

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

KATHARINA DE OLIVEIRA BARROS

**Características probióticas de linhagens de *Lactobacillus* isoladas
da mucosa gástrica de suínos**

BELO HORIZONTE

2017

KATHARINA DE OLIVEIRA BARROS

**Características probióticas de linhagens de *Lactobacillus* isoladas
da mucosa gástrica de suínos**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Área de Concentração: Microbiologia.

Orientadora: Prof^a Sílvia Beleza de Moura.

BELO HORIZONTE
2017

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Kênia e Jorge, pelo amor, dedicação e apoio incondicional ao longo de toda a vida; e a minha irmã, Rafaella, modelo de caráter e bondade, pelo suporte e amizade.

Ao Pedro Motta, por seu amor, companheirismo, incentivo e paciência que tornaram os últimos anos mais aprazíveis.

Agradeço a minha orientadora, Sílvia Beleza de Moura, pelo apoio, confiança, paciência e ensinamentos que enriqueceram o meu processo de aprendizado.

A Luciana R. Almeida, que ajudou e acompanhou na evolução desse trabalho.

Aos professores do LEFM, que contribuíram para o desenvolvimento desse projeto, Jacques R. Nicoli, Elisabeth Neumann e Flaviano S. Martins.

Aos professores Luiz de Macedo e Paula P. Magalhães pelo apoio recebido pelo MOA. E aos professores Gifone A. Rocha e Andrey P. Lage pelas linhagens de *H. pylori* e *C. jejuni*.

Aos colegas do Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos (LEFM), Mário, Sávio, Leonardo, Spencer, Carol, Quésia e Raphael pelos auxílios valiosos e pela convivência agradável.

Aos meus queridos amigos, que sempre me deram muita força durante o desenvolvimento deste trabalho. Em especial Raíssa, Mariana, Mariana Maschietto, e Hiram.

Ao Mozart, que é um anjo na minha vida.

A secretaria, coordenação, professores e colegas do curso de Pós-Graduação em Microbiologia.

Às agências de fomento CAPES e CNPq.

“A teoria sem a prática vira ‘verbalismo’, assim como a prática sem teoria vira ativismo. No entanto, quando se une a prática com a teoria tem-se a práxis, a ação criadora e modificadora da realidade”.

Paulo Freire

RESUMO

O gênero *Lactobacillus* faz parte da microbiota normal do trato digestivo de suínos, incluindo o estômago. Bactérias que colonizam essa região são consideradas fonte de *Lactobacillus* para porções mais distais do trato digestivo, pela contínua descamação do epitélio do estômago, regulando a composição da microbiota intestinal. Bactérias que colonizam essa região são ainda pouco estudadas e talvez tenham potencial probiótico. Este trabalho teve como objetivo a caracterização probiótica de 19 linhagens de *Lactobacillus* isoladas da mucosa gástrica de suínos e identificadas em estudo anterior. As características probióticas avaliadas foram tolerância ao suco gástrico e aos sais biliares, hidrofobicidade da superfície celular, produção de biofilme, degradação da mucina gástrica, resistência a antibióticos e antagonismo *in vitro* contra *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Listeria monocytogens*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase. Todas as 19 linhagens exibiram resistência ao suco gástrico, sendo que 11 delas apresentaram 0% de inibição do crescimento em pH 2,5. Apenas uma linhagem foi resistente aos sais biliares a 0,3%, sendo, a maioria (58%) tolerantes. Em relação à superfície celular, 57% das linhagens mostram-se hidrofóbicas e 31% foram moderadamente hidrofóbicas. Todas as linhagens foram capazes de produzir biofilme, sendo que 74% delas foram fortes produtoras e 26% produtoras moderadas de biofilme. Nenhuma das linhagens testadas, exceto pelos controles positivos - *Salmonella* Typhimurium e *Shigella flexneri* - exibiram halos de degradação de mucina. No ensaio de antagonismo, uma amostra de *Lactobacillus* (Lac6) se destacou, mostrando halos de inibição contra todos os patógenos testados, enquanto que a maioria das amostras (63%) mostrou atividade antagonista contra, pelo menos, 3 patógenos. No teste de antibiograma, as linhagens foram resistentes a uma quantidade considerável de antibióticos, o que leva à necessidade de investigação da natureza genética da resistência apresentada por essas amostras. Nossos resultados mostraram que linhagens de *Lactobacillus* isoladas da mucosa gástrica saudável de suínos apresentam perfis distintos quanto a características probióticas *in vitro*, que merecem ser exploradas em maior profundidade. Em especial, a linhagem Lac6, pelo seu maior espectro de antagonismo, somado às outras características avaliadas, seria a linhagem de escolha para caracterização de atividade probiótica *in vivo*, entretanto, por ter apresentado resistência a vários antibióticos, seria importante, antes, avaliar a origem da resistência.

Palavras-chave: *Lactobacillus*, mucosa gástrica, probiótico, suínos.

ABSTRACT

The genus *Lactobacillus* is part of the normal microbiota of the digestive tract of swine, including the stomach. Bacteria that colonize this region are considered a source of *Lactobacillus* to more distal portions of the digestive tract, by the continual desquamation of the stomach epithelium and may contribute to the regulation of the composition of the intestinal microbiota. Bacteria that colonize this region are still poorly studied and may have probiotic potential. This work aimed at the probiotic characterization of 19 strains of *Lactobacillus* isolated from gastric mucosa of pigs that were identified in a previous study. The probiotic characteristics evaluated were tolerance to the gastric juice and bile salts, cell surface hydrophobicity, biofilm production, gastric mucin degradation, antibiotic resistance and *in vitro* antagonism against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Listeria monocytogens*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase. All 19 strains exhibited resistance to gastric juice, of which 11 had 0% inhibition of growth at pH 2.5. Only one strain was resistant to bile salts at 0.3%, being most of them (58%) tolerant. Regarding the cell surface, 57% of the strains were hydrophobic and 31% were moderately hydrophobic. All strains were able to form biofilm, 74% of which were strong producers and 26% were moderate biofilm producers. None of the strains tested exhibited mucin degradation halos, except for the positive controls - *Salmonella* Typhimurium and *Shigella flexneri*. In the antagonism assay, a strain of *Lactobacillus* (Lac6) stood out from the others, showing antagonistic activity against all pathogens tested, while most strains (63%) antagonized at least 3 pathogens. In the antibiogram test, strains that grew in aerobic atmosphere were resistant to a considerable number of antibiotics, results that point to the need of investigating the genetic nature of these resistances. Our results showed that *Lactobacillus* strains isolated from healthy gastric mucosa of pigs have different profiles of *in vitro* probiotic characteristics that deserve to be explored. In particular, the strain Lac6, due to its greater spectrum of antagonism, in addition to the other characteristics evaluated, would be the strain of choice for the characterization of *in vivo* probiotic activity, however, because the strain showed resistance to several antibiotics, it would be important to evaluate the source of this resistance.

Keywords: *Lactobacillus*, gastric mucosa, probiotics, swine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Mecanismos de ação de linhagens probióticas.....	16
Figura 2	Porcentagem de inibição de crescimento de amostras de <i>Lactobacillus</i> no teste de tolerância ao suco gástrico artificial..	35
Figura 3	Curvas de crescimento da amostra Lac18 após exposição ao suco gástrico (em vermelho) e sem o tratamento com o suco gástrico (em azul).....	36
Figura 4	Porcentagem de inibição de linhagens de <i>Lactobacillus</i> no teste de sensibilidade a sais biliares.....	37
Figura 5	Curvas de crescimento da amostra Lac9 na presença (vermelho) e ausência de oxgall 0,3% (em azul).....	37
Figura 6	Teste de degradação da mucina gástrica, mostrando ausência de halos (ausência de degradação de mucina) nas linhagens de <i>Lactobacillus</i>	38
Figura 7	Porcentagem de Adesão Microbiana a Solventes (MATS) de linhagens de <i>Lactobacillus</i>	39
Figura 8	Produção de biofilme por linhagens de <i>Lactobacillus</i>	40
Figura 9	Halos de inibição de linhagens de <i>Lactobacillus</i>	41
Figura 10	Halos de resistência de linhagens de <i>Lactobacillus</i> a antibióticos.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Atividade antagonista das amostras de <i>Lactobacillus</i> , representada pela produção (+) ou não (-) de halo de inibição, contra bactérias reveladoras.....	42
Tabela 2	Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de linhagens de <i>Lactobacillus</i>	44
Tabela 3	Resumo dos resultados dos testes para caracterização probiótica.....	45

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Principais ensaios para a seleção de linhagens probióticas.....	13
Quadro 2	Linhagens selecionadas para o presente trabalho e a região do estômago da qual foram isoladas.....	28

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 Seleção de linhagens probióticas.....	12
1.2 Mecanismos de ação dos probióticos.....	12
1.3 Efeitos benéficos associados aos probióticos.....	17
1.4 O Gênero <i>Lactobacillus</i>	18
1.5 Suínos.....	20
1.6 Aditivos alimentares na dieta de suínos.....	22
2. JUSTIFICATIVA	25
3. OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo geral.....	26
3.2 Objetivos específicos.....	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 Linhagens de <i>Lactobacillus</i> utilizadas.....	27
4.2 Avaliação <i>in vitro</i> do potencial probiótico de linhagens de <i>Lactobacillus</i>	29
4.2.1 Teste de sensibilidade ao suco gástrico artificial.....	29
4.2.2 Teste de sensibilidade aos sais biliares.....	30
4.2.3 Teste de avaliação da degradação de mucina gástrica.....	30
4.2.4 Teste de hidrofobicidade da superfície celular.....	31
4.2.5 Ensaio de produção de biofilme.....	31
4.2.6 Teste de antagonismo.....	32
4.2.7 Antibiograma.....	33
5. RESULTADOS	35
5.1 Teste de sensibilidade ao suco gástrico artificial.....	35
5.2 Teste de sensibilidade aos sais biliares.....	36
5.3 Teste de avaliação da degradação de mucina gástrica.....	38
5.4 Teste de hidrofobicidade da superfície celular.....	39
5.5 Ensaio de produção de biofilme.....	39
5.6 Teste de antagonismo.....	40
5.7 Antibiograma.....	43
6. DISCUSSÃO	46

7. CONCLUSÕES.....	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
ANEXO.....	64

1. INTRODUÇÃO

O termo “probiótico” tem sido usado há muito tempo, com definições variadas. Foi primeiramente utilizado, em 1965, para definir “substâncias produzidas por microrganismos que promovem o crescimento microbiano”. Essa definição criou um conceito oposto ao de antibiótico, mas não persistiu por muito tempo e, em 1974, Parker definiu a palavra como “organismos e substâncias que contribuem para o equilíbrio microbiano intestinal”. Entretanto, esse conceito fornecia uma gama de interpretações, pois a palavra “substâncias” poderia incluir os antibióticos (GOLDIN, 2011). Em 1989, Fuller redefiniu o termo como “um suplemento alimentar microbiano vivo que afeta benéficamente o animal hospedeiro, melhorando o equilíbrio microbiano intestinal” (FULLER, 1992; MCFARLAND, 2015). A definição foi sendo aprimorada e, finalmente, em 2002, a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) e a *World Health Organization* (WHO) conceituaram o termo como o conhecemos atualmente, sendo definido como “microrganismos viáveis que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios para a saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2002).

O uso de organismos vivos em alimentos tem longa história, havendo registros do uso de produtos lácteos fermentados em hieróglifos egípcios, na Bíblia, nos livros sagrados do Hinduísmo, entre outros (GUO et al., 2014; SOCCOL et al, 2010). Em 1905, Elie Metchnikoff associou a longevidade dos búlgaros aos *Lactobacillus* utilizados para fermentar o iogurte que eles consumiam e à presença desses microrganismos no cólon (KAUFMANN, 2008). Em 1906, Henry Tissier, pediatra francês, sugeriu que *Bifidobacterium* fosse administrado a pacientes com diarreia para restaurar a microbiota intestinal, depois de verificar que crianças saudáveis apresentavam um número maior de bactérias desse gênero que crianças com diarreia (MCFARLAND, 2015).

Ao longo dos anos, diversas estratégias têm sido estudadas para se tentar modular a composição da microbiota do trato gastrointestinal com o intuito de melhorar a digestão, a imunidade e a resistência a doenças do hospedeiro, não apenas em seres humanos, mas em animais domésticos e de rebanho. A suplementação da dieta com microrganismos considerados benéficos tem sido cada vez mais utilizada por ser viável do ponto de vista nutricional e também como

alternativa para contornar os efeitos adversos de antibióticos e outras drogas (GAGGIA et al., 2010; MANN et al., 2014).

O uso de antibióticos, que revolucionou a Medicina a partir de meados do século XX, foi logo ampliado para uso na pecuária, como promotores de crescimento. Eles foram administrados continuamente na ração, em concentrações menores do que as administradas na profilaxia ou terapia de doenças infecciosas (GONZALES et al., 2012; THACKER, 2013; HOU et al., 2015). A eficácia dos antibióticos no aumento da taxa de crescimento desses animais, na melhora do desenvolvimento reprodutivo e na redução da mortalidade, tornou o uso de promotores de crescimento uma excelente ferramenta para a pecuária (CROMWELL, 2002; VONDRUSKOVA et al., 2010).

Todavia, o uso indiscriminado dos antibióticos ocasionou o surgimento de linhagens de bactérias resistentes. De fato, a resistência bacteriana vem sendo relatada desde a década de 1960, e, para solucionar o problema, a indústria farmacêutica investiu intensamente na descoberta de novas classes de antimicrobianos. No entanto, para cada antibiótico desenvolvido, novos casos de resistência bacteriana ao medicamento se sucediam. Atualmente, constata-se uma alta taxa de infecções por microrganismos multirresistentes. Visando um controle maior de exposição de microrganismos aos antimicrobianos e, com isso, a redução da pressão seletiva sobre eles, alguns países baniram e outros restringiram o uso de promotores de crescimento em animais (CROMWELL, 2002; AMINOV, 2010; KNEZEVIC et al., 2016).

