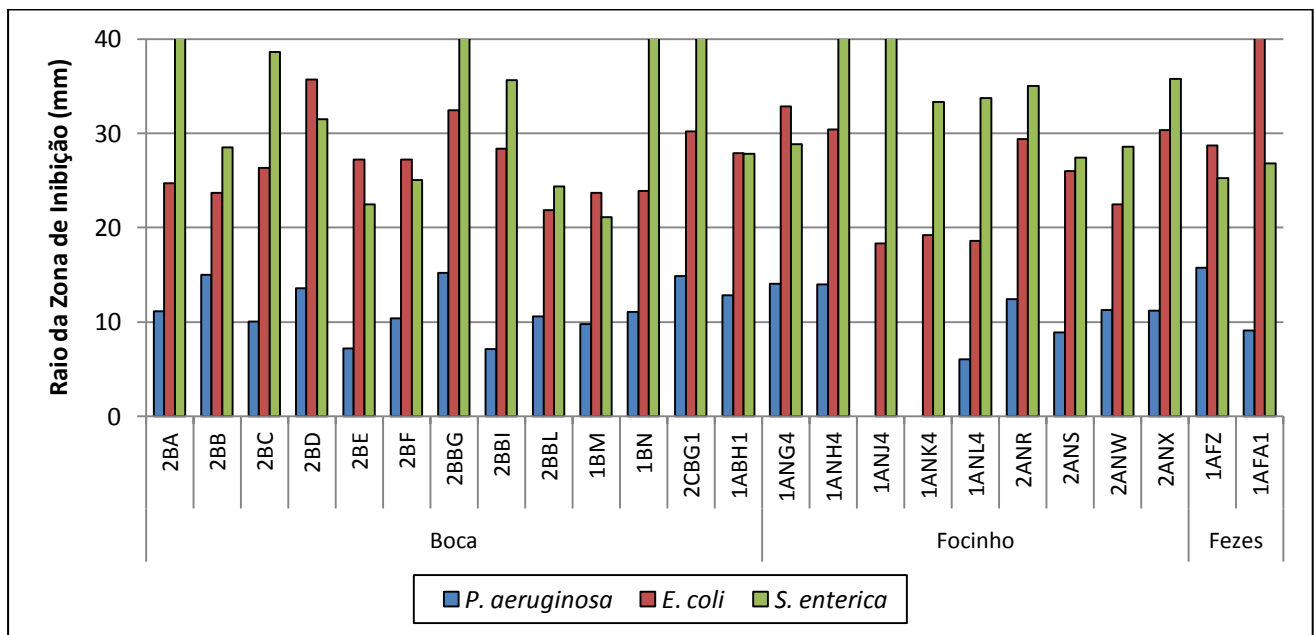
Frente às bactérias Gram positivo (figura 8), três isolados (*Weissella paramesenteroides* 2BBI, *Weissella cibaria* 1BN e *L. acidophilus* 1ANH4) foram incapazes de inibir o crescimento de *L. monocytogenes* e o isolado *L. murinus* 1AFA1 não demonstrou atividade antagonista contra *E. faecalis*, o qual apresentou os menores halos, assim como detectado no trabalho de Martins e colaboradores (2006). O indicador *S. aureus*, como visualizado em outros trabalhos, foi o patógeno mais inibido pelos isolados testados (Tsai *et al.*, 2001; De Angelis *et al.*, 2006; Bao *et al.*, 2010).

Já em relação aos patógenos Gram negativo (figura 9), a espécie menos sensível à atividade antagonista foi *P. aeruginosa* com o raio da zona de inibição variando de zero (*Weissella paramesenteroides* 1ANJ4 e 1ANK4) a 15,7mm (*Lactobacillus reuteri* B 1AFZ).

As reveladoras *E. coli* e *S. enterica*, apontadas como patógenos de maior impacto sobre a suinocultura moderna, foram fortemente inibidas, como já demonstrado em experimentos utilizando estes microrganismos indicadores (Tsai *et al.*, 2001; Martins *et al.*, 2006; Klose *et al.*, 2010).



**Figura 8** - Atividade antagonista dos isolados bacterianos de suínos contra patógenos Gram positivos. *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. ATCC: American Type Culture Collection



**Figura 9** - Atividade antagonista dos isolados bacterianos de suínos contra patógenos Gram negativos. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853, *Escherichia coli* ATCC 25723 e *Salmonella enterica* ATCC 14028. ATCC: American Type Culture Collection

## 5.4 CRITÉRIOS DE SELEÇÃO

Muitos aspectos devem ser considerados quando se pretende selecionar cepas com propriedades probióticas para o desenvolvimento de um produto comercial. Boas características funcionais e biotecnológicas são os principais critérios analisados nas linhagens com finalidade industrial (Saarela *et al.*, 2000; Turner, Dritz e Minton, 2001; Murarolli, 2008; Sumita, 2007; Oelschlaeger, 2010).

Estudos de caracterização *in vitro* têm sido amplamente empregados no processo de seleção preliminar de cepas probióticas, sendo relevantes para observação do comportamento específico de cada linhagem (Morelli, 2000; FAO/WHO, 2002; Mirlohi, 2009). Deste modo, os critérios utilizados neste trabalho para seleção de estirpes probióticas foram baseados na avaliação *in vitro* dos aspectos funcionais de isolados bacterianos de suínos, como a tolerância ao suco gástrico e aos sais biliares, o potencial de colonização do TGI e a inibição de bactérias potencialmente patogênicas para o hospedeiro.

Todas as cepas foram testadas, independente do seu desempenho nos ensaios paralelos, visando imparcialidade dos resultados, bem como, contribuir para o conhecimento comportamental de cada linhagem dentro das condições avaliadas. A síntese dos resultados obtidos é apresentada na tabela 10.

Os isolados *L. acidophilus* 1ANH4 e *Weissella paramesenteroides* 1ANK4 cumpriram plenamente os requisitos estabelecidos nos teste de caracterização de linhagens probióticas, apresentando resistência ao suco gástrico, tolerância aos sais biliares, alta hidrofobicidade da parede celular, além de um amplo antagonismo contra patógenos. Deste modo, estes isolados demonstram potencial para serem utilizados como suplementos alimentares para suínos, podendo ser administrados por via oral, uma vez que resistem às condições adversas do TGI.

A linhagem *L. plantarum* A 2CBG1 no teste de associação ao xileno obteve um valor abaixo da média necessária e, portanto, provavelmente não conseguiria se aderir às células intestinais. Entretanto, esta cepa demonstrou alta taxa de inibição a bactérias patogênicas, além de alta eficiência nos testes de resistências às condições necessárias à passagem pelo trânsito GI, o que revela uma promissora capacidade probiótica. Esta linhagem deve ser testada quanto à sua propriedade de estimular a resposta imune do hospedeiro, pois caso apresente uma resposta significativa, seria interessante sua utilização.

Tabela 10 - Síntese dos resultados de caracterização probiótica dos isolados de suínos.

Isolado	Local de Isolamento	Identificação	Inibição em Suco Gástrico	Inibição em Sais Biliares	MATS	Antagonismo
2BA	Boca	<i>Weissella paramesenteroides</i>	100%	68,27%	46.32%	+++++
2BB	Boca	<i>Weissella paramesenteroides</i>	100%	71,81%	45.55%	+++++
2BC	Boca	<i>Weissella paramesenteroides</i>	99,66%	63,31%	45.65%	+++++
2BD	Boca	<i>Weissella paramesenteroides</i>	99,41%	65,42%	62.59%	+++++
2BE	Boca	<i>Weissella paramesenteroides</i>	100%	73,03%	47.35%	+++++
2BF	Boca	<i>Weissella paramesenteroides</i>	100%	54,94%	45.65%	+++++
2BBG	Boca	<i>Lactobacillus plantarum A</i>	30%	57,12%	48.70%	+++++
2BBI	Boca	<i>Weissella paramesenteroides</i>	96,51%	93,00%	63.26%	+ - + + + +
2BBL	Boca	<i>Weissella cibaria</i>	27,89%	100%	43.01%	+++++
1BM	Boca	<i>Weissella cibaria</i>	56,80%	33,63%	43.59%	+++++
1BN	Boca	<i>Weissella cibaria</i>	92,88%	94,48%	57.93%	+ - + + + +
2CBG1	Boca	<i>Lactobacillus plantarum A</i>	0%	28,38%	44.65%	+++++
1ABH1	Boca	<i>Weissella paramesenteroides</i>	100%	64,74%	49.67%	+++++
1ANG4	Focinho	<i>Lactobacillus plantarum B/ pentosus/ paraplantarum</i>	100%	45,96%	47.42%	+++++
1ANH4	Focinho	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	7,49%	29,37%	75.35%	+ - + + + +
1ANJ4	Focinho	<i>Weissella paramesenteroides</i>	99,18%	33,49%	51.82%	+++ - ++
1ANK4	Focinho	<i>Weissella paramesenteroides</i>	0%	27,56%	72.93%	+++ - ++
1ANL4	Focinho	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	93,76%	66,42%	85.41%	+++++
2ANR	Focinho	<i>Lactobacillus plantarum B/ pentosus/ paraplantarum</i>	100%	50,05%	45.98%	+++++
2ANS	Focinho	<i>Lactobacillus brevis</i>	72,81%	36,75%	72.65%	+++++
2ANW	Focinho	<i>Lactobacillus brevis</i>	92,49%	47,80%	98.66%	+++++
2ANX	Focinho	<i>Weissella paramesenteroides</i>	100%	77,27%	44.56%	+++++
1AFZ	Fezes	<i>Lactobacillus reuteri B</i>	86,13%	59,13%	54.49%	+++++
1AFA1	Fezes	<i>Lactobacillus murinus</i>	100%	15,65%	71.28%	- + + + + +

Linagem será selecionada desde que apresente boas propriedades imunomodulatórias.

Linagens selecionadas que deverão ser microencapsuladas.

Linagens que cumpriram plenamente os requisitos.

Os isolados *L. acidophilus* 1ANL4, *L. brevis* 2ANS, *L. brevis* 2ANW, e *L. murinus* 1AFA1 mostraram boa capacidade de associação ao xileno e atividade antagonista considerável, entretanto, não responderam satisfatoriamente às condições adversas do trato gastrointestinal, principalmente ao suco gástrico. Estas cinco cepas podem ser utilizadas como probióticos para administração oral, desde que sejam encapsuladas em matrizes que permitam sua sobrevivência a estes fatores. A microencapsulação de probióticos em partículas de alginato de cálcio e em polímeros à base de caseína demonstrou ser capaz de assegurar a viabilidade das bactérias até seu estabelecimento no intestino (Ross, Gusils e Gonzalez 2008; Heidebach, Forst e Kulozik, 2010).

Finalmente, deve-se salientar que testes envolvendo a alimentação de animais experimentais com os microrganismos selecionados são necessários para confirmação dos estudos *in vitro*. Os métodos aqui descritos oferecem um estudo preliminar para seleção de cepas de BAL antes dos testes *in vivo*.

## 6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos neste estudo permitiram a identificação de vinte e quatro isolados dos gêneros *Lactobacillus* e *Weissella* de diferentes mucosas de suínos, sendo que destes, sete foram selecionadas como potenciais candidatos a probióticos.

O *L. acidophilus* 1ANH4 e a *Weissella paramesenteroides* 1ANK4 apresentaram todas as características funcionais desejáveis, cumprindo todos os requisitos estabelecidos no processo de seleção. Os isolados *L. acidophilus* 1ANL4, *L. brevis* 2ANS, *L. brevis* 2ANW, e *L. murinus* 1AFA1 podem ser utilizados como probióticos para administração oral em suínos, desde que sejam encapsulados, pois foi constatado que, provavelmente, não sobreviveriam durante o trânsito gastrointestinal. A linhagem *L. plantarum* A 2CBG1 não apresentou uma taxa considerável de associação ao xileno, mas respondeu satisfatoriamente em todos outros testes, portanto, será selecionada caso demonstre boa capacidade imunomodulatória em testes que serão realizados posteriormente.

Esta caracterização preliminar será reforçada por outros experimentos antes que as linhagens probióticas sejam efetivamente empregadas como produtos comerciais. As sete cepas selecionadas serão submetidas a outros testes *in vitro* como o ensaio de adesão a células Caco-2, perfil de resistência a antibióticos (antibiograma), capacidade de síntese de peróxido de hidrogênio e determinação das propriedades tecnológicas, além de testes *in vivo* em modelos animais para caracterização da resposta imune e avaliação do ganho de peso.

## REFERÊNCIAS

- ABIEPCS. Associação Brasileira da Indústria Produtiva e Exportadora de Carne Suína. **Estatística**. Disponível em: <[www.abiepcs.com.br](http://www.abiepcs.com.br)>. Acesso em: 09 de dez. de 2010.
- AGHEYISI, R. **The probiotics market: Ingredients, supplements, foods**: Report code FOD035B, BCC Research. Disponível em: <<http://www.bccresearch.com/report/FOD035B.html>>. Acesso em: 15 de dez. de 2010.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Alimentos**: alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home/alimentos?tax=Alimentos&cat=Alimentos+Com+Alegacoes+de+Propriedades+Funcionais+e+ou+de+Saude&siteArea=Alimentos&pageDesign=Alimentos\\_N2&WCM\\_GLOBAL\\_CONTEXT=/wps/wcm/connect/Anvisa/Anvisa/Inicio/Alimentos](http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home/alimentos?tax=Alimentos&cat=Alimentos+Com+Alegacoes+de+Propriedades+Funcionais+e+ou+de+Saude&siteArea=Alimentos&pageDesign=Alimentos_N2&WCM_GLOBAL_CONTEXT=/wps/wcm/connect/Anvisa/Anvisa/Inicio/Alimentos)>. Acesso em: 05 de jan. de 2011.
- BAO, Y. et al. Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products. **Food Control**, Amsterdam, v. 21, p. 695 - 701, 2010.
- BELLON-FONTAINE, M. N.; RAULT, J.; OSS, C. J. V. Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 7, p. 47 - 53, 1996.
- BERENDSEN, B. et al. Evidence of natural occurrence of the banned antibiotic chloramphenicol in herbs and grass. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, San Diego, v. 397, p. 1955 - 1963, 2010.
- BERGER, B. et al. Similarity and differences in the *Lactobacillus acidophilus* group identified by polyphasic analysis and comparative genomics. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 189, n. 4, p. 1311 - 21, 2007.
- BERNARDEAU, M. et al. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. **Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 126, p. 278 - 285, 2008.
- CARDOZO, E. C. **Utilização de probiótico (*Bacillus subtilis*) como aditivo alimentar em dietas de frangos**. 2006. 46 f. Dissertação (Mestrado em ciências veterinárias). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- CASTANON, J. I. R. History of the Use of Antibiotic as Growth Promoters in European Poultry Feeds. **Poultry Science**, Champaign, n. 86, p. 2466 - 2471, 2007.
- CASTRO, V. S. et al. Formulação de rações para leitões com base nos nutrientes digestíveis da silagem de grãos úmidos de milho. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 38, n. 10, p. 1914 - 1920, 2009.
- CHELO, I. M.; ZÉ-ZÉ, L.; TENREIRO, R. Genome diversity in the genera *Fructobacillus*, *Leuconostoc* and *Weissella* determined by physical and genetic mapping. **Microbiology**, Reading, v. 156, p. 420 - 430, 2010.
- CHIQUEIRI, J. et al. Bioquímica sanguínea e altura das vilosidades intestinais de suínos alimentados com adição de probiótico, prebiótico e antibiótico. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 8, n. 2, p. 97 - 104, 2007.

COLLINS, M. D. et al. Taxonomic studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. **Journal of Applied Bacteriology**, Washington, v. 75, p. 595 - 603, 1993.

COSTA, O. A. D.; LUDTKE, C. B.; ARAÚJO, A. P. Sistema de produção de suínos no Brasil e o bem-estar animal e a qualidade da carne: instalações e manejo. **Bienestar Animal**, Uruguai, p. 1 - 9, 2007.

COSTA, L. B.; TSE, M. L. P.; MIYADA, V. S. Extratos vegetais como alternativas aos antimicrobianos promotores de crescimento para leitões recém-desmamados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, n. 3, p. 589 - 595, 2007.

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

DE ANGELIS, M. et al. Selection of potential probiotic lactobacilli from pig feces to be used as additives in pelleted feeding. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 157, p. 792 - 801, 2006.

DE KEERSMAECKER, S. C. J. et al. Strong antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* GG against *Salmonella typhimurium* is due to accumulation of lactic acid. **FEMS Microbiology Letters**, Ames, v. 259, n. 1, p. 89 - 96, 2006.

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. **Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 40, p. 93 - 104, 1998.

EMBRAPA-CNPSA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa em Suínos e Aves. **Publicações**: sistema de Produção de Suínos. Disponível em: <<http://www.cnpsa.embrapa.br/SP/suinos/index.html>>. Acesso em: 07 de jan. de 2011.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. World Health Organization. **Organization Guidelines for Evaluation of Probiotics in Food**, London, Ontario, Canadá, p. 1 - 11. 2002.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. World Health Organization. **Animal Feed Impact on Food Safety**, Rome, p. 1 - 54, 2007.

FELIS, G. E.; DELLAGLIO, F. Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, Norfolk, v. 8, p. 44 - 61, 2007.

FLORESTA, F. A. **Análise de região codificadora de rRNA de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20: filogenia e presença de sequência de inserção putativa**. 2003. 54 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, 2003.

FUSCO, V. et al. Novel PCR-based identification of *Weissella confusa* using an AFLP-derived marker. **Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 1, p. 1 - 7, 2011.

GALLO, P. et al. Determination of the banned growth promoter moenomycin A in feed stuffs by liquid chromatography coupled to electrospray ion trap mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, Hoboken, v. 24, p. 1017 - 1024, 2010.

- GARCIA, G. R. et al. Inhibition of the growth of pathogenic bacteria by *Lactobacillus acidophilus*. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v. 101, p. 263 - 268, 2006.
- GHELER, T. R. et al. Uso de ácido benzóico na dieta de leitões. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.38, n. 11, p. 2182 - 2187, 2009.
- GILLILAND, S. E.; STALEY, T. E.; BUSH, L. J. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 67, n. 12, p. 3045 - 3051, 1984.
- GIRAFFA, G., CHANISHVILI, N., WIDYASTUTI, Y. Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 161, p. 480 - 487, 2010.
- GOLDIN, B. R. Probiotics and Health: From History to Future. In: KNEIFEL, W., SALMINEN, S. **Probiotics and Health Claims**. Ames: Wiley-Blackwell, 2011. 1 ed., p. 1 -16.
- GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos, e aplicações tecnológicas. **Boletim de Biotecnologia de Alimentos**, São Paulo, n. 64, p. 12 - 22, 1999.
- GUO, X-H et al. Screening lactic acid bacteria from swine origins for multistrain probiotics based on in vitro functional properties. **Anaerobe**, Amsterdam, v. 16, p. 321 - 326, 2010.
- HAMMES, W. P.; HERTEL, C. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: DWORKIN, M. et al. **The Prokaryotes**. New York: Springer, 2006. 3 ed, v. 1, p. 320 - 403.
- HEIDEBACH, T.; FÖRST, P.; KULOZIK, U. Influence of casein-based microencapsulation on freeze-drying and storage of probiotic cells. **Journal of Food Engineering**, Amsterdam, v. 98, p. 309 - 316, 2010.
- HOLZAPFEL, W. H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre- and probiotics. **Food Research International**, Amsterdam, v. 35, p. 109 - 116, 2002.
- JAMUNA, M.; BABUSHA, S.T.; JEEVARATNAM, K. Inhibitory efficacy of nisin and bacteriocins from *Lactobacillus* isolates against food spoilage and pathogenic organisms in model and food systems. **Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 22, p. 449 - 454, 2005.
- JACOBSEN, C. N. et al. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 11, p. 4949 - 4956, 1999.
- JANG, J. et al. Identification of *Weissella* species by the genus-specific amplified ribosomal DNA restriction analysis. **FEMS Microbiology Letters**, Ames, v. 212, p. 29 - 34, 2002.
- JIN, L.; MARQUARDT, R. R.; BAIDOO, S. K. Inhibition of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88, K99 and 987P by the *Lactobacillus* isolates from porcine intestine. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, n. 80, p. 619 - 624, 2000.
- JUNIOR, F. B. R.; TEIXEIRA, K. R. S.; REIS, V. M. Análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA) em estudos de diversidade intra-específica de *Azospirillum amazonense* isolado de diferentes espécies de *Brachiaria*. **Documentos: EMBRAPA Cerrados**, Planaltina, v. 117, p. 1 - 41, 2004.