Desde então, o uso de probióticos tem sido visto como uma alternativa ao uso de promotores de crescimento. Sua utilização na alimentação animal tem sido indicada principalmente por reduzir a mortalidade resultante da infecção intestinal por microrganismos patogênicos. Além disso, à semelhança do que é visto com o uso de promotores de crescimento, o uso de probióticos leva à melhora do desempenho e das características de produção animal, aumentando a eficiência no aproveitamento alimentar, na modulação do ecossistema gastrointestinal e estimulando o sistema imunológico (GALDEANO et al., 2007; GAGGIA et al., 2010), sem deixar resíduos prejudiciais na carne para o consumo (FULLER, 1989).

1.1 Seleção de linhagens probióticas

Microrganismos da microbiota indígena, principalmente do intestino, são frequentemente fontes de probióticos. Entretanto, até que essas linhagens sejam isoladas, caracterizadas e os efeitos benéficos sejam associados a elas, as mesmas não podem ser consideradas probióticos. Assim, são necessárias, além da identificação definitiva, investigações *in vitro* e *in vivo* sobre as características probióticas dessas linhagens para elas sejam utilizadas para esse fim (HILL et al, 2014).

Os requisitos para que um microrganismo seja considerado um probiótico incluem resistência e manutenção de sua viabilidade no ambiente gastrointestinal, ser seguro para consumo, não invasivo e não patogênico, manter a sua viabilidade durante todo o período de prateleira do produto (seja em formulação farmacêutica ou em um produto alimentício) e trazer algum benefício ao hospedeiro. Além disso, essas linhagens devem ter um crescimento rápido *in vitro* e serem fáceis de serem manuseadas em laboratório (REID, 1999; OUWEHAND, SALMINEN e ISOLAURI 2002; COLLADO, GUEIMONDE e SALMINEN, 2010).

As propriedades probióticas dos microrganismos são linhagem-específicas e a seleção dessas para uso humano e veterinário baseia-se nos aspectos descritos, resumidamente, no quadro 1 (PAPADIMITRIOU et al., 2015).

1.2 Mecanismos de ação dos probióticos

Os mecanismos de ação dos probióticos, que geram efeitos benéficos para saúde dos animais e de seres humanos, ainda não são totalmente compreendidos. Os mecanismos incluem atividade antagonista contra patógenos, habilidade de aderir à mucosa gastrointestinal e competir por nutrientes, e capacidade de estimular e modular a resposta imunológica do hospedeiro (REID, 1999; BERMUDEZ-BRITO et al., 2012; HERBEL et al., 2013).

Quadro 1 – Principais ensaios para a seleção de linhagens probióticas.

Propriedades probióticas	Ensaio
Sobrevivência dentro do hospedeiro	Tolerância ao suco gástrico Resistência aos sais biliares
Ensaio de segurança	Resistência a antimicrobianos Atividade hemolítica Adesão às células do hospedeiro Produção de enzimas, toxinas e aminas biogênicas
Colonização do hospedeiro	Teste de hidrofobicidade Adesão ao muco Auto agregação.
Ensaio antimicrobianos	Produção de substâncias antagonistas Co-agregação com patógenos
Ensaio de imunomodulação	Translocação bacteriana Simulação de propriedades anti-inflamatórias Regulação de junções epiteliais

FONTE: PAPADIMITRIOU et al. (2015).

O trato gastrointestinal é coberto por um epitélio contínuo que tem a função de transporte de substâncias e funciona como uma barreira à invasão microbiana. A barreira é preservada por estruturas físicas (como o próprio epitélio e junções oclusivas, além da camada de muco) e imunológicas (como IgA secretora e linfonodos mesentéricos). Uma vez danificada, bactérias e antígenos dos alimentos podem alcançar a submucosa e induzir respostas inflamatórias que resultam em desordem gastrointestinal, como doenças inflamatórias (VAN TASSEL e MILLER, 2011).

Linhagens de probióticos podem promover uma barreira física impedindo a entrada de microrganismos patogênicos nas células epiteliais (Figura 1-a) (GAREAU, SHERMAN e WALKER et al., 2010). A adesão ao epitélio, além de ser necessária para o antagonismo contra patógenos, devido à competição por exclusão, é importante para a modulação do sistema imunológico. Os probióticos podem melhorar também a função da barreira epitelial favorecendo a secreção de muco pelas células epiteliais (Figura 1-b). Estudos demonstraram que o aumento da produção de mucina pode ser uma explicação para o efeito inibitório de espécies de *Lactobacillus* na translocação bacteriana em culturas de células (JUNTUNEN et al., 2001; MATTAR et al., 2001; MACK et al., 2003; BAJAJ, CLAES e LEBEER, 2015). Além disso, os microrganismos benéficos podem reforçar as junções de oclusão, por meio da atuação nas estruturas das junções, como a ativação das proteínas ocludinas e ZO-1 (*Zonula occludens-1*), contribuindo para a manutenção da permeabilidade da barreira (Figura 1-c) (RESTA-LENERT e BARRET, 2003; OHLAND e MACNAUGHTON, 2010).

A competição por exclusão baseia-se na interação bactéria-bactéria mediada pela concorrência por sítios de adesão na mucosa intestinal e por nutrientes disponíveis. Como geralmente as linhagens selecionadas para ser um probiótico compõem a microbiota indígena do hospedeiro, elas têm uma maior probabilidade de se adaptarem àquele ambiente. Essas bactérias metabolizam os nutrientes mais rapidamente deixando pouca fonte de energia para os patógenos, o que diminui a multiplicação desses microrganismos. Além disso, o probiótico pode modificar o ambiente, por meio de seus produtos de metabolismo e fermentação, tornando-o menos apropriado ao seu competidor ao produzir substâncias antagonistas, tais

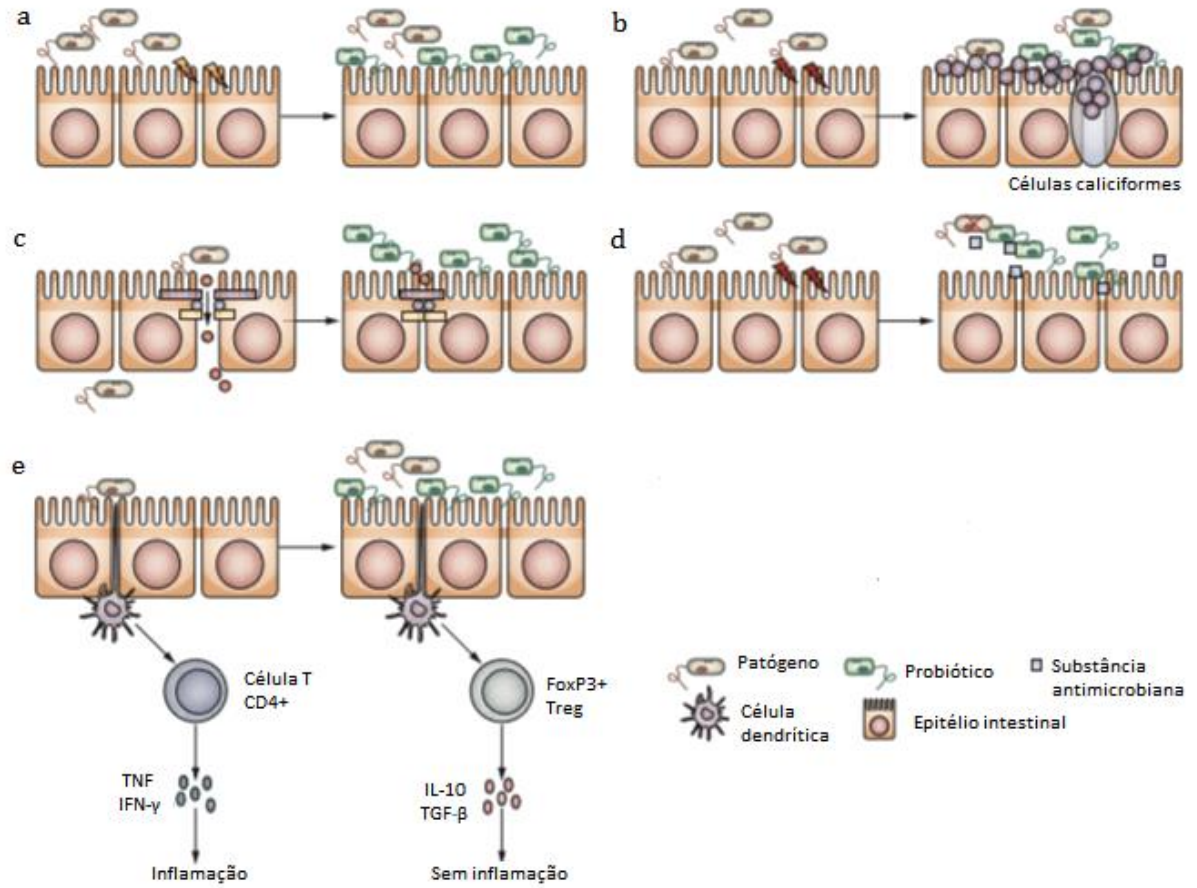
como ácidos orgânicos e bacteriocinas (Figura 1-d) (OHLAND e MACNAUGHTON, 2010; BERMUDEZ-BRITO et al., 2012; O'SHEA et al., 2012).

O efeito imunomodulatório dos probióticos no hospedeiro é exercido, de uma maneira geral, pela estimulação da secreção de anticorpos, principalmente IgA, e interação com monócitos/macrófagos, linfócitos e células dendríticas (REID, 1999; HARDY et al., 2013).

Linhagens probióticas podem estimular a resposta imune inata por meio da sinalização de células dendríticas - principais células apresentadoras de antígenos - que, por sua vez, passam por processo de maturação. As células dendríticas maduras apresentam os componentes celulares do probiótico aos linfócitos T, nos tecidos linfoides associados, que levam à proliferação e à formação de células efectoras e de memória (LEBEER, VANDERLEYDEN e KEERSMAECKER, 2008; BAJAJ, CLAES e LEBEER, 2015). A sinalização, pelas células dendríticas, de células T regulatórias leva à produção de citocinas inibitórias, como IL-10 e TGF- β , que coíbem a resposta inflamatória (Figura 1-e) (GAREAU, SHERMAN e WALKER et al., 2010; TSAI, CHENG E PAN, 2012).

É relevante esclarecer que os mecanismos de ação dos probióticos podem ser diferentes para cada linhagem e, conseqüentemente, os seus efeitos benéficos. (GAREAU, SHERMAN e WALKER et al., 2010).

Figura 1 – Mecanismos de ação de linhagens probióticas.



FONTE: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4748966/pdf/nihms338723.pdf>

1.3 Efeitos benéficos associadas aos probióticos

Estudos baseados em análises de evidências em modelos animais e estudos clínicos têm demonstrado os efeitos benéficos de probióticos em diversas doenças como na diarreia infecciosa, na síndrome do intestino irritável e na prevenção de outras doenças inflamatórias intestinais (SCHOSTER et al., 2015; VARANKOVICH, NICKERSON e KORBER, 2015), contra infecções gástricas (FELLEYETAL., 2001; HAMILTON-MILLER, 2003) e na intolerância à lactose (PELLETIER; LAURE-BOUSSUGE e DONAZZOLO, 2001). Mais recentemente, os efeitos probióticos foram relatados também em distúrbios psiquiátricos, como a depressão e a ansiedade, sendo, nesses casos, denominados psicobióticos (DINAN, STANTON e CRYAN, 2013).

As pesquisas têm mostrado uma alta eficácia de linhagens probióticas na redução do risco de diarreia associada ao uso de antibióticos, tanto em pacientes adultos quanto pediátricos. Esse tipo de diarreia acomete uma porcentagem significativa de pacientes e é comumente causada por *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* e *Staphylococcus aureus* (GOLDENBERG et al., 2015). A eficácia do tratamento e profilaxia tem sido comprovada tanto com o uso de linhagens probióticas isoladas, como com o uso de associações (OUWEHAND et al., 2014). Por exemplo, Gao e colaboradores (2010) usaram a associação de *L. acidophilus* (CL1285) e *L. casei* (LBC80R) para profilaxia de diarreia associada a antibióticos e diarreia associada a *Clostridium difficile* em pacientes adultos hospitalizados com diferentes tipos de infecções. Percebeu-se que o tratamento com probiótico, iniciado até 36 horas após o início da antibioticoterapia, foi efetivo na diminuição do risco de diarreia associada a antibióticos e a *C. difficile*, em comparação com o grupo que recebeu apenas tratamento antibiótico.

Em pacientes com síndrome do intestino irritável, estudos demonstraram que o uso de probióticos alivia sintomas específicos da enfermidade, tais como inchaço, flatulência e dor abdominal (RINGEL et al., 2008; CHOI et al., 2011; MICHAIL e KENCHE, 2011), assim como leva a uma melhora global da doença (GUGLIELMETTI, GSCHWENDER e POPP, 2011).

Diversos probióticos também têm sido sugeridos como adjuvantes no tratamento da infecção gástrica causada por *Helicobacter pylori* (COVER, HALTER e

BLASER 1992; BLASER e ATHERTON, 2004). Apesar de não terem efeito sobre a erradicação da bactéria, podem ser utilizados concomitantemente ao tratamento antimicrobiano, reduzindo os sintomas e, conseqüentemente, aumentando a adesão dos pacientes ao tratamento. Sintomas típicos como diarreia, náuseas e alterações do paladar, foram significativamente reduzidos quando *Lactobacillus* GG foram adicionados ao tratamento antimicrobiano de pacientes assintomáticos com infecção por *H. pylori* (ARMUZZI et al., 2001). Alguns trabalhos também apontam para alguma ação direta dos probióticos na redução do número e atividade da bactéria *H. pylori*, como a linhagem *L. johnsonii* La1 (CRUCHET et al., 2003).