- KAUR, I. P.; CHOPRA, K.; SAINI, A. Probiotics: potential pharmaceutical applications. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 15, p. 1 - 9, 2002.
- KLEIN, G. et al. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. **Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 41, p.103 - 125, 1998.
- KLOSE, V. et al. In vitro antagonistic activities of animal intestinal strains against swine-associated pathogens. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 144, p. 515 – 521, 2010.
- KOMATSU, T. R.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 44, n. 3, p. 329 - 347, 2008.
- KOS, B. et al. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. **Journal of Applied Microbiology**, Ames, v. 94, p. 981 - 987, 2003.
- LEE, C. M. et al. Estimation of 16S rRNA gene copy number in several probiotic *Lactobacillus* strains isolated from the gastrointestinal tract of chicken. **FEMS Microbiology Letters**, Ames, v. 287, p. 136 - 141, 2008.
- LEE. Y. Characterization of *Weissella kimchii* PL9023 as a potential probiotic for women. **FEMS Microbiology Letters**, Ames v. 250, n. 1, p.157 - 162, 2005.
- LEBEER, S.; VANDERLEYDEN, J.; DE KEERSMAECKER, S. C. J. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 72, n. 4, p. 728 - 764, 2008.
- LEBEER S.; VANDERLEYDEN J.; DE KEERSMAECKER S. C. J. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 171 - 184, 2010.
- LILLY, D. M., STILLWELL, R. H. Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. **Science**, Washington, v. 147, n. 3659, p. 747 - 748, 1965.
- LIN, W-H. et al. Antimicrobial susceptibility different probiotic properties for *Lactobacillus fermentum* strains isolated from swine and poultry. **Anaerobe**, Amsterdam, v. 13, p. 107 - 113, 2007.
- LODDI, M.M. Probióticos e prebióticos na nutrição de aves. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, Brasília, n. 23, p. 1 - 8, 2001.
- MAGALHÃES, J. T.; FLORESTA, F.; MORAES, C. A. Partial characterization of ribosomal operons of *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 36, p. 177 - 183, 2005.
- MANGONI, J. **Potencial probiótico de lactobacilos de origem suína**. 2009. 46 f. Dissertação (Mestre em Zootecnia). Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondo, 2009.
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Legislação**: sislegis. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=abreLegislacaoFederal&chave=50674&tipoLegis=A>>. Acesso em: 20 de jan. de 2011.

- MARTINS, A. D. O. et al. Resistência de bactérias lácticas, isoladas de fezes de suínos e sua capacidade antagônica frente a microrganismos indicadores. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v.5, n.1, p. 53 - 59, 2006.
- MENIN, A. et al. Agentes bacterianos enteropatogênicos em suínos de diferentes faixas etárias e perfil de resistência a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 6, p.1687 - 1693, 2008.
- MERRITT, M. E.; DONALDSON, J. R. Effect of bile salts on the DNA and membrane integrity of enteric bacteria. **Journal of Medical Microbiology**, Reading, v. 58, p. 1533 - 1541, 2009.
- MIRLOHI, M. et al. Investigation of acid and bile tolerance of native lactobacilli isolated from fecal samples and commercial probiotics by growth and survival studies. **Iranian Journal of Biotechnology**, Tehran, v. 7, n. 4, p. 233 - 240, 2009.
- MOREIRA, J. L. S. et al. Identification to the species level of *Lactobacillus* isolated in probiotic prospecting studies of human, animal or food origin by 16S-23S rRNA restriction profiling. **BMC Microbiology**, v. 5, n. 15, p. 1-9, 2005.
- MORELLI, L. In vitro selection of probiotic lactobacilli: a critical appraisal. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, Norfolk, v. 1, n. 2, p. 59 - 67, 2000.
- MOTA, R. M. et al. Genetic transformation of novel isolates of chicken *Lactobacillus* bearing probiotic features for expression of heterologous proteins: a tool to develop live oral vaccines. **BMC Biotechnology**, v. 6, 2006.
- MURAROLLI, V. D. A. **Efeito de prebiótico, probiótico e simbiótico sobre o desempenho, morfologia intestinal e imunidade de frangos de corte**. 2008. 101 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Produção Animal). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.
- NAM, H. et al. Effect of *Weissella confusa* strain PL9001 on the adherence and growth of *Helicobacter pylori*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 9, p. 4642 - 4645, 2002.
- NEUMANN, E. **Comportamento “in vitro” de estirpes de *Lactobacillus acidophilus* sensível e resistente à bacteriocina sob condições do trato digestivo**. 1991. 86 f. Dissertação (mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1991.
- NOSTRO, A. et al. Modifications of hydrophobicity, in vitro adherence and cellular aggregation of *Streptococcus mutans* by *Helichrysum italicum* extract. **Letters in Applied Microbiology**, Ames, v. 38, p. 423 - 427, 2004.
- NOUR, M. 16S-23S and 23S-5S intergenic spacer regions of lactobacilli: nucleotide sequence, secondary structure and comparative analysis. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 149, p. 433 - 448, 1998.
- OECD-FAO. Organization for Economic Co-Operation and Development. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **OECD-FAO Agricultural Outlook 2009-2018**. p. 1 - 274, 2009.
- OELSCHLAEGER, T. A. Mechanisms of probiotic actions – a review. **International Journal of Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 300, p. 57 - 62, 2010.

- OLIVEIRA, M. N. et al. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 38, n. 1, p. 1 - 21, 2002.
- OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G.; RIBEIRO, C. M.; GOMES, M. I. F. V. Potencial bioterapêutico dos probióticos nas parasitoses intestinais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 9, p. 2670 - 2679, 2008.
- 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**. 2005. 154 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- PELLETIER, C. et al. Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 5, p. 1725 - 1731, 1997.
- PEREIRA, V. G; GÓMEZ, R. J. H. C. Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus acidophilus*, contra microrganismos patogênicos veiculados por alimentos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 2, p. 229 - 240, 2007.
- PRIDMORE, R. D. et al. Hydrogen peroxide production by *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 and its role in anti-*Salmonella* activity. **FEMS Microbiology Letters**, Ames, v. 283, n. 2, p. 210 - 215, 2008.
- REYSENBACH, A. L.; LONGNECKER, K.; KIRSCHTEIN, J. Novel bacterial and archaeal lineages from an in situ growth chamber deployed at a mid-atlantic ridge hydrothermal vent. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 9, p. 3798 - 3806, 2000.
- RIPAMONTI, B. et al. Screening and selection of lactic acid bacteria from calves for designing a species-specific probiotic supplement. **Italian Journal of Animal Science**, Alghero, v. 6, p. 350 - 352, 2007.
- RIVERA-ESPINOZA, Y.; GALLARDO-NAVARRO, Y. Non-dairy probiotic products. **Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 27, p. 1 - 11, 2010.
- ROJAS, M.; ASCENCIO, F.; CONWAY, P. L. Purification and characterization of a surface protein from *Lactobacillus fermentum* 104R that binds to porcine small intestinal mucus and gastric mucin. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 5, p. 2330 - 2336, 2002.
- ROSS, G. R.; GUSILS, C.; GONZALEZ, S. N. Microencapsulation of probiotic strains for swine feeding. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 31, n. 11, p. 2121 - 2125, 2008.
- ROSS, R.P. et al. Specific metabolite production by gut microbiota as a basis for probiotic function. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 20, p. 269 - 276, 2010.
- RUIZ-MOYANO, S. et al. Screening of lactic acid bacteria and bifidobacteria for potential probiotic use in Iberian dry fermented sausages. **Meat Science**, Champaign, v. 80, p. 715 - 721, 2008.
- SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, n. 1, p. 1 - 16, 2006.