As espécies bacterianas mais frequentemente utilizadas como probióticos pertencem aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, entretanto, outros gêneros, como *Lactococcus*, *Streptococcus* e *Enterococcus* também têm sido eventualmente usados. O status de segurança (GRAS – *Generally Recognized as Safe*) conferido às espécies de *Lactobacillus* tem facilitado a aceitação de seu uso em formulações farmacêuticas e suplementos nutricionais tanto para uso humano como na medicina veterinária e para suplementação de dietas dos animais (OUWEHAND, SALMINEN e ISOLAURI 2002; OHLAND e MACNAUGHTON, 2010; BOVE et al., 2012).

1.4 O Gênero *Lactobacillus*

O gênero *Lactobacillus* pertence ao grupo de bactérias ácido lácticas que inclui também os gêneros *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Oenococcus* e *Enterococcus*. São microrganismos Gram positivos, catalase negativos que produzem ácido láctico como principal produto final do metabolismo de fermentação. O gênero *Lactobacillus* é caracterizado por microrganismos em forma de bastonetes ou cocobacilos, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos ou microaerófilos, geralmente imóveis. São fastidiosos e dispõem de requerimento nutricional complexo, que inclui aminoácidos, peptídeos, vitaminas, sais, ácidos graxos, nucleotídeos e carboidratos. A classificação metabólica do gênero é caracterizada pelo tipo de fermentação e os seus produtos, sendo divididos em homofermentativos obrigatórios, heterofermentativos facultativos e

heterofermentativos obrigatórios (HAMMES e HERTEL, 2009; SALVETTI, TORRIANI e FELIS, 2012).

O gênero *Lactobacillus* pertence ao filo Firmicutes, classe Bacilli, ordem Lactobacilales e família Lactobacilaceae. De acordo com o LPSN (*List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*, 2016), o gênero apresenta mais de 200 espécies e 29 subespécies descritas. Essas espécies ocupam os mais variados nichos onde substratos fermentáveis estão disponíveis, sendo encontrados no trato gastrointestinal, trato respiratório e vaginal e na pele de seres humanos e animais, além de vegetais e solo (HAMMES e VOGEL, 1995).

Assim como outros membros do grupo de bactérias ácido lácticas, os *Lactobacillus* produzem substâncias que são capazes de inibir o crescimento de outros microrganismos. Dentre elas, estão os ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, diacetil, acetoína e bacteriocinas. As últimas são consideradas as substâncias inibitórias mais potentes produzidas por bactérias (DEEGAN et al., 2005; GASPAR et al., 2013). Espécies do gênero têm sido utilizadas há muito tempo na indústria alimentícia por suas funções metabólicas que levam à preservação, melhoria do sabor e textura dos alimentos. Além disso, são muito utilizados como probióticos. Recentemente, a Associação Científica Internacional para Probióticos e Prebióticos (*International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics*), em um documento de consenso sobre o uso apropriado de probióticos, apresentou uma lista com espécies amplamente estudadas que são consideradas probióticos capazes de causar efeitos benéficos gerais. As espécies de *Lactobacillus* citadas incluem *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* e *L. salivarius* (HILL et al., 2014).

Espécies de *Lactobacillus* fazem parte da microbiota indígena do trato gastrointestinal proximal de suínos. Essas espécies, ainda pouco estudadas, poderiam ser avaliadas quanto ao seu potencial probiótico para uso na suinocultura como tratamento alternativo em doenças infecciosas comuns em suínos e como promotores de crescimento (HOU et al., 2015; MANN et al., 2014).

1.5 Suínos

A microbiota indígena ou residente do trato gastrointestinal tem a importante função de resistência à colonização por microrganismos exógenos, que são eventualmente ingeridos na alimentação (VAN DER WAAIJ et al., 1971), além de impedir o supercrescimento de alguns microrganismos da microbiota residual potencialmente patogênicos (LEE, 1985; CHOW e LEE, 2006; LITTLE et al., 2008; STECHER et al., 2010). Além disso, a microbiota desempenha papel na manutenção nutricional, fisiológica e imunológica de seus hospedeiros (BRESTOFF e ARTIS et al., 2013; FOUHSE, ZIJLSTRA e WILLING, 2016).

O estômago de suínos é monogástrico, constituído de apenas um compartimento, que possui 4 regiões anatômicas distintas: a *pars esophagea*, região não secretora, formada por epitélio estratificado semelhante ao do esôfago, o corpo e o fundo, constituídos de mucosa oxíntica, e o antro (região pilórica), que é composta de mucosa antral. A região da *pars esophagea* está localizada na entrada do estômago como uma extensão do esôfago. Essa região não secreta enzimas digestivas e, por não apresentar uma camada mucoprotetora, é a região mais susceptível a ulcerações nos suínos. O bolo alimentar entra pela região cárdia e se mistura ao suco gástrico quando passa pelo fundo do estômago, onde se localizam as glândulas gástricas secretoras de ácido clorídrico. Além de inativar microrganismos ingeridos, devido ao baixo pH, o ácido desnatura proteínas, aumenta a absorção de ferro e cálcio da dieta e ativa pepsinogênio pela sua clivagem em pepsina, importante para a digestão de proteínas. Após a passagem pela região do fundo, o bolo alimentar entra na região pilórica do estômago, que secreta muco e permite a passagem do quimo para o intestino delgado (ROWAN et al., 1997; MARTINSEN, BERGH e WALDUM, 2005; LAERKE e HEDEMANN, 2012).

No estômago, as condições ácidas e o percurso rápido feito pela digesta, restringem a colonização bacteriana no local. Apesar disso, *Eubacterium* e *Lactobacillus*, além de *Clostridium* são abundantes e detectados tanto por técnicas dependentes de cultivo quanto por técnicas de biologia molecular no estômago de suínos (COLLADO e SANZ, 2007). *Lactobacillus* é considerado microbiota dominante do trato gastrointestinal de suínos, incluindo o estômago, existindo

ocupação do mesmo nicho ecológico por várias espécies do gênero (LESER et al., 2002; PAWEL et al., 2007).

A microbiota em suínos começa a se formar no dia do nascimento, devido à exposição de microrganismos provenientes da mãe durante a passagem através do canal do parto. Mudanças na microbiota vão ocorrendo ao longo das fases de crescimento do leitão. A colonização por *Escherichia coli* e *Streptococcus* spp. cria o ambiente anaeróbico necessário para subsequente colonização por *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium* e *Lactobacillus* (KONSTANTINOV et al., 2006; PETRI et al., 2010). As principais populações de microrganismos que habitam o trato gastrointestinal de suínos pertencem aos gêneros *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Prevotella*, *Streptococcus* e *Fibrobacter* (VALERIANO, BALOLONG e KANG, 2016).

Espécies de *Lactobacillus* colonizam o trato gastrointestinal logo após o nascimento do animal, e as principais espécies desse gênero encontradas são *L. amylovorus*, *L. johnsonii*, *L. reuteri*, *L. vaginalis* e *L. mucosae* (DOWD et al., 2008; VALERIANO, BALOLONG e KANG, 2016).

A microbiota indígena do suíno é essencial para a saúde e sobrevivência do animal. Porém, é frequente a ocorrência de infecções por microrganismos como *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens* e *Escherichia coli* (ZIEMER et al., 2010; DIAB et al., 2016). Outros agentes comuns de infecções entéricas em leitões são *Campylobacter* spp., *Yersinia* spp. e *Listeria monocytogenes* (ZIEMER et al., 2010).

As doenças causadas por essas bactérias, por serem muito comuns em leitões e levarem à perda de peso e mortalidade dos animais, além de gastos com terapia antimicrobiana, geram um déficit econômico significativo na suinocultura (MCLAMB et al., 2013). A ocorrência de problemas sanitários se intensificou ainda mais com o desmame precoce dos leitões, com o objetivo de aumentar a produtividade. Após o desmame, o animal é separado da mãe e transportado para outro ambiente, muitas vezes com vários porcos, e sua alimentação, que até então se constituía apenas de leite materno, passa a se constituir de uma dieta sólida. Esses fatores causam um estresse muito grande ao animal, afetando todo o processo de desenvolvimento, como atraso do crescimento, perda de peso e aumento nas ocorrências de doenças infecciosas (PLUSKE, HAMPSON e WILLIAMS, 1997; LALLÈS et al., 2004). Em especial, essas mudanças, por levarem

a alterações na microbiota, das funções fisiológicas e do sistema imunológico, aumentam o risco de diarreia (KONSTANTINOV et al., 2006).

A úlcera gástrica em suínos também é um problema de saúde de importância econômica na suinocultura por afetar a produtividade desses animais e tem prevalência mundial. Os animais com úlcera apresentam sinais de anorexia, anemia crônica, decréscimo no ganho de peso, gastrite hemorrágica aguda e morte súbita (O'BRIAN, 1993; GUISE et al., 1997; ROOSENDAAL et al., 2000). As lesões podem ocorrer em qualquer região do estômago, porém são mais frequentes na zona não glandular, a *pars esophagea*, cuja suscetibilidade à injúria é conferida pela ausência de muco no local (QUEIROZ et al., 1996; AMORY, MACKENZIE e PEARCE, 2006; GROSSE LIESNER et al., 2009).

A etiologia da doença ainda não é clara, entretanto, é nitidamente multifatorial, sendo considerados fatores de risco importantes aqueles que contribuem de alguma forma para uma exposição maior do epitélio desprotegido e sensível do quadrilátero esofágico ao ácido e enzimas do suco gástrico (CORRÊA, 2010). Assim, a dieta e a forma de manejo dos animais, principalmente qualquer fator que leve a um jejum prolongado dos animais, são considerados importantes.

Além desses fatores, a presença de *Helicobacter suis*, uma bactéria espiralada que tem alta prevalência nos porcos em idade de abate (FLAHOU, HAESBROUCK e SMET, 2016), está associada à doença (HELLEMANS et al., 2007; BAELE et al., 2008). Sapierzynski e colaboradores (2007) demonstraram que a infecção por *H. suis* em suínos leva à diminuição da produção de somatostatina e estimula a produção de gastrina. Assim, a presença de *H. suis* levaria a um aumento da secreção de HCl no estômago, e, portanto, a uma maior chance do epitélio pavimentoso estratificado da *pars esophagea* sofrer lesão (FLAHOU, HAESBROUCK e SMET, 2016).

1.6 Aditivos alimentares na dieta de suínos

Aditivos alimentares são produtos sem valor nutritivo utilizados na dieta para aumentar a produção, eficiência e desempenho de animais (JACELA et al., 2010).

Podemos citar como exemplos de aditivos os acidulantes, os antibióticos, probióticos, prebióticos, flavorizantes e anti-helmínticos. A escolha de cada um depende do objetivo do suinocultor (CHEEKE, 1991; JACELA et al., 2010).

Como promotores de crescimento, os antibióticos diminuem a demanda de alimentos pelos suínos em 10 a 15%, minimizando um dos maiores gastos com esses animais. Além disso, a taxa de crescimento dos porcos alimentados com suplementação de antibióticos é melhorada em 1 a 10% em comparação com os animais que se alimentam sem a suplementação (HUGHES e HERITAGE, 2004; CHATTOPADHYAY, 2014). Alguns possíveis mecanismos propostos para explicar como esses aditivos atuam na promoção ao crescimento são: inibição de infecções subclínicas, redução de metabólitos microbianos depressores de crescimento e aumento da captação de nutrientes pela parede intestinal (ANDERSON et al., 1999; GASKINS, COLLIER e ANDERSON, 2002).

Não obstante, a constatação do aumento de resistência bacteriana pelo uso dessas substâncias levou à proibição, em muitos países, do uso de promotores de crescimento em animais (MARSHALL e LEVY, 2011). No Brasil, são poucos os antibióticos permitidos para esse fim pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Avilamicina, Lincomicina, Bacitracina e Eritromicina são alguns exemplos de antimicrobianos ainda utilizados no país como aditivo alimentar para suínos (MAPA, 2016).

Para otimizar a produção sem o uso de substâncias antimicrobianas, a busca por novos elementos para suplementação alimentar tem crescido. Óleos essenciais, probióticos e prebióticos são os novos alvos de pesquisas que visam aumentar a produção sem prejudicar os animais e os consumidores (TRAESEL et al, 2011; VUONG et al., 2016).

Entre os microrganismos apresentados como probióticos, espécies de bactérias ácido lácticas têm sido sugeridas para o controle de infecções em suínos, em diferentes períodos de desenvolvimento, desde o nascimento até a fase adulta (YANG et al., 2015). As espécies de *Lactobacillus* usadas como probióticos para suínos incluem *L. acidophilus*, *L. reuteri*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. brevis*, *Lactobacillus delbreuckii* subsp. *bulgaricus*, *L. casei* e combinações de *Lactobacillus* spp. (JONSSON e CONWAY, 1992; MARE, 2009).

Muitos trabalhos de prospecção probiótica têm analisado as consequências proporcionadas pela utilização de espécies de *Lactobacillus* na saúde de suínos. O uso desse gênero como probiótico se mostrou benéfico para porcos em todas as fases de desenvolvimento, e entre os principais efeitos proporcionados por esse uso estão o aumento da imunidade intestinal, indução de forte resposta anti-inflamatória, aumento de peso, melhora e diminuição da incidência de diarreia e aumento da secreção de anticorpos, principalmente IgA no intestino dos animais (BOMBA et al., 1999; HUANG et al., 2012; SUO et al., 2012; LIU et al., 2014; WANG et al., 2014).

2. JUSTIFICATIVA

Os antibióticos têm sido amplamente usados na alimentação de animais de rebanho para promover ganho de peso e também como medida profilática. Entretanto, devido ao aumento da resistência bacteriana a antibióticos, pelo uso indiscriminado dessas drogas, existe um crescente interesse no uso de tratamentos alternativos. Entre eles, o uso de probióticos tem se mostrado eficaz na redução de mortalidade por doenças infecciosas e na melhora do desempenho animal.

Devido ao seu histórico de uso seguro e às suas propriedades promotoras de saúde, espécies do gênero *Lactobacillus* têm sido a principal escolha para uso probiótico. Entretanto, como as propriedades probióticas são linhagem-específicas, cada nova linhagem isolada deve ser testada quanto às características probióticas, que incluem: resistência e manutenção de sua viabilidade no ambiente gastrointestinal, ser segura para consumo, não ser invasiva ou patogênica, entre outras. A triagem de novas linhagens deve ser feita, inicialmente, por testes *in vitro* que simulam essas propriedades.

As linhagens probióticas normalmente são isoladas do trato gastrointestinal, principalmente de fezes de indivíduos saudáveis. Em suínos, os *Lactobacillus* são considerados membros dominantes da microbiota indígena de todo o trato gastrointestinal e são importantes no controle de infecções por microrganismos oportunistas. Apesar de estarem presentes em grandes quantidades no estômago dos animais, até o momento, não existem estudos sobre as propriedades probióticas de *Lactobacillus* de origem gástrica. Estudar as propriedades probióticas dessas linhagens seria de grande interesse para uso futuro em suínos não apenas como promotor de crescimento animal como para prevenir ou tratar doenças gástricas e intestinais.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Determinar as características probióticas *in vitro* de linhagens de *Lactobacillus* isoladas da mucosa gástrica saudável de suínos.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar as linhagens quanto à capacidade de sobreviver no trato gastrointestinal, pelos testes de resistência à acidez gástrica e aos sais biliares.
- Identificar o potencial de colonização das linhagens por meio da natureza hidrofóbica da superfície celular e formação de biofilme.
- Determinar se as linhagens têm capacidade de degradar mucina gástrica e caracterizá-las quanto à resistência a antimicrobianos, como parâmetros de segurança.
- Caracterizar as linhagens quanto à capacidade de antagonizar patógenos típicos e de interesse veterinário.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

4.1 Linhagens de *Lactobacillus* utilizadas

Em estudo anterior, foram isoladas diversas linhagens de *Lactobacillus* da mucosa gástrica (antro, corpo, *pars esophagea*) de suínos com e sem úlcera da *pars esophagea*, que foram identificadas no nível de espécie utilizando-se o sequenciamento parcial do gene que codifica o RNAr 16S bacteriano. Dentre essas linhagens, foram selecionadas, para o presente estudo, aquelas que foram isoladas de estômagos cuja mucosa gástrica não apresentava lesões macroscópicas. As culturas foram recuperadas a partir do estoque mantido a -80°C em caldo MRS (De Man, Rogosa & Sharpe, Difco, Sparks, EUA), adicionado de 30% de glicerol a 80% (v/v).

As 19 linhagens selecionadas para este estudo estão descritas no quadro 2.

Antes de cada experimento para avaliação de propriedades probióticas, as culturas, previamente congeladas, foram ativadas. Para tal, alíquotas de 100 μL das culturas foram transferidas para 5 mL caldo MRS e cultivadas em câmara de anaerobiose (Forma Scientific, Marietta, EUA) contendo atmosfera de 85% N_2 , 10% H_2 e 5% CO_2 , a 37°C por 24 a 48 horas. Em seguida, o crescimento obtido foi novamente transferido para caldo MRS e cultivado sob as mesmas condições descritas.

Quadro 2 – Linhagens selecionadas para o estudo e a região do estômago de suínos de onde foram isoladas.

Amostras	Espécies	Região do estômago
Lac1	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Antro
Lac2	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	Antro
Lac3	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Corpo
Lac4	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Antro
Lac5	<i>Lactobacillus mucosae</i>	Antro
Lac6	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Corpo
Lac7	<i>Lactobacillus vaginalis</i>	<i>Pars esophagea</i>
Lac8	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Corpo
Lac9	<i>Lactobacillus vaginalis</i>	<i>Pars esophagea</i>
Lac10	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Corpo
Lac11	<i>Lactobacillus equicursoris</i>	Antro
Lac12	<i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>Pars esophagea</i>
Lac13	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Antro
Lac14	<i>Lactobacillus mucosae</i>	Antro
Lac15	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Corpo
Lac16	<i>Lactobacillus salivarius</i>	<i>Pars esophagea</i>
Lac17	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Antro
Lac18	<i>Lactobacillus amylovorus</i>	Antro
Lac19	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Corpo

4.2 Avaliação *in vitro* do potencial probiótico de linhagens de *Lactobacillus*

4.2.1 Teste de sensibilidade ao suco gástrico artificial

Para o teste de sensibilidade ao suco gástrico foi utilizado o protocolo estabelecido no trabalho de Silva e colaboradores (2013). As culturas de *Lactobacillus* (2% v/v) foram distribuídas em dois microtubos e então lavadas duas vezes com solução salina 0,9% (p/v) por centrifugação a 13.000 rpm por 1 minuto. Ao precipitado de cada tubo foi adicionada solução salina 0,9% pH 7,0 (tubo controle) ou suco gástrico artificial (NaCl 2,0 g/L, pepsina 3.2 g/L, pH 2,5). Os microtubos foram incubados a 37°C por 2 horas e, posteriormente, centrifugados nas mesmas condições anteriores e o precipitado foi ressuspensionado em caldo MRS (Acumedia “Neogen Corporation”, Michigan, Estados Unidos). A fim de se avaliar a viabilidade das células, foram aplicados inóculos de 200µL/poço das culturas do grupo controle e do grupo desafiado com suco gástrico artificial, em triplicatas, em uma microplaca que foi incubada em um leitor ELISA (Microplate Spectrophotometer System SpectraMax 340 – Molecular Devices) a 37°C. A OD (densidade óptica) das culturas foi medida no comprimento de onda (λ) de 600nm a cada 30 minutos, durante 18 horas. A porcentagem de inibição de crescimento foi calculada pela fórmula $(CT-SG/CT) \times 100$, sendo que SG e CT correspondem à área sob a curva de crescimento das culturas bacterianas tratadas com suco gástrico artificial e com solução salina (controle), respectivamente.

As linhagens de *Lactobacillus* foram classificadas como sensíveis, quando o tratamento com o suco gástrico artificial levou a uma inibição de crescimento das amostras maior que 60% em relação ao controle, tolerantes, quando a inibição ficou entre 40 e 60% e resistentes, quando a inibição foi inferior a 40%.

4.2.2 Teste de sensibilidade a sais biliares

Para o teste de sensibilidade a sais biliares foi utilizado o protocolo estabelecido no trabalho de Walker e Gilliland (1993), adaptado para microplacas. Foram preparados inóculos das amostras a 2% v/v em caldo MRS puro (controle) (Acumedia “Neogen Corporation”, Michigan, Estados Unidos) ou MRS suplementado com 0,3% de sais biliares (Oxgall, Difco, Sparks, E.U.A). A fim de se avaliar a viabilidade das células, foram aplicados inóculos de 200 µL/poço do grupo controle e do grupo desafiado com sais biliares, em triplicata, em uma microplaca que foi incubada em um leitor ELISA (Microplate Spectrophotometer System SpectraMax 340 – Molecular Devices) a 37°C. A absorbância do cultivo foi determinada pela leitura em $\lambda = 600$ nm a cada 30 minutos, durante 18 horas, e a porcentagem de inibição de crescimento foi calculada pela fórmula $(CT-SB/CT) \times 100$, sendo que SB e CT correspondem à área sob a curva de crescimento das bactérias tratadas com sais biliares e do controle, respectivamente. As linhagens de *Lactobacillus* foram classificadas como sensíveis, quando a inibição de crescimento pelos sais biliares foi maior que 60% em relação ao controle, tolerantes, quando a inibição ficou entre 40 e 60% e resistentes, quando a inibição foi inferior a 40%.

4.2.3 Teste de avaliação da degradação de mucina gástrica

O teste para verificar a degradação de mucina gástrica pelas linhagens foi realizado pelo método descrito por Zhou e colaboradores (2001), em triplicata. Foram preparados inóculos das amostras de *Lactobacillus* a 2% v/v. Placas contendo o meio LB (*Luria-Bertani* broth; Acumedia), com adição de 0,5% de hog mucina gástrica (HGM; Sigma) e 1,5% (p/v) de agarose tipo I-A (Sigma) foram preparadas e uma gota de 5 µL de cada amostra foi inoculada em pontos específicos da placa de forma a permanecer como um *spot* definido, e incubados a 37°C por 72 horas em anaerobiose. Para o controle positivo, foram aplicados 5 µL de cultura (2% v/v) de *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) e de *Shigella flexneri* (ATCC 12022). Após o crescimento, as placas foram recobertas com 0,1% amido black (Sigma) por 30 minutos. Após esse tempo, o resíduo foi todo retirado, com

auxílio de uma pipeta, e ácido acético 1,2M foi adicionado à superfície do meio até a observação da formação de um halo ao redor dos spots dos controles positivos. As amostras foram consideradas positivas quando houve produção halo de degradação.

4.2.4 Teste de hidrofobicidade da superfície celular

A hidrofobicidade da superfície celular bacteriana foi avaliada pela medida de adesão a solventes (MATS - *Microbial Adhesion to Solvents*) usando xileno como solvente apolar (Pelletier et al., 1997; Kos et al., 2003). As culturas de *Lactobacillus* foram centrifugadas, lavadas duas vezes e a turbidez foi ajustada para uma OD de 0,5 a 0,9 em $\lambda = 600 \text{ nm}$, com 1mL de uma solução de KNO_3 0,1M, pH 6.2 (A_0). Um volume de 0.2 ml de xileno foi adicionado a 3,6 ml da suspensão microbiana e após 10 minutos de pré-incubação à temperatura ambiente, as duas fases do sistema foram homogeneizadas por 2 minutos em vórtex. A fase aquosa foi removida após 50 minutos de repouso e sua OD foi medida (A_1) em $\lambda = 600 \text{ nm}$. O experimento foi feito em triplicata.

A porcentagem de MATS foi calculada segundo a fórmula $(A_0 - A_1 / A_0) \times 100$. As culturas de *Lactobacillus* com %MATS maior que 66% foram consideradas hidrofóbicas; aquelas com %MATS entre 33% e 66% foram consideradas moderadamente hidrofóbicas e aquelas com %MATS menor que 33% foram classificadas como hidrofílicas.

4.2.5 Ensaio de produção de biofilme

O teste para verificar a produção de biofilme pelas linhagens de *Lactobacillus* foi realizado de acordo com o protocolo de Dubravka e colaboradores (2010), em quadruplicata. As culturas de *Lactobacillus*, previamente ativadas, foram diluídas para 5% (v/v). O volume de 200 μL de cada cultura foi inoculado em poços de uma placa de 96 poços (similar à de ELISA). Como controle negativo, foi usado caldo

MRS puro e, como controle positivo, uma linhagem de *Lactobacillus* (LIS14S1), caracterizada por ser uma produtora moderada de biofilme, em um estudo anterior do grupo. A placa foi incubada a 37°C por 72 horas em anaerobiose. Após a incubação, a placa foi vertida em uma pilha de toalhas de papel para descartar o meio e lavada 3 vezes com PBS estéril. Em seguida, 200 µL de cristal violeta 0,1% foram adicionados a cada poço e a placa incubada em temperatura ambiente durante 30 minutos. O corante foi, então, descartado e a placa lavada 3 vezes com água destilada estéril e deixada na estufa de 37°C para secar por 30 minutos. Após a secagem, 200 µL de solução de ácido acético 30% foi adicionado em cada poço para dissolver os resíduos de corante. Cento e trinta e cinco microlitros da solução de corante com ácido acético foram transferidos para outra microplaca e a OD foi medida a 570 nm.

Os resultados foram obtidos de acordo com a classificação proposta por Dubravka e colaboradores (2010). O valor de *cut-off* foi calculado pela média e desvio padrão dos valores das quatro leituras do controle negativo. A linhagem foi classificada como: não produtora de biofilme, quando a OD da amostra foi menor ou igual ao *Cut-off*; fraca produtora de biofilme, quando a OD da amostra foi maior que o valor do *Cut-off*, porém, menor que duas vezes o valor do *Cut-off*; moderada produtora de biofilme, quando a OD da amostra foi maior que duas vezes o valor do *Cut-off*, porém, menor que quatro vezes que o valor do *Cut-off*; e forte produtora de biofilme: quando a OD da amostra foi quatro vezes maior do que o valor do *Cut-off*.

4.2.6 Teste de antagonismo

O teste para verificar a produção *in vitro* de substâncias inibitórias difusíveis foi realizado pelo método de difusão em camada dupla, de acordo com o trabalho de Nardi e colaboradores (1999), em duplicata. Seis linhagens bacterianas consideradas patógenos típicos - *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115), *Staphylococcus aureus* (ATCC 33591), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (ATCC 14028), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883); e duas linhagens multirresistentes isoladas de pacientes hospitalizados, *Acinetobacter baumannii*

(ATCC 19606) e *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC 29), estas duas gentilmente cedidas pelo Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios – UFMG, foram usadas como reveladoras. Elas foram ativadas com inóculo de 2% v/v e crescidas a 37°C durante 18 horas em caldo BHI (Brain Heart Infusion) (Acumedia Neogen Corp., Lansing, Estados Unidos).

Placas contendo ágar MRS (Acumedia Neogen Corporation, Lansing, E.U.A) foram preparadas e incubadas durante 12 horas a 37°C para secagem. Uma gota de 5µL de cada amostra de *Lactobacillus* a ser testada foi inoculada em pontos específicos da placa de forma a permanecer como um *spot* definido e as placas incubadas por 48 horas em anaerobiose (85% de N₂, 10% de H₂ e 5% de CO₂) a 37°C.