- SAARELA, M. et al. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 84, p. 197 - 215, 2000.
- SALMINEN, S. et al. Demonstration of safety of probiotics - a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 44, p. 93 - 106, 1998.
- SALMINEN, S.; OUWEHAND, A. C.; ISOLAURI, E. Clinical Applications of Probiotic Bacteria. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 8, p. 563 - 572, 1998.
- SANTOS, M. S. et al. Influência do fornecimento de probiótico à base de *Lactobacillus* sp. sobre a microbiota intestinal de leitões. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 6, p. 1395 - 1400, 2003.
- SILVA, C. A. et al. Uso de probiótico e de antibióticos na alimentação de leitões em fase de creche. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 4, p. 739 - 746, 2007.
- SIRIRAT, R., THOSAPORN, R., SOMKIAT, P. Evaluations of lactic acid bacteria as probiotics for juvenile seabass *Lates calcarifer*. **Acquaculture Research**, Ames, v. 39, p. 134 - 143, 2008.
- SHI, H. N.; WALKER, A. Bacterial colonization and the development of intestinal defences. **Canadian Journal of Gastroenterology**, Oakville, v. 18, n. 8, p. 493 - 500, 2004.
- SOTO, F. R. M. et al. Implantação da homeopatia e avaliação dos índices de produtividade de uma granja comercial de suínos comparado com a alopatia na fase de recria e terminação. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v. 14, n. 1, p. 107 - 114, 2007.
- SPENCER, R. J.; CHESSON, A. The effect of *Lactobacillus* spp. on the attachment of enterotoxigenic *Escherichia coli* to isolated porcine enterocytes. **Journal of Applied Bacteriology**, Bucksburn, n. 7, p. 215 - 220, 1994.
- STANTON, C. et al. Market potential for probiotics, **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 73, n. 2, p. 476 - 483, 2001.
- SUMITA, T. C. **Caracterização de cepas de *Lactobacillus* isolados de fezes humanas quanto às propriedades probióticas**. 2007. 91 f. Dissertação (Mestre em Biotecnologia Industrial). Escola de Engenharia de Lorena, Lorena, 2007.
- TAHMOURESPOUR, A. et al. The Relationship between Cell Surface Hydrophobicity and Antibiotic Resistance of Streptococcal Strains Isolated from Dental Plaque and Caries. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, Mashhad, v. 10, n. 4, p. 251 - 255, 2008.
- TANNOCK, G. W. et al. Identification of *Lactobacillus* isolates from the gastrointestinal tract, silage, and yoghurt by 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region sequence comparisons. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 9, p. 4264 - 4267, 1999.
- TILSALA-TIMISJÄRVI A.; ALATOSSAVA T. Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. **Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 35, n. 1, p. 49 - 56, 1997.
- TODOROV, S. D. Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* - production, genetic organization and mode of action. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 40, p. 209 - 221, 2009.

TODOROV, S. D.; DICKS, L. M. T. Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* st712bz isolated from boza. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, p. 166 - 172, 2007.

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

TUOHY, K. M. et al. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. **Drug Discovery Today**, Londres, v. 8, n. 15, p. 692 - 700, 2003.

TURNER, J. L.; DRITZ, P. S. S.; MINTON, J. E. Review: Alternatives to conventional antimicrobials in swine Diets. **The Professional Animal Scientist**, n. 17, p. 217 - 226, 2001.

VALERIO, F. et al. Antifungal activity of strains of lactic acid bacteria isolated from a semolina ecosystem against *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus niger*, and *Endomyces fibuliger* contaminating bakery products. **Systematic and Applied Microbiology**, Amsterdam, v. 32, p. 438 - 448, 2009.

VALLOR, A. C. et al. Factors associated with acquisition of, or persistent colonization by, vaginal lactobacilli: role of hydrogen peroxide production. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 184, n. 11, p. 1431 – 1436, 2001.

VANNUCCI, F. A.; GUEDES, M. R. C. Fisiopatologia das diarreias em suínos, **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 7, p.2233 - 2242, 2009.

VIEGAS, R. P. **Leites fermentados probióticos produzidos a partir de bactérias ácido-lácticas e adicionados de concentrado protéico de soro lácteo: características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais**. 2008. 70 f. Dissertação (Mestrado em ciência animal). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

WALKER D. K.; GILLILAND S. E. Relationships Among Bile Tolerance, Bile Salt Deconjugation, and Assimilation of Cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, n. 4, p. 956 - 961, 1993.

ZARDO, A. O.; LIMA, G. J. M. M. Alimentos para suínos. **BIPERS**, Concórdia, v. 8, n. 12, p. 1 - 61, 1999.

## ANEXOS

Anexo 1 – Perfis de restrição esperado para a determinação das espécies de lactobacilos.

<i>SphI</i>	<i>NcoI</i>	<i>NheI</i>	<i>SspI</i>	<i>SfuI</i>	<i>EcoRV</i>	<i>DraI</i>	<i>Vsp I</i>	<i>HincII</i>	<i>EcoRI</i>	<i>HindIII</i>	<i>AvrII</i>	IDENTIFICAÇÃO
---	+++	---	---	+	---	---	---	---	+++	+++	+++	<i>L. acidophilus</i>
+++	---	+++	+++	---	---	---	+++	---	---	---	---	<i>L. agilis</i>
+++	---	---	---	---	---	+++	+++	+	---	+++	---	<i>L. alimentarius</i>
+++	---	---	---	---	---	+++	+++	+-	---	+++	---	<i>L. animalis</i>
+++	---	---	---	---	---	---	+++	---	---	+++	---	<i>L. brevis</i>
+++	---	---	---	+	+++	+++	---	---	---	+++	---	<i>L. camelliae</i>
---	---	---	---	---	+++	+++	+++	---	---	+++	---	<i>L. casei</i>
+++	+++	---	+++	---	---	---	+++	---	---	---	---	<i>L. coleohominis</i>
---	+++	---	---	+	+++	---	---	---	+++	+++	+++	<i>L. crispatus</i>
---	+++	---	---	+++	---	---	---	---	---	---	---	<i>L. delbrueckii</i>
+++	+	---	---	---	---	+++	+++	+	---	+++	---	<i>L. farciminis</i>
+++	---	---	+++	---	---	---	+++	+++	---	+++	---	<i>L. ferintoshensis</i>
+++	---	+	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	<i>L. fermentum</i>
+++	---	---	+++	---	---	+++	+++	+	---	+++	---	<i>L. fructivorans</i>
+++	+++	---	---	---	---	---	+++	+	---	---	---	<i>L. frumenti</i>
---	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	+	+++	<i>L. gasseri</i>
+++	---	---	+++	---	---	---	+++	+++	---	+++	---	<i>L. hilgardii A</i>
+++	---	---	+++	---	---	---	+++	---	---	+++	---	<i>L. hilgardii B</i>
---	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	---	---	<i>L. jensenii</i>
---	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	+	---	<i>L. johnsonii</i>
+++	---	---	+++	---	---	---	+++	---	---	---	---	<i>L. mucosae</i>
---	---	---	---	---	---	+++	---	+	---	+++	---	<i>L. murinus</i>
+++	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	<i>L. nagelli</i>
+++	+++	---	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	<i>L. panis</i>
+++	+	+++	---	+++	+++	+++	---	---	+++	---	---	<i>L. pantheris</i>
+++	---	---	---	---	---	+++	+++	+	---	+++	---	<i>L. paralimentarius</i>
+++	---	---	+++	---	---	---	+++	+++	---	---	---	<i>L. paraplantarum</i>
+++	---	---	+++	---	---	---	+++	+++	---	---	---	<i>L. pentosus</i>
---	---	---	---	---	+++	---	---	+	---	---	+++	<i>L. perolens</i>
+++	---	---	+++	+	---	---	+++	+++	---	---	---	<i>L. plantarum A</i>
+++	---	---	+++	---	---	---	+++	+++	---	---	---	<i>L. plantarum B</i>
+++	+++	---	---	---	---	---	+++	+	---	---	---	<i>L. reuteri A</i>
+++	+++	---	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	<i>L. reuteri B</i>
---	---	---	---	---	+++	+++	---	+	---	---	+++	<i>L. rhamnosus</i>
---	---	---	+++	+++	---	+++	---	+	---	---	---	<i>L. ruminis</i>
---	---	---	---	---	---	+++	---	---	---	+++	---	<i>L. sakei</i>
---	---	---	+++	---	---	+++	---	---	---	---	---	<i>L. salivarius</i>
+++	---	+++	---	---	---	+++	+++	---	---	+++	---	<i>L. sanfranciscensis</i>
+++	+++	---	---	---	---	---	+++	+	---	---	---	<i>L. vaginalis A</i>
+++	+++	---	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	<i>L. vaginalis B</i>

(+) digestões positivas da região ITS 1 do gene 16S-23S do rRNA para os espaçadores maiores, intermediários e menores encontrados em *Lactobacillus*.



```

Query 599 CTGAAGTGAAAGCCCTCAGCTCAACTGAGGAATGGCTTTGGAACTGGATGACTTGAGTG 658
          |||
Sbjct 615 CTGAAGTGAAAGCCCTCAGCTCAACTGAGGAATGGCTTTGGAACTGGATGACTTGAGTG 674

Query 659 CAGTAGAGGAAAAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAT-TATGGAAGAAC 717
          |||
Sbjct 675 CAGTAGAGGAAA-GTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAAC 733

Query 718 ACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTCTGGACTGTTACTGACGTTGAGGCTCGAAAGTGTGGGTA 777
          |||
Sbjct 734 ACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTCTGGACTGTTACTGACGTTGAGGCTCGAAAGTGTGGGTA 793

Query 778 GCAAACAGGCATTAGATACCTGGGTGTCCACACCGTTAACGAT 822
          |||
Sbjct 794 GCAAACAGG-ATTAGATACCTGG-TAGTCCACACCGTAAACGAT 836
    
```