Para interromper a multiplicação microbiana, as placas com os *spots* de *Lactobacillus* foram expostas ao vapor de clorofórmio por 30 minutos. Em seguida, elas foram abertas pelo mesmo tempo, para evaporação do solvente residual. Uma sobrecamada de 3,5 mL de meio BHI semissólido (ágar bacteriológico 0,75% p/v), inoculado com 10µL da cultura bacteriana reveladora, foi espalhada pelo ágar MRS. As placas foram incubadas a 37°C por 24 a 48 horas, em aerobiose, e os halos de inibição foram medidos com paquímetro digital (Mitutoyo, Japão). As amostras foram consideradas produtoras de substâncias antagonistas quando houve nítido halo de inibição de crescimento da bactéria reveladora, independentemente do seu tamanho.

4.2.7 Antibiograma

O teste de antibiograma foi determinado pelo método de difusão em meio sólido utilizando-se discos impregnados com antimicrobianos, em duplicata. A partir da cultura das amostras de *Lactobacillus* em ágar MRS, incubadas a 37°C por 24 a 48 horas, em anaerobiose, foram preparadas suspensões de cada amostra em solução salina 0,9% (p/v), esterilizada, até atingir a turbidez equivalente a 0,5 da escala de Mac Farland, correspondente a cerca de 10⁸ UFC/mL. Alíquotas de 0,1mL das suspensões bacterianas foram, então, semeadas em ágar MRS, com o auxílio

de um *swab* estéril. Discos impregnados com os antibióticos a serem testados foram dispostos nas placas de forma equidistante e as placas foram incubadas a 37°C por 24 a 48 horas, em aerobiose. A medida dos halos de inibição foi feita com paquímetro digital (Mitutoyo, Japão). Os antibióticos testados foram: Clindamicina 2 µg, Claritromicina 15 µg, Tetraciclina 30 µg, Ampicilina 10 µg, Gentamicina 10 µg, Eritromicina 15 µg, Estreptomicina 10 µg, Cloranfenicol 30 µg, Bacitracina 10 µg, Penicilina G 10U, Amoxicilina 10 µg, Vancomicina 30 µg, Norfloxacino 10 µg, Rifampicina 5 µg e Ácido Nalidíxico 30 µg. Cultura de *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) foi usada como controle.

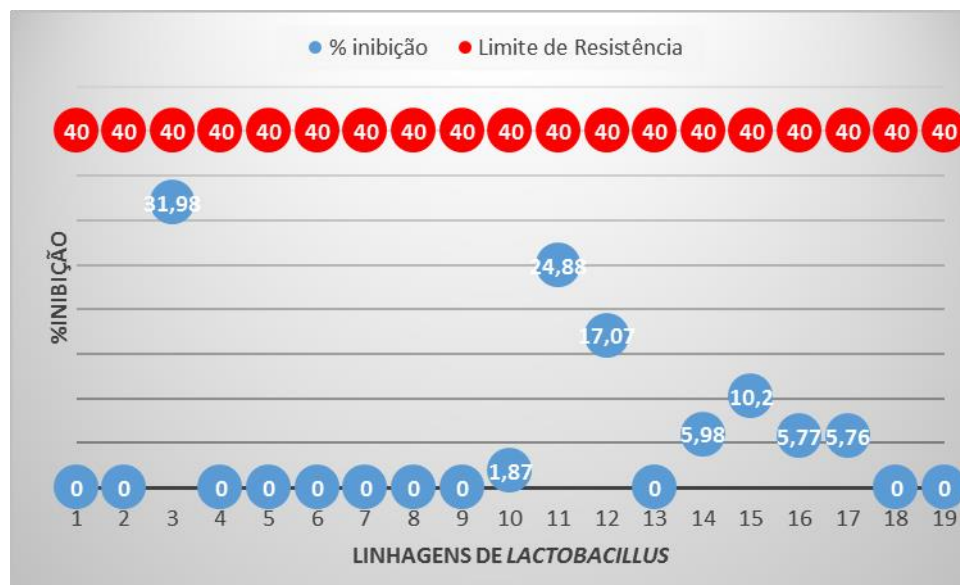
Para cada antimicrobiano testado, os microrganismos foram classificados como sensível, moderadamente sensível ou resistente de acordo com os pontos de corte de medida de halo sugeridos por Charteris e colaboradores (1998).

5. RESULTADOS

5.1 Teste de sensibilidade ao suco gástrico artificial

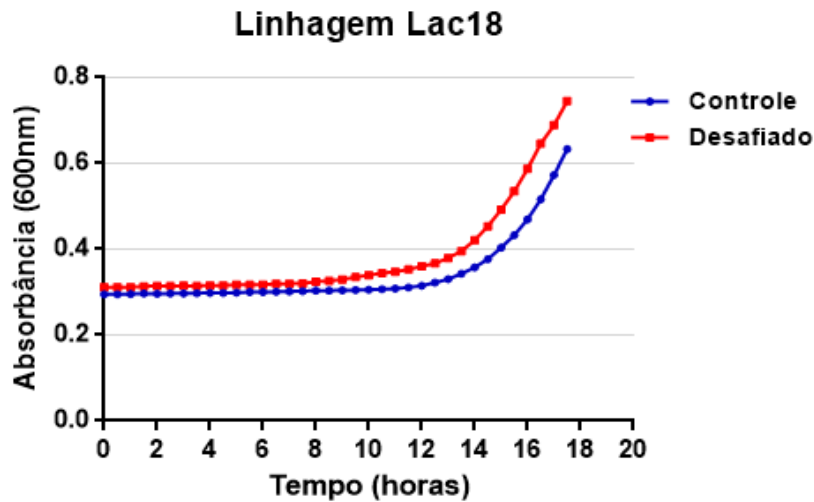
Das 19 linhagens de *Lactobacillus* testadas, todas foram resistentes ao suco gástrico (inibição de crescimento inferior a 40%), sendo que 11 delas apresentaram 0% de inibição. O gráfico da figura 2 exibe a porcentagem de inibição de crescimento para cada amostra.

Figura 2: Porcentagem de inibição de crescimento de amostras de *Lactobacillus* no teste de tolerância ao suco gástrico artificial.



O comportamento típico verificado entre as 11 linhagens que tiveram 0% de inibição pelo suco gástrico é ilustrado na figura 3, que mostra um crescimento ligeiramente superior na linhagem submetida ao suco gástrico, em relação ao seu controle (sem tratamento).

Figura 3: Curvas de crescimento da amostra Lac18 após exposição ao suco gástrico (em vermelho) e sem o tratamento com o suco gástrico (em azul).



5.2 Teste de sensibilidade a sais biliares

Quanto à sensibilidade aos sais biliares, uma amostra foi classificada como resistente, 11 como tolerantes e 7 como sensíveis. A figura 4 apresenta a porcentagem de inibição de cada amostra. O gráfico da figura 5 apresenta o comportamento típico de crescimento de uma amostra tolerante aos sais biliares na presença e na ausência de oxgall 0,3%, onde pode-se observar um crescimento menor da linhagem tratada em comparação com a linhagem sem tratamento (controle).

Figura 4: Porcentagem de inibição de linhagens de *Lactobacillus* no teste de sensibilidade a sais biliares.

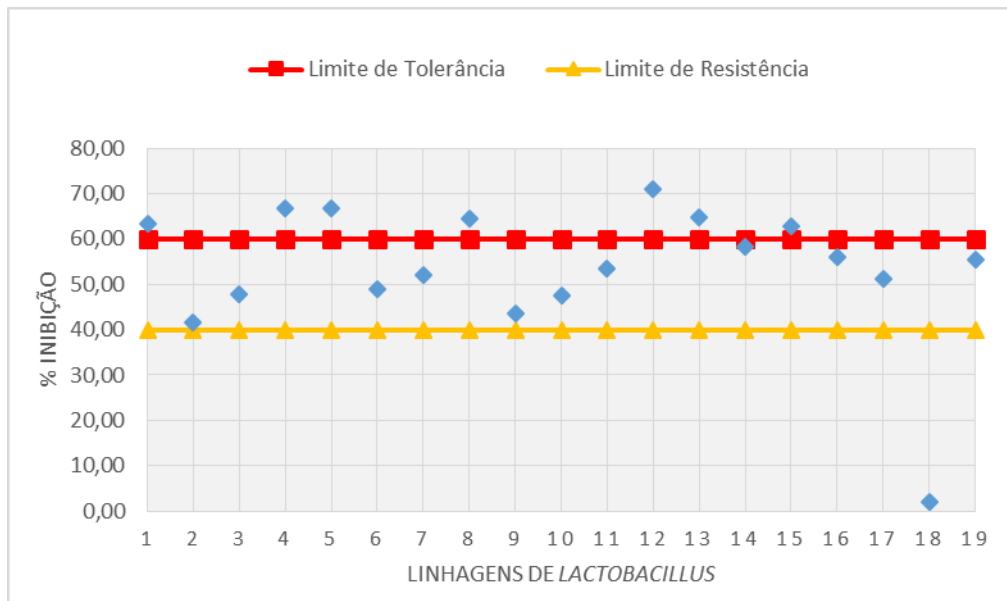
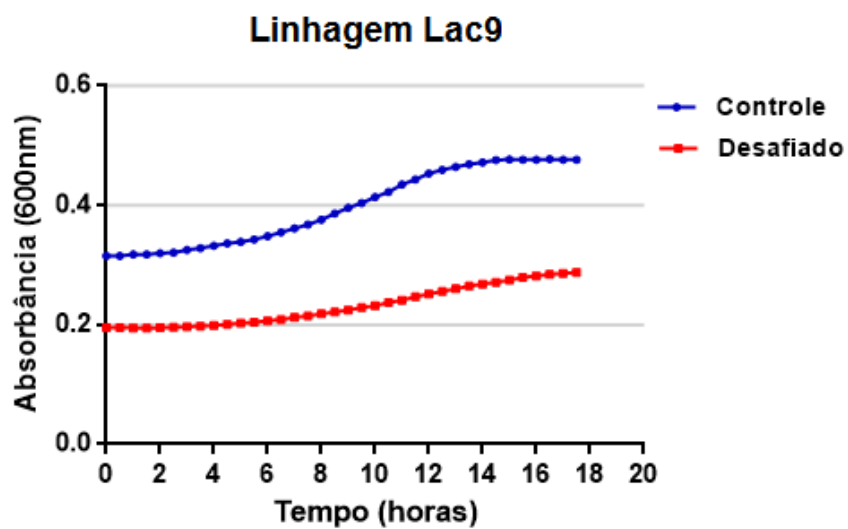


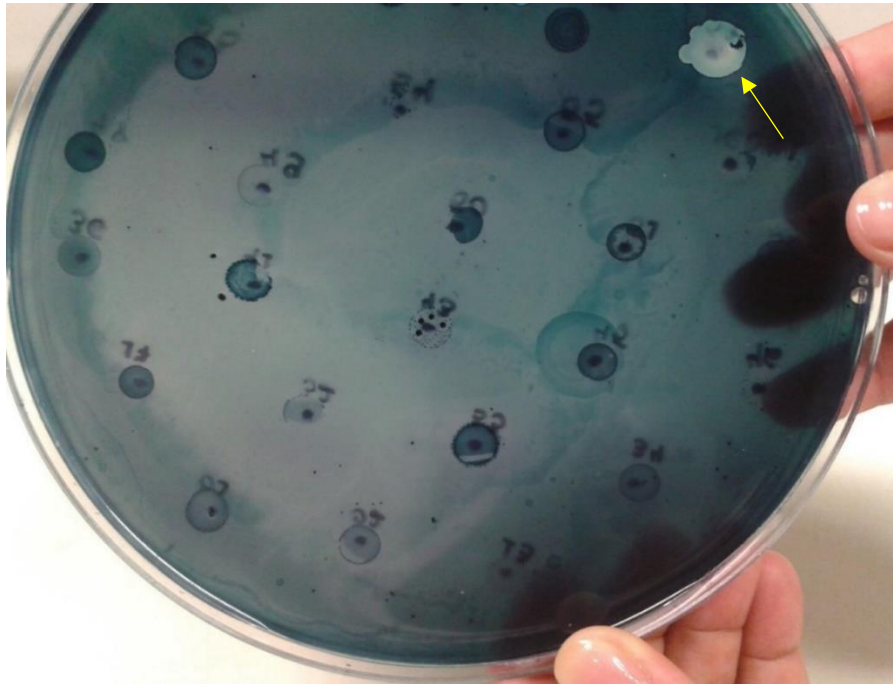
Figura 5: Curvas de crescimento da amostra Lac9 na presença (em vermelho) e ausência (em azul) de oxgall 0,3%.



5.4 Teste de avaliação da degradação de mucina gástrica

Nenhuma das amostras testadas apresentou halo de degradação, portanto, foram consideradas negativas (Figura 6). As amostras do controle positivo (*Salmonella* Typhimurium e *Shigella flexineri*) produziram halos de degradação nítidos.

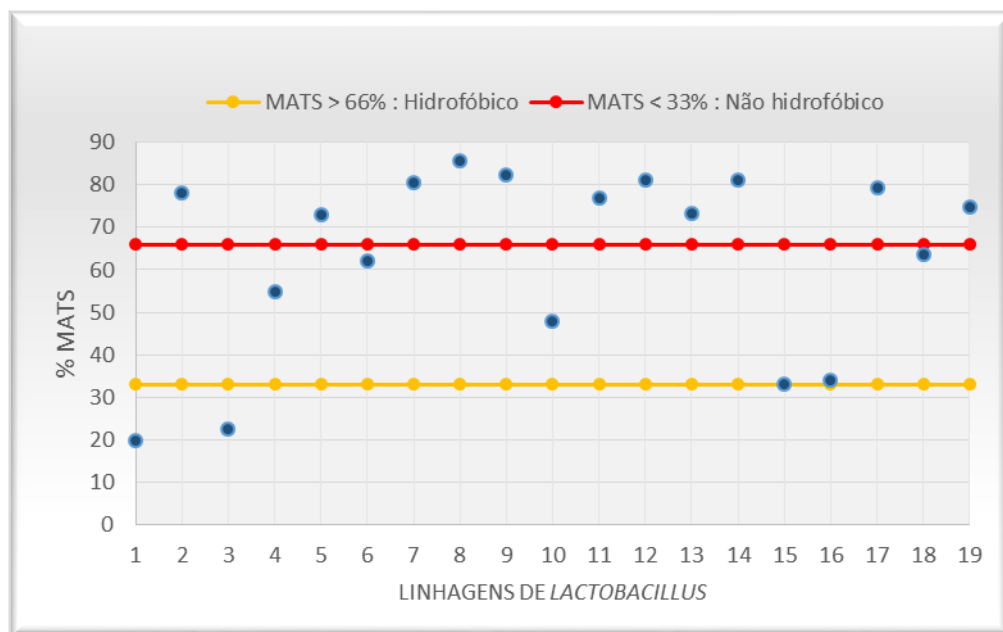
Figura 6: Teste de degradação da mucina gástrica, mostrando ausência de halos (ausência de degradação de mucina) nas linhagens de *Lactobacillus*. A seta amarela mostra o halo produzido por *Shigella flexineri* (controle positivo).



5.5 Teste de hidrofobicidade de superfície celular

Onze das 19 linhagens foram consideradas hidrofóbicas; seis linhagens apresentaram-se moderadamente hidrofóbicas; e duas amostras apresentaram superfície celular não hidrofóbica. A figura 7 mostra o resultado de cada amostra.

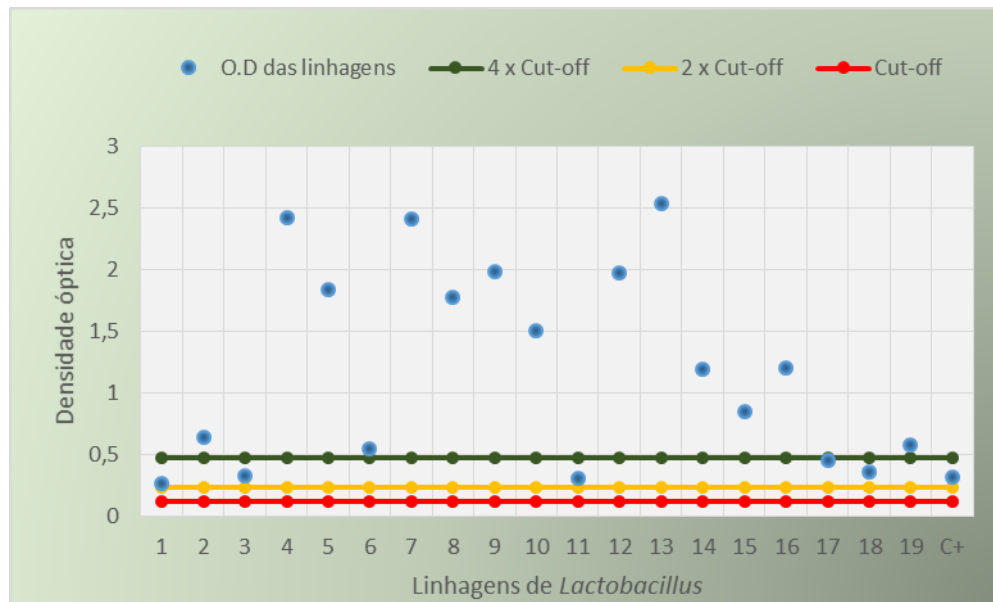
Figura 7: Porcentagem de MATS (*Microbial Adesion To Solvents*) de linhagens de *Lactobacillus*.



5.6 Ensaio de produção de biofilme

Todas as linhagens estudadas no presente trabalho foram produtoras de biofilme, sendo 14 delas fortes produtoras de biofilme, e cinco linhagens produtoras moderadas. O controle positivo (C+), produtor moderado, se comportou de forma esperada, tendo valor de *cut-off* entre 2 e 4 vezes o *cut-off*. A figura 8 apresenta os resultados do ensaio de produção de biofilme.

Figura 8: Produção de biofilme por linhagens de *Lactobacillus*.



5.7 Teste de antagonismo

As amostras apresentaram perfis variados de antagonismo, revelado pela presença de halos de inibição (tabela 1). A maioria das amostras (treze) exibiram atividade antagonista contra *Salmonella Typhimurium*. Apenas duas linhagens de *Lactobacillus* antagonizaram *Listeria monocytogenes*. Dentre as amostras, somente uma (Lac6), apresentou atividade antagonista contra todos os patógenos. A figura 9 ilustra a formação de halos de inibição por duas linhagens de *Lactobacillus* contra *Salmonella Typhimurium*. As medidas dos halos de inibição das amostras são apresentadas no anexo 1.

Figura 9: Halos de inibição de crescimento de *Salmonella* por duas linhagens de *Lactobacillus*.



Tabela 1: Atividade antagonista das amostras de *Lactobacillus*, representada pela produção (+) ou não (-) de halo de inibição, contra bactérias reveladoras.

Amostras	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	KPC	% de antagonismo*
Lac1	+	+	-	+	+	+	+	+	87
Lac2	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Lac3	+	-	-	+	+	+	+	+	75
Lac4	+	+	-	+	+	+	-	+	75
Lac5	-	-	-	-	-	-	-	+	12
Lac6	+	+	+	+	+	+	+	+	100
Lac7	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Lac8	+	+	-	+	+	-	+	+	75
Lac9	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Lac10	+	-	-	-	-	-	-	-	12
Lac11	+	+	-	-	+	-	-	-	37
Lac12	+	+	-	+	+	+	+	+	87
Lac13	+	+	-	-	+	-	-	-	37
Lac14	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Lac15	+	-	-	+	+	+	+	+	75
Lac16	+	-	-	+	+	+	+	+	75
Lac17	+	-	-	+	+	-	+	+	62
Lac18	-	+	+	+	-	-	-	-	37
Lac19	+	+	-	+	+	+	+	+	87

*Porcentagem calculada usando-se o número de amostras reveladoras antagonizadas sobre o total de reveladoras testadas (n = 8)

5.8 Antibiograma

O perfil de susceptibilidade das linhagens de *Lactobacillus* aos antimicrobianos é apresentado na tabela 2. Os resultados de Lac2, Lac9 e Lac18 não foram obtidos, porque estas amostras não foram capazes de crescer em aerobiose. Das 16 amostras com resultados, 100% foram resistentes à Tetraciclina, ao Norfloxacino e ao Ácido Nalidíxico. Com exceção da Lac11, todas as linhagens mostraram resistência à Vancomicina e sensibilidade à Rifampicina. A figura 10 ilustra o antibiograma de uma linhagem de *Lactobacillus*.

O controle apresentou o perfil previsto, validando o teste.

Figura 10: Antibiograma de uma linhagem de *Lactobacillus*, ilustrando os halos de inibição a antibióticos.



Tabela 2: Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos das linhagens de *Lactobacillus*.

Amostra	CLI	CLA	EST	ERI	GEN	BAC	VAN	NOR	TET	RIF	AMP	AMO	CLO	NAL	PEN	%*
Lac1	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	S	R	R	MS	67
Lac3	R	R	R	R	S	MS	R	R	R	S	S	S	S	R	R	60
Lac4	S	S	R	S	S	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	60
Lac5	S	S	R	S	S	R	R	R	R	S	R	R	MS	R	R	60
Lac6	R	S	R	R	S	S	R	R	R	S	S	S	R	R	R	60
Lac7	S	S	R	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	R	R	40
Lac8	S	S	R	S	S	R	R	R	R	S	MS	R	S	R	R	53
Lac10	S	S	R	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	40
Lac11	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	87
Lac12	S	R	R	R	S	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	67
Lac13	S	S	MS	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	R	MS	33
Lac14	S	S	R	S	S	R	R	R	R	S	S	MS	S	R	R	47
Lac15	S	S	R	S	S	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	60
Lac16	S	S	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	60
Lac17	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	S	R	S	R	R	40
Lac19	S	S	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	67

Legenda: Cli (Clindamicina 2 µg), Cla (Claritromicina 15 µg), Est (Estreptomicina 10 µg), Eri (Eritromicina 15 µg), Gen (Gentamicina 10 µg), Bac (Bacitracina 10 µg), Van (Vancomicina 30µg), Nor (Norfloxacino 10 µg), Tet (Tetraciclina 30 µg), Rif (Rifampicina 5 µg), Amp (Ampicilina 10 µg), Amo

(Amoxicilina 10 µg), Clo (Cloranfenicol 30 µg), Nal (Ácido Nalidíxico 30 µg) e Pen (Penicilina G 10U). As amostras foram classificadas como S (sensível), MS (moderadamente sensível) e R (resistente). *Porcentagem calculada com o número de antibióticos para os quais as amostras foram resistentes sobre o total de antibióticos testados (n = 15)

A tabela 3 apresenta um resumo dos principais resultados obtidos nos testes *in vitro* para avaliação de características probióticas das linhagens de *Lactobacillus*.

Tabela 3 – Resumo dos resultados dos testes *in vitro* para caracterização probiótica.

Amostras	Resistência ao suco gástrico	Ausência de mucinase	Resistência aos sais biliares	Hidrofobicidade	Produção de biofilme	Antagonismo (% de reveladoras antagonizadas*)
Lac1	Sim	Sim	Não	Não	Moderada	87%
Lac2	Sim	Sim	Tolerante	Sim	Sim	0%
Lac3	Sim	Sim	Tolerante	Não	Moderada	75%
Lac4	Sim	Sim	Não	Moderada	Sim	75%
Lac5	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	0%
Lac6	Sim	Sim	Tolerante	Moderada	Sim	100%
Lac7	Sim	Sim	Tolerante	Sim	Sim	0%
Lac8	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	75%
Lac9	Sim	Sim	Tolerante	Sim	Sim	0%
Lac10	Sim	Sim	Tolerante	Moderada	Sim	12%
Lac11	Sim	Sim	Tolerante	Sim	Moderada	37%
Lac12	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	87%
Lac13	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	37%
Lac14	Sim	Sim	Tolerante	Sim	Sim	0%
Lac15	Sim	Sim	Não	Moderada	Sim	75%
Lac16	Sim	Sim	Tolerante	Moderada	Sim	75%
Lac17	Sim	Sim	Tolerante	Sim	Moderada	62%
Lac18	Sim	Sim	Sim	Moderada	Moderada	37%
Lac19	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	87%

A gradação de cor azul indica os resultados que foram considerados desejáveis (destacados em azul escuro), intermediários (em azul claro), e aqueles não desejáveis (azul mais claro).

*Porcentagem calculada pelo número de bactérias reveladoras antagonizadas, num total de 8 reveladoras. A linhagem marcada em negrito (Lac6) foi a que apresentou maior quantidade de características desejáveis.

Não foram incluídos os resultados do antibiograma

6. DISCUSSÃO

A realização de uma prospecção probiótica requer a identificação das linhagens no nível de gênero e espécie e de seus efeitos probióticos específicos, por meio de testes *in vitro* e *in vivo*, uma vez que esses podem variar de linhagem para linhagem (GAREAU, SHERMAN e WALKER, 2010). Essas informações são importantes especialmente para que a linhagem possa ser associada a um efeito específico para a saúde de seu hospedeiro e para permitir estudos epidemiológicos e de vigilância mais acurados (FAO/WHO, 2002).

Os ensaios *in vitro*, apesar de sua maior arbitrariedade e dificuldade de interpretação dos resultados, são indispensáveis para a descoberta de novos probióticos, principalmente devido ao seu baixo custo e à possibilidade de triagem de muitas linhagens ao mesmo tempo. Uma triagem *in vitro* acurada é essencial para a redução do número de linhagens que serão avaliadas *in vivo*, por questões éticas no uso de animais e pelo elevado custo dos testes (PAPADIMITRIOU et al., 2015).

Um microrganismo, para ser considerado probiótico, deve sobreviver às condições hostis impostas pelo organismo hospedeiro de tal maneira que consiga atravessar o trato digestivo e se multiplicar no seu sítio de ação (HOLZAPPEL et al., 1998; KLEIN et al., 1998). O estômago age como um filtro ecológico, sendo a acidez gástrica um fator chave na regulação da diversidade e composição de toda a comunidade microbiana do trato gastrointestinal. Além da acidez gástrica, a presença de enzimas proteolíticas e a presença de bile no intestino delgado são importantes barreiras contra infecções por microrganismos exógenos ingeridos com os alimentos. A triagem inicial para a caracterização probiótica avalia a capacidade das linhagens em manter sua viabilidade ao passar por essas barreiras sob condições simuladas do trato gastrointestinal (VERTZONI et al.; LAVERMICOCCA et al., 2008; BEJAR et al., 2011).

O teste de sobrevivência ao ácido foi desenvolvido para simular as condições do estômago humano (SILVA et al., 2013), entretanto, é também apropriado para simular as condições encontradas no trato digestivo de suínos, pois o estômago de porcos, após o desmame, apresenta pH luminal entre 2,0 e 3,5 e tempo de contato

do alimento com o ácido clorídrico em torno de duas horas, apresentando condições semelhantes ao dos seres humanos (CHAMONE et al., 2011).

Devido à origem das amostras testadas no presente trabalho, era esperado que elas se mostrassem resistentes ao suco gástrico artificial (pH 2,5), pois os microrganismos que se estabelecem nesse local devem ser capazes de resistir não apenas transitoriamente ao meio ácido, mas ter estratégias específicas para colonizar o epitélio gástrico (MARTINSEN, BERGH e WALDUM, 2005; BEASLEY et al., 2015). É provável que essas linhagens tenham, inclusive, um aparato enzimático adaptado a esse local, possuindo resistência intrínseca ao suco gástrico (RYAN et al., 2008). Essa adaptação pode ser ilustrada pela observação de que mais da metade das linhagens mostraram um crescimento de 100% na presença de suco gástrico, sendo o crescimento até ligeiramente superior ao crescimento do controle.

Além do teste de tolerância ao suco gástrico, como os probióticos são normalmente usados para tratar infecções intestinais e é necessário que eles atinjam o intestino, a avaliação de sobrevivência no hospedeiro também inclui o ensaio de tolerância aos sais biliares, como requisito para a linhagem ser classificada como probiótica (PATEL et al., 2010).