>G04 (amostra 2BA Reverse) Placa152\_Seq\_020211\_NAGE\_LGMP Run01 Cimarron 3.12 831  
 CATCTGTCCACTTAGACGGCTGGCTCTAAAAGGTTACCCACCGGCTTTGGGTGTTACAACTCTCATGGTGTGACGGGCGGT  
 GTGTACAAGACCCGGGAACGTATTACCCGCGGCTGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGTAGCGGAGTTGCA  
 GCCTACAATCCGAAGTGAACATATACTTTAAGAGATTAGCGCACCCCTCGCGGGTTGGCGACTCGTTGTATATGCCATTGTAGCA  
 CGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCACTAG  
 AGTGCCCAACTNAATGCTGGCAACTAATAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGA  
 CGACAACCATGCACCACCTGTCACCTTGTCCCCGAAGGGAACGTCTATTTCTAGGATTAGCAAGGGATGTCAAGACCTGGTA  
 AGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGTCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTG  
 CGGTGCTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCGACACTCAAGGGCGGAAACCTCGAACATCTAGCACTCATCG  
 TTTACGGTGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTACCACACTTTCGAAGCCTCAACGTCAGTTTACAGTCCAGAAAG  
 CCGGCCTTCGCCACTTGGGTGTCTTCCATATTTTCTACGGCATTTCACGGTTACACCATGGGAGTTCACCTTTCTCTATG  
 GCAC

gb|FJ405229.1| **Weissella paramesenteroides** strain ZJ9 16S ribosomal RNA gene,  
 partial sequence  
 Length=1532  
 Score = 1415 bits (766), Expect = 0.0  
 Identities = 813/833 (98%), Gaps = 16/833 (1%)  
 Strand=Plus/Minus

```

Query 1 CATCTGT-CCA-CTTAGACGGCTGGCT-CTAAAAGGTTACCCACCGGCTTTGGGTGTTA 57
          |||
Sbjct 1499 CATCTGTCCACCTTAGACGGCTGGCTCTAAAAGGTTACCCACCGGCTTTGGGTGTTA 1440

Query 58 CAAACTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCACCGCGGCG 117
          |||
Sbjct 1439 CAAACTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCACCGCGGCG 1380

Query 118 TGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCC 177
          |||
Sbjct 1379 TGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCC 1320

Query 178 GAACTGAGACATACTTTAAGAGATTAGCGCACCCCTCGCGGGTTGGCGACTCGTTGTATAT 237
          |||
Sbjct 1319 GAACTGAGACATACTTTAAGAGATTAGCGCACCCCTCGCGGGTTGGCGACTCGTTGTATAT 1260

Query 238 GCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCC 297
          |||
Sbjct 1259 GCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCC 1200

Query 298 ACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCACTAGAGTGCCCAACTNAATGCTGGCAACT 357
          |||
Sbjct 1199 ACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCACTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACT 1140

Query 358 AATAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACG 417
          |||
Sbjct 1139 AATAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACG 1080

Query 418 ACAACCATGCACCACCTGTCACCTTGTCCCCGAAGGGAACGTCTATTTCTAGGATTAGC 477
          |||
Sbjct 1079 ACAACCATGCACCACCTGTCACCTTGTCCCCGAAGGGAACGTCTATTTCTAGGATTAGC 1020
    
```

```

Query 478 AAGGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCA 537
          |||
Sbjct 1019 AAGGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCA 960

Query 538 CCGCTTGTGCGGGTCCCCGTC AATTCC TTTGAGTTTCAACCTTGCGGTCG TACTCCCCAG 597
          |||
Sbjct 959 CCGCTTGTGCGGGTCCCCGTC AATTCC TTTGAGTTTCAACCTTGCGGTCG TACTCCCCAG 900

Query 598 GCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCGACACTCAAGGGCGGAAACCCTCGAACATCTAGCA 657
          |||
Sbjct 899 GCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCGACACTCAAGGGCGGAAACCCTCGAACATCTAGCA 840

Query 658 CTCATCGTTTACGGTGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTACC-ACACTTTCG 716
          |||
Sbjct 839 CTCATCGTTTACGGTGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTACCACACTTTCG 780

Query 717 AAGCCTCAACGTCAGTTTACAGTCCAGAAAGCCGCGCTTCGCCACTTGGGTGT-CTTCCA 775
          | |||
Sbjct 779 A-GCCTCAACGTCAGTT-ACAGTCCAGAAAGCCG-CCTTCGCCACT-GG-TGTTCTTCCA 725

Query 776 TATTTTCTACGGCATTTC AACGGTTACACCATGGGAGTTCCACTTTTCCTCTA 828
          |||
Sbjct 724 TATAT-CTACG-CATTTACCCGCT-ACAC-ATGG-AGTTCACACTT-CTCTA 678

```

>D06 (amostra 2BBL Forward) Placa152\_Seq\_020211\_NAGE\_LGMPP Run01 Cimarron 3.12 805  
CGCTGGCGGCGTGCTAATACCTGCAGTNGAACGCTTTGTGGTTCAACTGATTTGAAGAGCTTGCTCAGATATGACGATGGACA  
TTGCAAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTTGGGAACTACCTCTTAGCAGGGGATAACATTTGAAACAGATGCTAATA  
CCGTATAACAATAGCAACCGCATGGTTGCTACTTAAAAGATGGTTCTGCTATCACTAAGAGATGGTCCCGCGTGCATTAGTT  
AGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGACGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGACTGAGACACGG  
CCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCTGTGTGATGAA  
GGGTTTTCGCTCGTAAAACACTGTTGTAAGAGAAGAATGACATTGAGAGTAACTGTTCAATGTGTGACGGTATCTTACCAGAA  
AGGAACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTTCCAAGCCTTATCCGGATTTATTCCGGGCTAAAAGCGAGC  
GCAGACGGTTATTTAAGTCTGAAGTGAAGCCCTCAGCTCAACTGAGGAATGCTTTGAAACTGGATGACTTGAGTGCAGTA  
GAGGAACAGTGGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCACCAAGTGGCGAAGGCGGGCTTTTC  
TGGGACTTGGTACTGACGTTTGAAGGCTCGGAAAAGTGTGGGTTAGCCAAAACCGGACTTTTC

dbj|AB593356.1| **Weissella cibaria** gene for 16S rRNA, strain: 4712  
Length=908  
Score = 1341 bits (726), Expect = 0.0  
Identities = 772/791 (98%), Gaps = 17/791 (2%)  
Strand=Plus/Plus

```

Query 1 CGCTGGCGGCGTGCTAATACCTGC-AGTNGAACGCTTTGTGGTTCAACTGATTTGAAGAG 59
          |||
Sbjct 30 CGCTGGCGGCGTGCTAATACATGCAAGTCAAGCCTTTGTGGTTCAACTGATTTGAAGAG 89

Query 60 CTTGCTCAGATATGACGATGGACATTGCAAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGG 119
          |||
Sbjct 90 CTTGCTCAGATATGACGATGGACATTGCAAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGG 149

Query 120 AAACCTACCTCTTAGCAGGGGATAACATTTGAAACAGATGCTAATACCGTATAACAATA 179
          |||
Sbjct 150 AAACCTACCTCTTAGCAGGGGATAACATTTGAAACAGATGCTAATACCGTATAACAATA 209

Query 180 GCAACCGCATGGTTGCTACTTAAAAGATGGTTCTGCTATCACTAAGAGATGGTCCCGCGG 239
          |||
Sbjct 210 GCAACCGCATGGTTGCTACTTAAAAGATGGTTCTGCTATCACTAAGAGATGGTCCCGCGG 269

Query 240 TGCATTAGTTAGTTGGTGTAGGTAATGGCTCACCAAGACGATGATGCATAGCCGAGTTGAG 299
          |||
Sbjct 270 TGCATTAGTTAGTTGGTGTAGGTAATGGCTCACCAAGACGATGATGCATAGCCGAGTTGAG 329

Query 300 AGACTGATCGGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA 359
          |||
Sbjct 330 AGACTGATCGGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA 389

```

```

Query 360  GGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTGTGATGAAGGGT 419
          |||
Sbjct 390  GGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTGTGATGAAGGGT 449

Query 420  TTCGGCTCGTAAAACACTGTTGTAAGAGAAGAATGACATTGAGAGTAACGTGTTCAATGTG 479
          |||
Sbjct 450  TTCGGCTCGTAAAACACTGTTGTAAGAGAAGAATGACATTGAGAGTAACGTGTTCAATGTG 509

Query 480  TGACGGTATCTTACCAGAAAGGAACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA 539
          |||
Sbjct 510  TGACGGTATCTTACCAGAAAGGAACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA 569

Query 540  TGTTCCAAGCGTTATCCGATTTATTTCGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTATTTAAGT 599
          |||
Sbjct 570  TGTTCCAAGCGTTATCCGATTTATTTCGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTATTTAAGT 628

Query 600  CTGAAGTGAAAGCCCTCAGCTCAACTGAGGAATTGCTTTGGAAACTGGATGACTTGAGTG 659
          |||
Sbjct 629  CTGAAGTGAAAGCCCTCAGCTCAACTGAGGAATTGCTTTGGAAACTGGATGACTTGAGTG 688

Query 660  CAGTAGAGGAACAGTGGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAAATGCGTAGATATATGGAAGA 719
          |||
Sbjct 689  CAGTAGAGGAA-AGTGG-AACTCCATGTGTAGCGGTGAAA-TGCGTAGATATATGGAAGA 745

Query 720  ACCACCAAGTGGCGAAGGCGGCTTTTCTGGGACTTGGTA-CTGACGTTTGAAGGCTCGG 778
          ||
Sbjct 746  AC-ACCA-GTGGCGAAGGCGG-CTTT-CTGG-ACT-G-TAACTGACGTT-GA-GGCTCG- 795

Query 779  AAAAGTGTGGG 789
          |||
Sbjct 796  AAA-GTGTGGG 805

```

```

>F10 (amostra 2BBL Reverse) Placa152_Seq_020211_NAGE_LGMP Run01 Cimarron 3.12 845
TCTGTCCACCTTAGACGGCTGGCTCCGAAGGTTACCCACCGGCTTTGGGTGTTACAAACTTCATGGTGTGACGGGCGGTGT
GTACAAGACCCGGGAACGTATTACCGCGGCGTGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGTAGGCGAGTTGCAGC
CTACAATCCGAACTGAGACGTACTTTAAGAGATTAGCTCACCCCTCGCGGGTTGGCAACTCGTTGTATACGCCATTGTAGCAGC
TGTGTAGCCAGGTATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCACCTTCCCTCCGGTTTTGTACCGGCAGTCTCACTAGA
GTGCCAACTAAATGCTGGCAACTAGTAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACTCTCACGACACGAGCTGAC
GACAACCTATGCACCACTGTCACTTGTCCCGAAGGGAACGCTCCATCTCTGGAGTTGTCAAGGGATGTCAAGACCTGGTAA
GGTTCTTCGGTTGCTTCGAATTAACCACATGACTCCACCGCTTGTGCGGGTCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTG
CGGTCGTACTCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCGGCACCTAAGGGCGGAAACCCCTCAAACACCTAGCACTCATCG
TTTTACGGTGTGGACTACCAAGGGTATCTAATCCTGTTTGTACCCACACTTTCGAGCCTCAACGTGAGTTACAGTCCAGAAG
CCGCTTCCGACTGGTGTCTTCTTCTATTTCTACGCATTTACCGGTACCATGGAGTTCCCTTTCTTAAATGGCTCAAGTCNTC
CCAGTTTCAAAGGCAATCCCT