A bile, secretada pelos hepatócitos, possui em sua composição grandes quantidades de sais biliares e, em menor proporção, bilirrubina, colesterol, lecitina e eletrólitos. Os sais biliares reprimem o crescimento bacteriano no intestino delgado por meio, principalmente, da dissolução das membranas celulares que são formadas por lipídios e ácidos graxos. Alguns microrganismos, como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Enterococcus* e *Bacteroides*, são capazes de produzir enzimas que hidrolisam os sais biliares, reduzindo sua toxicidade (BATEUP et al., 1995; FRANZ et al., 2001; KIM, YI e LEE, 2004; BEGLEY, HILL e GAHAN, 2006). Entretanto, nem todas as linhagens de *Lactobacillus* são capazes de desenvolver mecanismos de defesa contra os sais biliares. Por exemplo, um estudo com espécies de *Lactobacillus* isoladas do estômago de seres humanos mostrou que essas eram pouco resistentes ao desafio com sais biliares, sendo, a maioria, tolerantes ou sensíveis (RYAN et al., 2008). Esse resultado foi semelhante ao nosso, já que o número de linhagens resistentes foi bem pequeno (apenas uma linhagem). Entretanto, a maioria das nossas amostras se mostrou tolerante (58%). Linhagens gástricas provavelmente são menos expostas aos sais biliares, pois a bile é

secretada no duodeno, fluindo para o estômago apenas em casos de refluxo duodeno-gástrico (RYAN et al., 2008).

Outra barreira do hospedeiro contra invasão microbiana é a produção de muco, que é constantemente secretado pelas células epiteliais do trato gastrointestinal, e contém diversas moléculas antimicrobianas não específicas e imunoglobulinas que limitam o crescimento microbiano (JOHANSSON, LARSSON e HANSSON, 2011; BANSIL et al., 2013). O muco é também a principal barreira de proteção das células gástricas contra os efeitos deletérios do ácido luminal do estômago. O muco consiste em duas camadas, uma camada interna e uma externa que pode ser facilmente removida. É constituído principalmente por água e glicoproteínas de alto peso molecular denominadas mucinas, que são responsáveis por dar uma característica viscosa ao muco (ATUMA et al., 2001; DERRIEN et al., 2010; MCGUCKIN et al, 2011).

A produção de enzimas que degradam a mucina é considerada um fator de virulência bacteriano associado à invasão do hospedeiro, além de facilitar a penetração de substâncias tóxicas na mucosa (ZHOU et al., 2001), e é descrita para vários enteropatógenos típicos, incluindo *Vibrio cholerae*, *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica* (COLINA et al., 1996), além de serem produzidas também pela bactéria gástrica *Helicobacter pylori*. O ensaio de degradação da mucina gástrica é um teste de segurança para a caracterização de linhagens probióticas, não sendo desejado que probióticos produzam mucinases.

Todas as linhagens de *Lactobacillus* avaliadas no presente estudo se mostraram seguras por não apresentarem atividade mucinolítica, em oposição às linhagens de *Shigella* e *Salmonella*, utilizadas como controle positivo, que foram as únicas a produzir halo de degradação.

O ensaio de degradação de mucina tem uma metodologia muito simples, sendo necessário, para sua execução, apenas mucina gástrica, um meio de cultura sem a presença de açúcar em sua composição (para que haja indução de degradação da mucina pelas linhagens produtoras de mucinase) e amido black, como revelador da degradação. Entretanto, o teste não é empregado com frequência na triagem de linhagens probióticas. Provavelmente, isso se deve ao fato de o teste não ser um requisito exigido pelas agências reguladoras. Uma vez que a agência FAO (2002) recomenda o desenvolvimento de novos procedimentos para

avaliar função e segurança dos probióticos, seria interessante que o teste de degradação de mucina fosse sempre incluído, por acrescentar uma característica importante de segurança e pela facilidade de execução.

A hidrofobicidade da superfície celular bacteriana é um indicador de que o microrganismo tem capacidade de aderir às células epiteliais, dificultando a sua eliminação imediata por peristaltismo e facilitando a formação de biofilme (GRIVET et al., 2000; KOS et al., 2003; TAHMOURESPOUR et al., 2008).

O teste é um dos requisitos para a seleção de linhagem probiótica e, neste trabalho, a hidrofobicidade foi avaliada pela Adesão Microbiana a Solventes (MATS) utilizando o solvente apolar xileno. Quanto maior a afinidade com o solvente, mais hidrofóbica é a superfície celular (PELLETIER et al., 1997; KOS et al., 2003).

Estudos mostraram que a hidrofobicidade da parede celular é uma característica comum entre espécies de *Lactobacillus* (PELLETIER et al., 1997; GONG et al., 2012; POLAK-BERECKA et al., 2014). Nossos resultados corroboram a literatura e mostram haver uma predominância (58%) de linhagens com superfície celular hidrofóbica.

Biofilmes são comunidades de células unidas entre si a uma superfície por uma matriz extracelular polissacarídica (MAH e TOOLE, 2001). A habilidade de produzir biofilme está associada à capacidade de adesão das linhagens, já que é preciso aderir a uma superfície para formar o biofilme (JONES e VERSALOVIC, 2009). Nossos resultados mostraram que a maioria (74%) das amostras de *Lactobacillus* foi forte produtora de biofilme, sendo, o restante, produtoras moderadas. As amostras que foram fortes produtoras de biofilme apresentaram também superfície hidrofóbica celular, duas características desejáveis para um bom probiótico.

A produção de substâncias antimicrobianas por linhagens candidatas a probióticos também constitui um importante critério de seleção (CHANG et al., 2001; BRASHEARS, JARONI e TRIMBLE, 2003; GUO et al., 2010). Na técnica utilizada para testar a capacidade antagonista das linhagens de *Lactobacillus*, as amostras são semeadas num único ponto do ágar (*spots*) para que a produção de substâncias antagonistas, se presente, seja visível ao redor de seu crescimento. As bactérias reveladoras (normalmente patógenos típicos) são semeadas por meio de uma sobre

camada de ágar semissólido, gerando um crescimento contínuo e, dessa forma, revelando a produção de substâncias difusíveis, pelo aparecimento de halo de inibição de crescimento ao redor dos spots. O halo de inibição deve ser nítido e transparente para que a linhagem seja considerada antagonista do patógeno (NARDI et al., 1999; SOUZA et al., 2013).

O ensaio de antagonismo foi realizado não apenas com bactérias de interesse veterinário, como *Listeria monocytogenes* e *Salmonella typhimurium*, mas também foram usadas linhagens de patógenos típicos, tais como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* e amostras clínicas de espécies multirresistentes a antimicrobianos (KPC e *Acinetobacter baumannii*).

Os resultados foram bem variados em relação à produção de substâncias antagonistas pelas linhagens de *Lactobacillus*. A variação ocorreu num espectro desde ausência de inibição do crescimento de todas as reveladoras avaliadas, para algumas linhagens de *Lactobacillus*, até a inibição de todas elas, no caso de uma linhagem específica de *L. reuteri*, a Lac6.

O teste de antagonismo é um dos testes que mais ilustra as variações de ação probiótica entre linhagens e talvez, apesar de suas limitações, seja o ensaio de maior peso na escolha das amostras que serão selecionadas para os testes seguintes, pois sabe-se que a produção de substância antagonista *in vitro* não garante sua produção *in vivo*. É importante lembrar também que o fato de uma linhagem não produzir substância antagonista *in vitro* não significa que ela não produza substância antagonista no trato gastrointestinal do hospedeiro ou que possa antagonizar patógenos por outras vias (MARTINS et al., 2010).

As variações nos resultados de antagonismo entre as amostras de *Lactobacillus* foram grandes não apenas no número de patógenos antagonizados, como também nos tipos de patógenos, mesmo entre linhagens da mesma espécie. Por exemplo, a linhagem Lac6, que foi considerada a mais promissora para uso probiótico, pertence à espécie *L. reuteri*. Alguns trabalhos descrevem o amplo espectro antimicrobiano de linhagens de *L. reuteri* devido à sua capacidade de produzir substâncias antagonistas, como a reuterina, que contribui para a habilidade de linhagens dessa espécie em inibir patógenos tanto Gram positivos quanto Gram negativos (CASAS E DOBROGOSZ, 2000; GÄNZLE et al., 2000; SPINLER et al., 2008). Entretanto, confirmamos aqui que o simples fato de pertencer à espécie *L.*

reuteri não é suficiente para predizer se a bactéria tem potencial probiótico, uma vez que, dentre as linhagens pertencentes à espécie, apenas a Lac6 mostrou espectro antagonista contra todas as reveladoras, enquanto as outras linhagens mostraram antagonismo variando de 1 a 7 bactérias reveladoras.

Muitas das linhagens avaliadas também mostraram ação antagonista contra linhagens multirresistentes, sendo 9 delas capazes de antagonizar tanto *Acinetobacter baumannii* quanto KPC. É provável que as substâncias antagonistas produzidas pelos *Lactobacillus* tenham ação diferente dos antibióticos para os quais essas bactérias são resistentes. Esse é um resultado empolgante, pela possibilidade de tratamento alternativo dessas infecções com probióticos, uma vez que infecções por microrganismos multirresistentes são um problema grave que vem aumentando ao longo dos anos e que pode levar à morte do paciente pela ausência de tratamento (NADERI et al., 2014).

Genes de resistência a antibióticos também podem ser encontrados em bactérias pertencentes à microbiota normal de um hospedeiro ou mesmo em microrganismos candidatos a probióticos. Por isso, a FAO recomenda o antibiograma de linhagens probióticas, pois existe o risco de que o microrganismo selecionado possa servir de reservatório de genes de resistência a antibióticos com potencial de transmissão a bactérias potencialmente patogênicas em determinado ecossistema (OUOBA, LEI e JENSEN, 2008; SOUZA et al., 2013). Assim, ausência de resistência a antimicrobianos é um importante critério na prospecção probiótica, sendo interessante que o microrganismo apresente larga sensibilidade a esses medicamentos (MAYRHOFER et al., 2008; DUSKOVÁ e KARPÍSKOVÁ, 2013). Entretanto, é esperado que os microrganismos, de um modo geral, sejam naturalmente resistentes a alguns antibióticos (resistência intrínseca). A resistência mais preocupante é a resistência adquirida, pela possibilidade de transferência horizontal desses genes por meio de elementos genéticos móveis como plasmídeos, transposons e integrons, enquanto a resistência natural ou intrínseca, que normalmente é cromossômica, não é facilmente transmitida a outras bactérias (AMMOR et al., 2008; DEVIRGILIIS, ZINNO e PEROZZI, 2013).

As bactérias ácido-láticas possuem resistência intrínseca a muitos antimicrobianos (SALMINEN et al., 1998; TYNKKYNEN, SINGH e VARMANEN, 1998; KLEIN, 2011). Vários estudos mostram que linhagens de *Lactobacillus*

possuem resistência natural para Vancomicina, Estreptomicina, Bacitracina, Ciprofloxacino, Norfloxacino, Sulfadiazina, Metronidazol, Canamicina, Trimetoprim/Sulfametoxazol, Nitrofurantoína, Ácido fusídico, Sulfadiazina e Ácido nalidíxico; e sensibilidade a Gentamicina, Cloranfenicol, Eritromicina, Rifampicina e Clindamicina (DANIELSEN e WIND, 2003; HUMMEL et al., 2007; KLEIN, 2011; MUÑOZ et al., 2014). Em relação à Tetraciclina, as pesquisas são controversas, havendo relatos de que *Lactobacillus* sejam normalmente sensíveis a esse medicamento, enquanto alguns autores descobriram genes de resistência adquirida - *tet(K)*, *tet(L)* *tet(Z)* - relacionados com elementos móveis (DEVIRGILIIS, ZINNO e PEROZZI, 2013; FEICHTINGER et al., 2016).

Os nossos resultados condizem com a literatura, já que todas ou quase todas as nossas linhagens foram resistentes a Estreptomicina, Bacitracina, Vancomicina, Norfloxacino e Ácido Nalidíxico, o que provavelmente se deve à resistência intrínseca. Em contrapartida, a maioria das linhagens foi sensível à Clindamicina, Gentamicina, Rifampicina e Cloranfenicol. Entretanto, para as linhagens que se mostraram resistentes a esses antibióticos, seria importante fazer um estudo mais aprofundado sobre o tipo de resistência apresentada, sobretudo para aquelas linhagens que apresentaram características desejáveis como probióticos, como é o caso da linhagem Lac6, que é a linhagem que apresentou um conjunto de característica probióticas desejáveis, mas que apresentou resistência a Clindamicina, Eritromicina e Cloranfenicol.

Apesar da FAO recomendar o antibiograma, não fornece os parâmetros que devem ser considerados na escolha de probióticos. Entendemos que o teste, por permitir apenas a avaliação se a linhagem é ou não resistente ao antibiótico, sem identificar a base genética da resistência, seria limitado a uma primeira triagem de amostras. Se a linhagem bacteriana estudada for sensível aos antibióticos, não há necessidade de mais testes. Entretanto, quando a linhagem apresenta resistência que pode estar associada à presença de elementos genéticos móveis, como é o caso da Lac6, seria necessária uma avaliação da existência de plasmídeos conjugativos e também PCR para detecção específica dos respectivos genes de resistência associados a elementos genéticos móveis (EFSA, 2012).

Pelo que foi visto na literatura atual, o risco de linhagens de *Lactobacillus* transferirem genes de resistência a alguns antibióticos, como eritromicina,

clindamicina, penicilina e tetraciclina, para outras bactérias parece provável (AMMOR et al., 2008; DEVIRGILIIS et al., 2009, NAWAZ et al., 2011; ABRIOUEL et al., 2015), porém, ainda controverso, principalmente em se tratando dos efeitos reais no tratamento de animais e seres humanos.