```

gb|GU138616.1| **Weissella cibaria** IMAU:10288 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length=1483  
Score = 1456 bits (788), Expect = 0.0  
Identities = 840/862 (98%), Gaps = 17/862 (1%)  
Strand=Plus/Minus

```

Query 1      TCTGT-CCACCTTAGACGGCTGGCT-CCGAAGGTTACCCACCGGCTTTGGGTGTTACAA 58
          |||
Sbjct 1483    TCTGTCCACCTTAGACGGCTGGCTCCGAAGGTTACCCACCGGCTTTGGGTGTTACAA 1424

Query 59     ACTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTACCGCGGCGTGC 118
          |||
Sbjct 1423    ACTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTACCGCGGCGTGC 1364

Query 119    TGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAA 178
          |||
Sbjct 1363    TGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAA 1304

```

```

Query 179 CTGAGACGTACTTTAAGAGATTAGCTCACCCCTCGCGGGTTGGCAACTCGTTGTATACGCC 238
          |||
Sbjct 1303 CTGAGACGTACTTTAAGAGATTAGCTCACCCCTCGCGGGTTGGCAACTCGTTGTATACGCC 1244

Query 239 ATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACC 298
          |||
Sbjct 1243 ATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACC 1184

Query 299 TTCCTCCGGTTTTGTACCCGGCAGTCTCACTAGAGTGCCCAACTAAATGCTGGCAACTAG 358
          |||
Sbjct 1183 TTCCTCCGG-TTTGTACCCGGCAGTCTCACTAGAGTGCCCAACTAAATGCTGGCAACTAG 1125

Query 359 TAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGAC 418
          |||
Sbjct 1124 TAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGAC 1065

Query 419 AACCATGCACCACCTGTCACCTTGTCGCCCGAAGGGAACGCTCCATCTCTGGAGTTGTCAA 478
          |||
Sbjct 1064 AACCATGCACCACCTGTCACCTTGTCGCCCGAAGGGAACGCTCCATCTCTGGAGTTGTCAA 1005

Query 479 GGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGACTCCAC 538
          |||
Sbjct 1004 GGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATG-CTCCAC 946

Query 539 CGCTTGTGCGGGTCCCGTCAATTCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTGCTACTCCCCAGG 598
          |||
Sbjct 945 CGCTTGTGCGGGTCCCGTCAATTCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTGCTACTCCCCAGG 886

Query 599 CGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCGGCACCTAAGGGCGGAAACCCTCAAACACCTAGCAC 658
          |||
Sbjct 885 CGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCGGCACCTAAGGGCGGAAACCCTCAAACACCTAGCAC 826

Query 659 TCATCGTTTTACGGTGTGGACTACCAAGGTATCTAATCCTGTTTGCTACCCACACTTTC 718
          |||
Sbjct 825 TCATCGTTT-ACGGTGTGGACTACCA-GGGTATCTAATCCTGTTTGCTACCCACACTTTC 768

Query 719 GAGCCTCAACGTCAGTTACAGTCCAGAA-GCCGCCTTCGC-ACTGGTGTCTTCC-TAT- 774
          |||
Sbjct 767 GAGCCTCAACGTCAGTTACAGTCCAGAAAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATATA 708

Query 775 TCTACGCATTTACCGGTAC-CATGGAGTTCC-CTTTC-TCTTAATGG-CTCAAGTCNTC 830
          |||
Sbjct 707 TCTACGCATTTACCGCTACACATGGAGTTCCACTTTCCTCT-ACTGCATCAAGTCATC 649

Query 831 CCAGTTTCCAAAGGCAATCCCT 852
          |
Sbjct 648 C-AGTTTCCAAAG-CAATTCCT 629

```

```

>E02 (amostra 2BBI Forward)Placa152_Seq_020211_NAGE_LGMP Run01 Cimarron 3.12 726
AGTNGAACGCTTTGTCTTTAACTGATCTGACGAGCTTGCTCTGATTTGATTTTATCTGACAAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTA
ACACGTGGGTAACCTACCTCTTAGCAGGGGATAACATTTGAAACAAGTGCATAATACCGTATAATACCAACAACCGCATGGTT
GTTGGTTGAAAAGATGGTTCTGCTATCACTAAGAGATGGACCCGCGGTGCATAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGG
CAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGAACTGAGACACGGCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
AGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTGTGATGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACACTGTTA
TAAGAGAAGAACGGCACTGAGAGTAACCTGTTTCAGTGTGTGACGGTATCTTACCAGAAAGGAACGGCTAAATACGTGCCAGCAG
CCGCGGTAACCTACGTATGTTTCCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTATTTAAGTCTGAAGTG
AAAGCCCTCAGCTCAACTGAGGAATGGCTTTGAAACTGGATGACTTGAGTGCAGTAGAGGAAAGTGGAACTCCATGTGTAGC
GGTGAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGGCGAAAGGCGGGTTTTCTGGACTGTTAACTGAACGTTGAGCTCGCAA
AAGTGTGG

```

```

dbj|AB469392.1| Weissella paramesenteroides gene for 16S rRNA, partial sequence,
strain: 860712
Length=974
Score = 1317 bits (713), Expect = 0.0
Identities = 743/756 (99%), Gaps = 10/756 (1%)
Strand=Plus/Plus

```



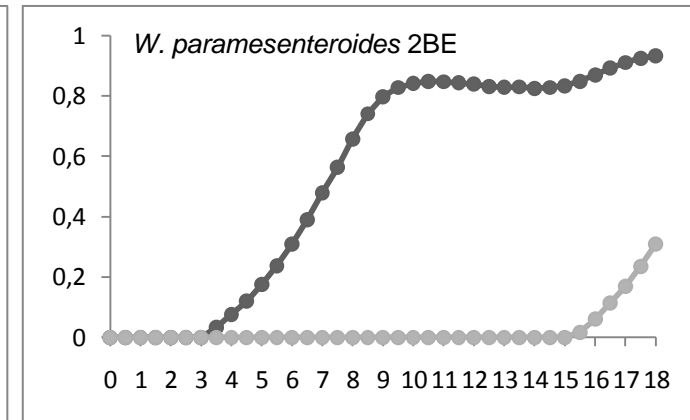
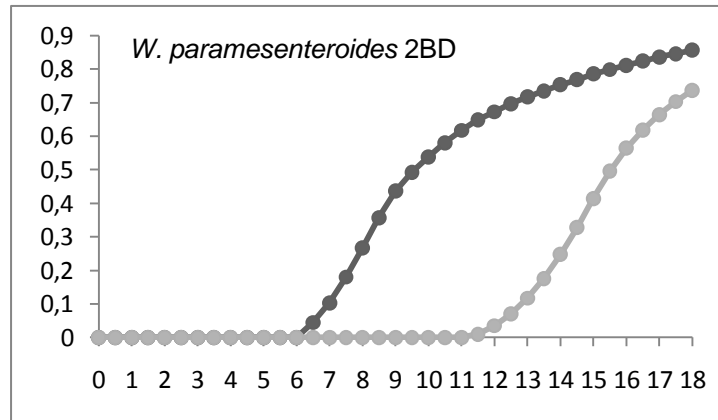
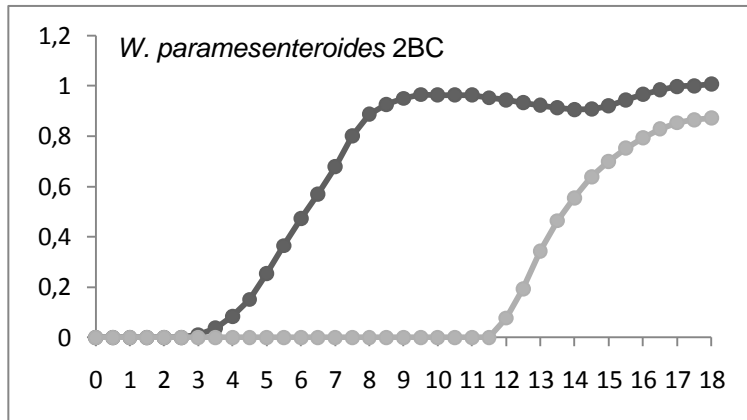
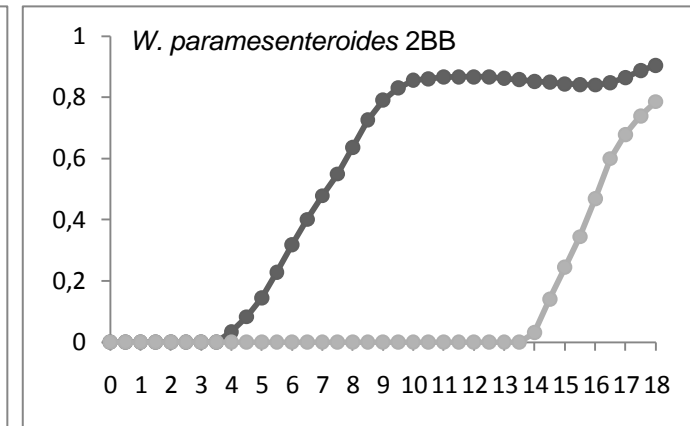
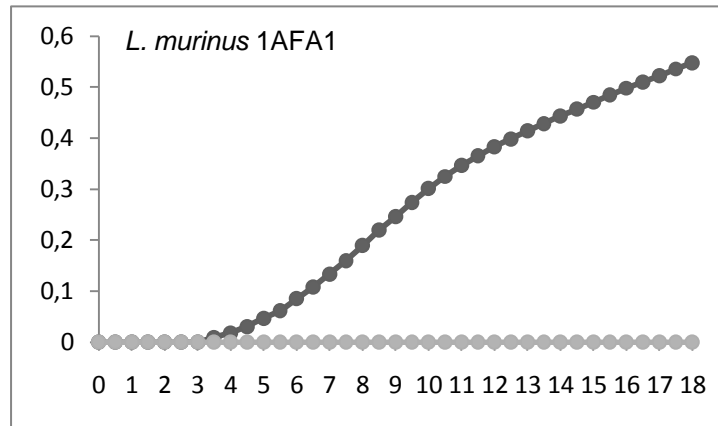
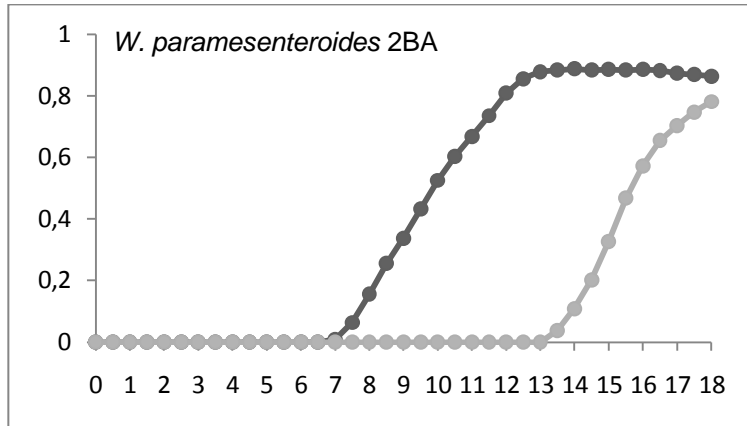


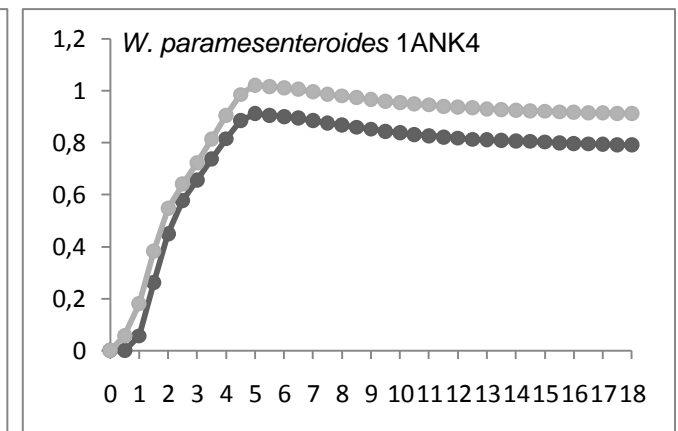
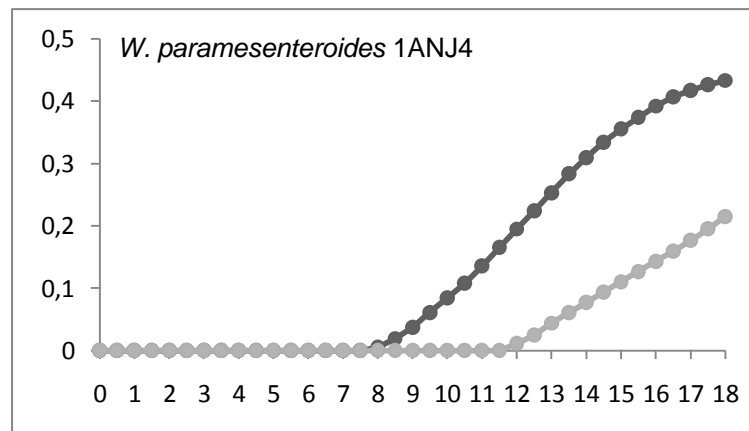
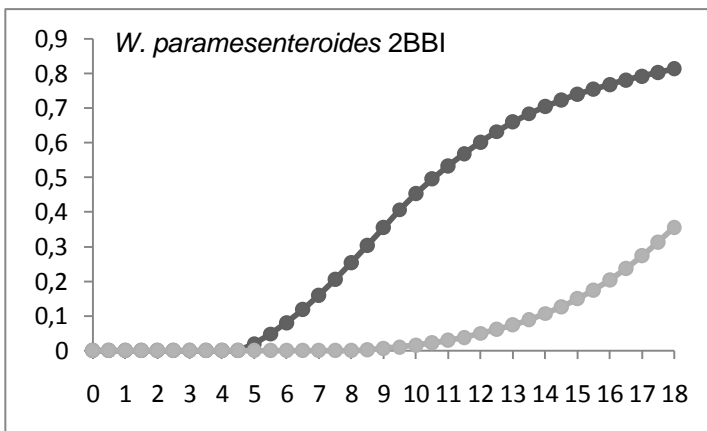
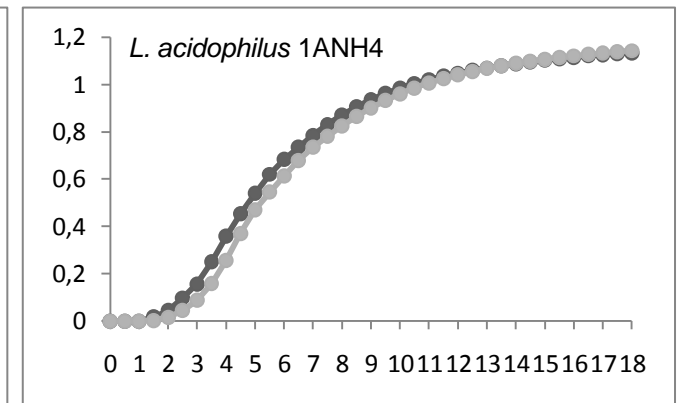
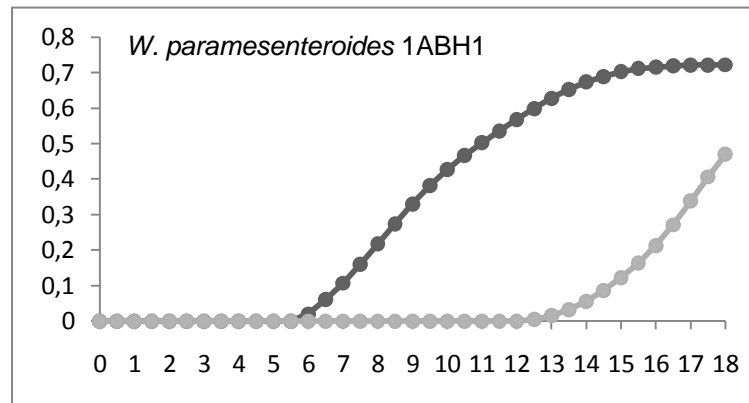
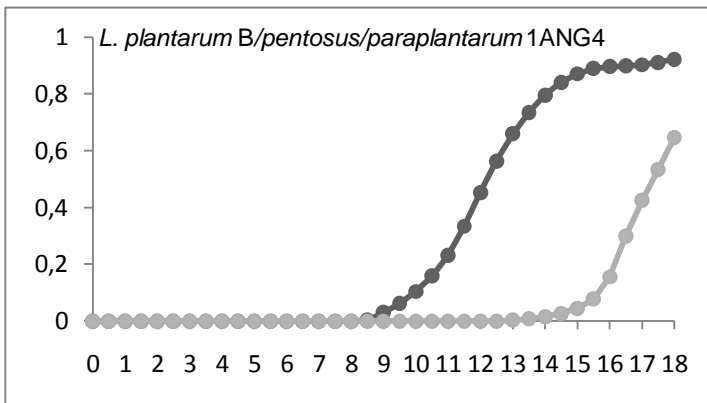
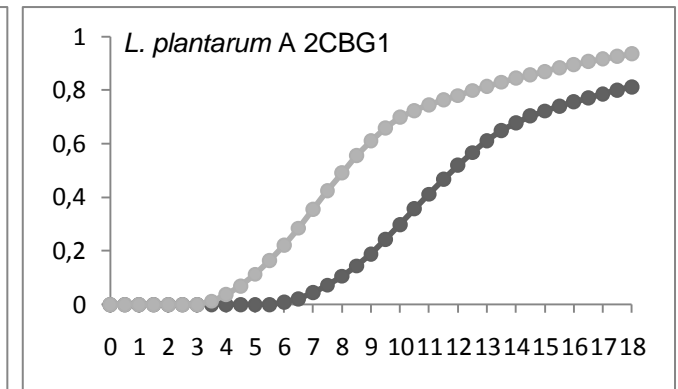
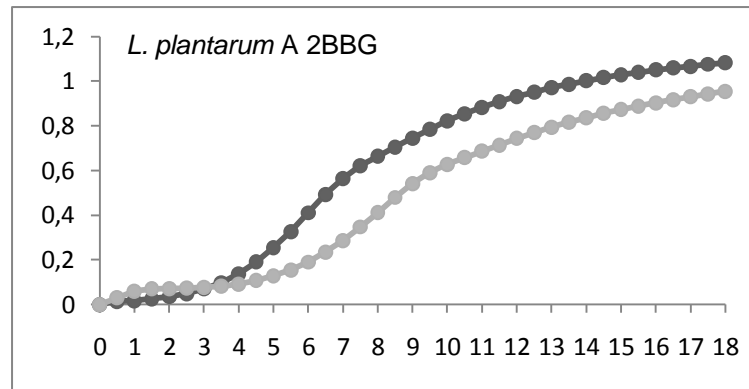
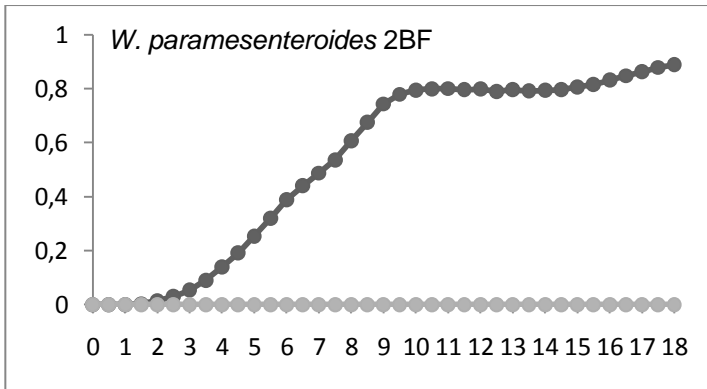
**Apêndice B** – Curvas de crescimento dos isolados na presença e ausência de ácido gástrico artificial.

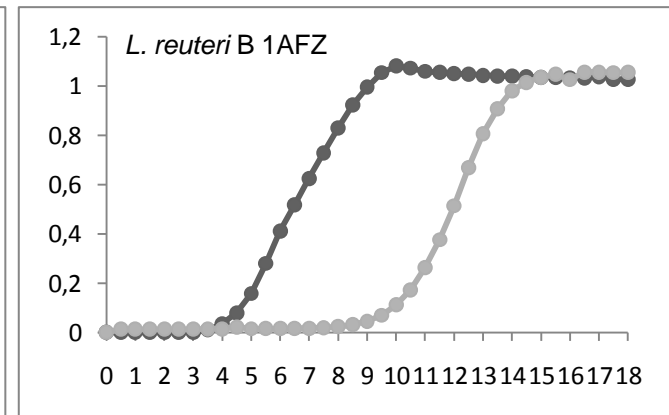
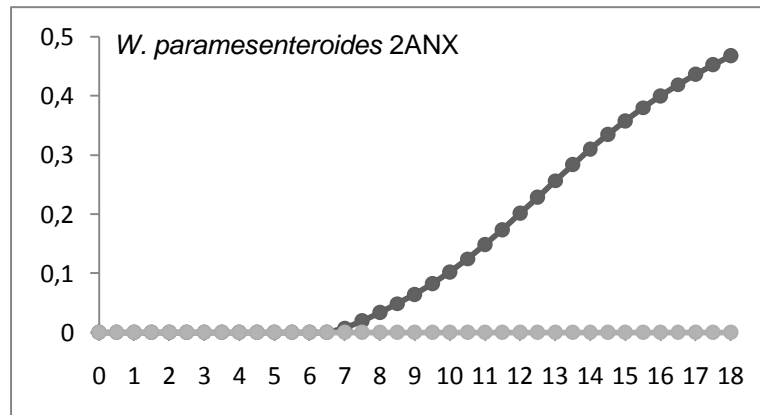
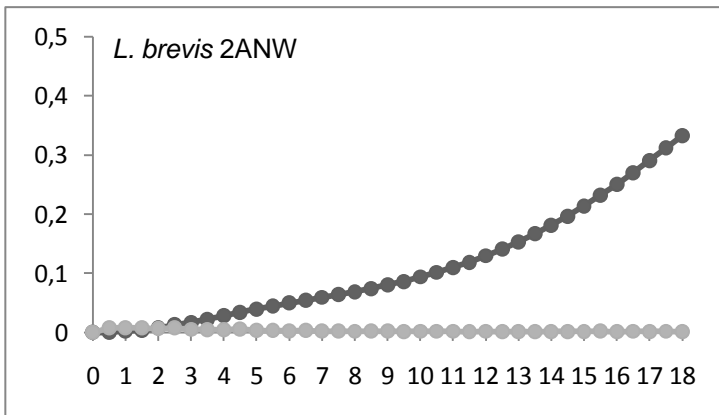
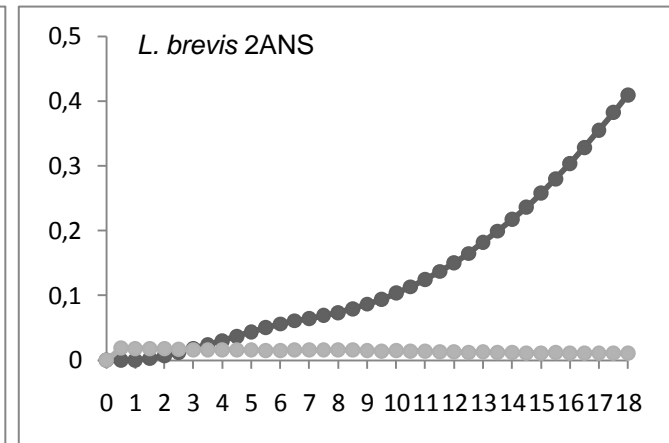
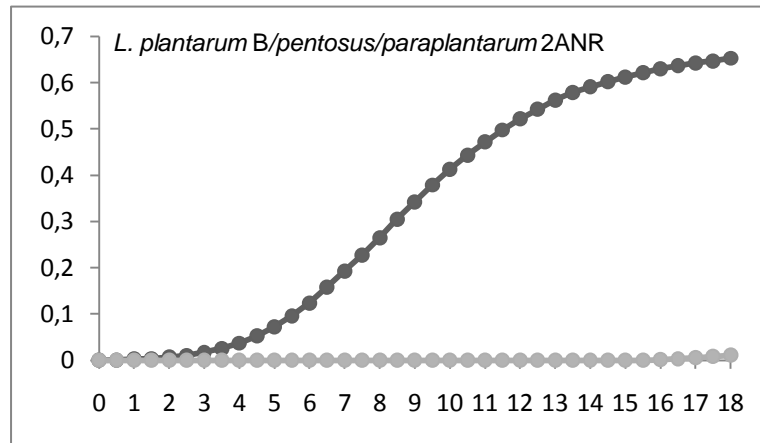
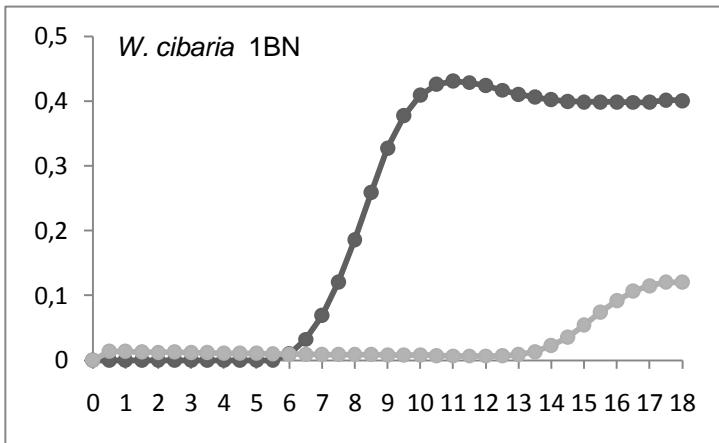
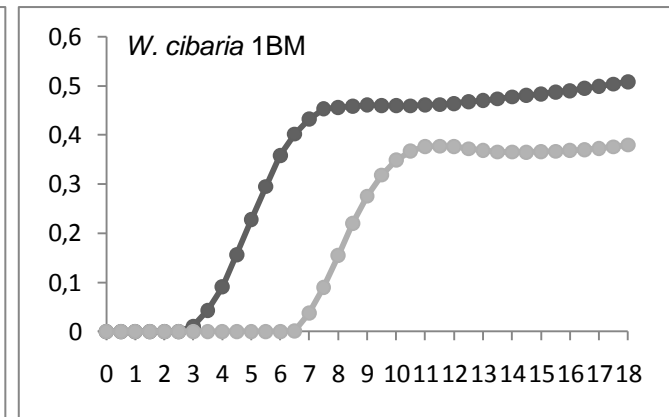
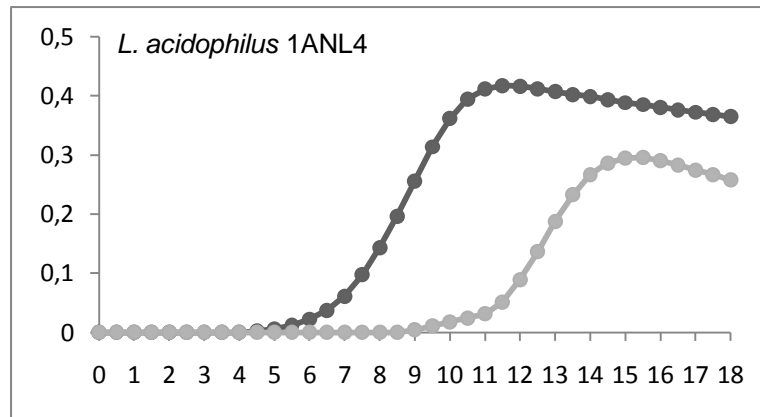
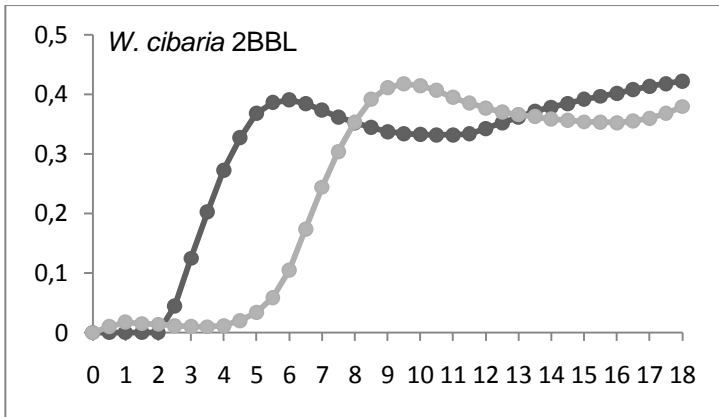
As curvas preta e cinza equivalem, respectivamente, ao crescimento bacteriano na ausência e presença de ácido gástrico artificial (pH 2,5).

A porcentagem de inibição é apresentada na tabela 6.

Eixo das ordenadas: OD 620nm; Eixo das abscissas: tempo em horas.







**Apêndice C** – Curvas de crescimento dos isolados na presença e ausência de sais biliares.

As curvas preta e cinza equivalem, respectivamente, ao crescimento bacteriano na ausência e presença de oxgall 0,3%. A porcentagem de inibição é apresentada na tabela 8.

Eixo das ordenadas: OD 620nm; Eixo das abscissas: tempo em horas.