Nos surpreendeu o número de linhagens que apresentou resistência a vários antibióticos, mesmo essas não sendo prováveis escolhas de potencial probiótico. Mesmo retirando-se os antibióticos para os quais *Lactobacillus* são naturalmente resistentes (para efeito de cálculo), algumas linhagens, como a pertencente à espécie *L. equicursoris* (Lac11), foram resistentes a 8 de 9 antibióticos testados, enquanto as linhagens de *L. reuteri* Lac1, Lac3, Lac12 e Lac19, foram resistentes a 4 ou 5 antibióticos. Esse resultado talvez reflita o uso indiscriminado de antibióticos na agropecuária brasileira. De fato, ao consultarmos a ficha de registro dos porcos do abatedouro, de onde foram isoladas as linhagens de *Lactobacillus*, o rebanho tinha recebido tratamento recente com, pelo menos, 6 antibióticos: Norfloxacino, tetraciclina, neomicina, avilamicina, tiamolina e raqtopamina, o tratamento tendo sido interrompido 15 dias antes do abate. Apesar de só termos avaliado a susceptibilidade a dois dos antibióticos especificamente utilizados nesses suínos – Norfloxacino e Tetraciclina – os resultados revelam que 100% das amostras eram resistentes, confirmando que as linhagens residentes no trato gastrointestinal dos animais sofrem pressão seletiva contínua pelo tratamento com antibióticos e aditivos alimentares. A interrupção do uso desses medicamentos, necessária para que a carne do animal não contenha resíduos de antibióticos, não é suficiente para impedir a seleção ou diminuir o número de microrganismos resistentes a estes que irão se disseminar para o ambiente ou mesmo contaminar o homem, principalmente os que manipulam diretamente os animais.

7. CONCLUSÕES

As linhagens de *Lactobacillus* isoladas da mucosa gástrica saudável de suínos apresentam perfis distintos quanto a características probióticas, comprovando o comportamento linhagem-específico dos probióticos.

A resistência à acidez gástrica é uma característica probiótica presente em todas as amostras estudadas, provavelmente devido à origem gástrica, que, juntamente com a tolerância aos sais biliares, aumentam a chance dessas linhagens sobreviverem no trato gastrointestinal.

O caráter hidrofóbico da superfície celular e a capacidade de formação de biofilme da maioria das linhagens também são indicadores de que elas sejam boas colonizadoras do trato gastrointestinal.

As linhagens são seguras devido à incapacidade de degradar mucina, entretanto, o padrão de resistência a vários antibióticos indica a necessidade de se avaliar, de forma mais aprofundada, a origem da resistência para se excluir o potencial de transferência horizontal de resistência a outras bactérias.

As linhagens apresentaram a capacidade de antagonizar *in vitro* um espectro variado de patógenos de interesse veterinário e médico.

O antagonismo de várias amostras contra *Acinetobacter baumannii* e KPC, aponta para o potencial uso de probióticos como possível alternativa no tratamento de infecções por linhagens multirresistentes.

A amostra Lac6, pelo seu maior espectro de antagonismo *in vitro*, somado às outras características avaliadas, seria a linhagem de escolha para caracterização de atividade probiótica *in vivo*, entretanto, por ter apresentado resistência a vários antimicrobianos, seria importante avaliar, primeiro, a origem das resistências.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRIOUEL, H. et al. New insights in antibiotic resistance of *Lactobacillus* species from fermented foods. **Food Research International**, v. 78, n. 3, p. 465-481, 2015.
- AMINOV, R. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. **Frontiers in Microbiology**, v. 1, n. 5, p. 134, 2010.
- AMMOR, M. et al. Molecular characterization of intrinsic and acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 6-15, 2007.
- AMORY, J.; MACKENZIE, A.; PEARCE, G. Papers & Articles. **The Veterinary Record**, v. 158, n. 10, p. 260-264, 2006.
- ANDERSON, D. et al. Gut microbiology and growth-promoting antibiotics in swine. **Pig News and Information**, v. 70, n. 2, p. 101-108, 1999.
- BAELE, M. et al. Isolation and characterization of *Helicobacter suis* sp. nov. from pig stomachs. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n. 6, p. 1350-1358, 2008.
- BAJAJ, B.; CLAES, I.; LEBEER, S. Functional mechanisms of probiotics. **The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 4, n. 4, p. 321, 2015.
- BEASLEY, D. et al. The evolution of stomach acidity and its relevance to the human microbiome. **PLoS One**, v. 10, n. 7, p. 1-12, 2015.
- BERMUDEZ-BRITO, M. et al. Probiotic mechanisms of action. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 61, n. 2, p. 160-174, 2012.
- BLASER, M.; ATHERTON, J. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 3, p. 321-333, 2004.
- BOMBA, A. et al. Potentiation of the effectiveness of *Lactobacillus casei* in the prevention of *E. coli* induced diarrhea in conventional and gnotobiotic pigs. In: **Mechanisms in the Pathogenesis of Enteric Diseases 2**. Springer US. p. 185-190, 1999.
- BOVE, P. et al. Probiotic features of *Lactobacillus plantarum* mutant strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, n. 2, p. 431-441, 2012.
- BRASHEARS, M.; JARONI, D.; TRIMBLE, J. Isolation, selection, and characterization of lactic acid bacteria for a competitive exclusion product to reduce shedding of *Escherichia coli* O157: H7 in cattle. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 3, p. 355-363, 2003.
- CASAS, I.; DOBROGOSZ, W. Validation of the probiotic concept: *Lactobacillus reuteri* confers broad-spectrum protection against disease in humans and animals. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 12, n. 4, p. 247-285, 2000.
- CHAMONE, J. et al. Fisiologia digestiva de leitões. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 7, n. 3, p. 1353-1363, 2011.

- CHANG, Y. et al. Selection of a potential probiotic *Lactobacillus* strain and subsequent in vivo studies. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 80, n. 2, p. 193-199, 2001.
- CHARTERIS, W. et al. Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, n. 5, p. 759-768, 1998.
- CHATTOPADHYAY, M. K. Use of antibiotics as feed additives: a burning question. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. 3, p. 334, 2014.
- CHEEKE, P. Applied animal nutrition: feeds and feeding. **Scientifur**, v. 24, n. 2, p. 117-117, 2000.
- CHOI, C. et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter trial of *Saccharomyces boulardii* in irritable bowel syndrome: effect on quality of life. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 45, n. 8, p. 679-683, 2011.
- COLLADO, M.; GUEIMONDE, M.; SALMINEN, S. Probiotics in adhesion of pathogens: mechanisms of action. **Bioactive Foods in Promoting Health**, v. 23, p. 353-370, 2010.
- COLLADO, M.; SANZ, Y. Characterization of the gastrointestinal mucosa-associated microbiota of pigs and chickens using culture-based and molecular methodologies. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 12, p. 2799-2804, 2007.
- COOK, M. et al. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 162, n. 1, p. 56-67, 2012.
- CROMWELL, G. Why and how antibiotics are used in swine production. **Animal Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 7-27, 2002.
- COVER, T.; HALTER, S.; BLASER, M. Characterization of HeLa cell vacuoles induced by *Helicobacter pylori* broth culture supernatant. **Human Pathology**, v. 23, n. 9, p. 1004-1010, 1992.
- CRUCHET, S. et al. Effect of the ingestion of a dietary product containing *Lactobacillus johnsonii* La1 on *Helicobacter pylori* colonization in children. **Nutrition**, v. 19, n. 9, p. 716-721, 2003.
- DEVIRGILIIS, C.; ZINNO, P.; PEROZZI, G. Update on antibiotic resistance in foodborne *Lactobacillus* and *Lactococcus* species. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 301, 2013.
- DINAN, T.; STANTON, C.; CRYAN, J. Psychobiotics: a novel class of psychotropic. **Biological Psychiatry**, v. 74, n. 10, p. 720-726, 2013.
- DOWD, S. et al. Bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP) for microbiome studies: bacterial diversity in the ileum of newly weaned Salmonella-infected pigs. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 5, n. 4, p. 459-472, 2008.
- EFSA FEEDAP. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. **EFSA Journal**, v. 10, n. 6, p. 2740, 2012.
- FEICHTINGER, M. et al. Tetracycline resistance patterns of *Lactobacillus buchneri* Group Strains. **Journal of Food Protection**, v. 79, n. 10, p. 1741-1747, 2016.

- FLAHOUE, B.; HAESBROUCK, F.; SMET, A. Non-*Helicobacter pylori* Helicobacter Infections in Humans and Animals. In: **Helicobacter pylori Research**. Springer Japan, v. 72, n. 8, p. 233-269, 2016.
- FOUHSE, J.; ZIJLSTRA, R.; WILLING, B. The role of gut microbiota in the health and disease of pigs. **Animal Frontiers**, v. 6, n. 3, p. 30-36, 2016.
- FULLER, R. History and development of probiotics. In: **Probiotics**. Springer Netherlands, v. 72, n. 8, p. 1-8, 1992.
- GÄNZLE, M. et al. Characterization of reutericyclin produced by *Lactobacillus reuteri* LTH2584. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 10, p. 4325-4333, 2000.
- GAO, X. et al. Dose–response efficacy of a proprietary probiotic formula of *Lactobacillus acidophilus* CL1285 and *Lactobacillus casei* LBC80R for antibiotic-associated diarrhea and *Clostridium difficile*-associated diarrhea prophylaxis in adult patients. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 105, n. 7, p. 1636-1641, 2010.
- GAREAU, M.; SHERMAN, P.; WALKER, W. Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 7, n. 9, p. 503-514, 2010.
- GASKINS, H.; COLLIER, C.; ANDERSON, D. Antibiotics as growth promotants: mode of action. **Animal Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 29-42, 2002.
- GASPAR, P. et al. From physiology to systems metabolic engineering for the production of biochemicals by lactic acid bacteria. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 6, p. 764-788, 2013.
- GRIVET, M. et al. Effect of hydrophobicity on in vitro streptococcal adhesion to dental alloys. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 11, n. 10, p. 637-642, 2000.
- GOLDENBERG, J. et al. Probiotics for the prevention of pediatric antibiotic-associated diarrhea. **The Cochrane Library**. v. 31, n. 6, p. 1-95, 2015.
- GOLDIN, B. Probiotics and Health: from history to future. **Probiotics in Health Claims**. v. 13, n. 2, p. 1-16, 2011.
- GONG, X. et al. Cell surface properties of *Lactobacillus salivarius* under osmotic stress. **European Food Research and Technology**, v. 234, n. 4, p. 671-678, 2012.
- GROSSE, V. et al. Integrity of gastric mucosa in reared piglets—effects of physical form of diets (meal/pellets), pre-processing grinding (coarse/fine) and addition of lignocellulose (0/2.5%). **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 93, n. 3, p. 373-380, 2009.
- GUGLIELMETTI, S. et al. Randomised clinical trial: *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75 significantly alleviates irritable bowel syndrome and improves quality of life—a double-blind, placebo-controlled study. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 33, n. 10, p. 1123-1132, 2011.
- GUO, X. et al. Importance of functional ingredients in yak milk-derived food on health of Tibetan nomads living under high-altitude stress: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 54, n. 3, p. 292-302, 2014.

- GUO, X. et al. Screening lactic acid bacteria from swine origins for multistrain probiotics based on in vitro functional properties. **Anaerobe**, v. 16, n. 4, p. 321-326, 2010.
- HAMMES W., HERTEL C. Genus I. Lactobacillus. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Springer Berlin, v. 3, p. 465–510, 2009.
- HAMMES, W.; VOGEL, R. The genus lactobacillus. In: **The Genera of Lactic Acid Bacteria**. Springer US, p. 19-54, 1995.
- HARDY, H. et al. Probiotics, prebiotics and immunomodulation of gut mucosal defences: homeostasis and immunopathology. **Nutrients**, v. 5, n. 6, p. 1869-1912, 2013.
- HELLEMANS, A. et al. Prevalence of 'Candidatus *Helicobacter suis*' in pigs of different ages. **Veterinary Record: Journal of the British Veterinary Association**, v. 161, n. 6, p. 189-192, 2007.
- HERBEL, S. et al. Timely approaches to identify probiotic species of the genus *Lactobacillus*. **Gut Pathogens**, v. 5, n. 1, p. 1, 2013.
- HOU, C. et al. Study and use of the probiotic *Lactobacillus reuteri* in pigs: a review. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 1, 2015.
- HUANG, C. et al. Effects of dietary supplementation of Chinese medicinal herbs on polymorphonuclear neutrophil immune activity and small intestinal morphology in weanling pigs. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 96, n. 2, p. 285-294, 2012.
- HUGHES, P.; HERITAGE, J. Antibiotic growth-promoters in food animals. **FAO Animal Production and Health Paper**, p. 129-152, 2004.
- HUMMEL, A. et al. Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 3, p. 730-739, 2007.
- HUN, L. Original research: *Bacillus coagulans* significantly improved abdominal pain and bloating in patients with IBS. **Postgraduate Medicine**, v. 121, n. 2, p. 119-124, 2009.
- JACELA, J. et al. Practice tip peer reviewed feed additives for swine. **J Swine Health Prod**, v. 18, n. 3, p. 132-136, 2010.
- FAO/WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. **London, Ontario, Canada**, v. 30, 2002.
- JONES, S.; VERSALOVIC, J. Probiotic *Lactobacillus reuteri* biofilms produce antimicrobial and anti-inflammatory factors. **BMC Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 1, 2009.
- JONSSON, E.; CONWAY, P. Probiotics for pigs. In: **Probiotics**. Springer Netherlands, 1992. p. 259-316. (volume)
- JUNTUNEN, M. et al. Adherence of probiotic bacteria to human intestinal mucus in healthy infants and during rotavirus infection. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, n. 2, p. 293-296, 2001.
- KAUFMANN, S. Immunology's foundation: the 100-year anniversary of the Nobel Prize to Paul Ehrlich and Elie Metchnikoff. **Nature Immunology**, v. 9, n. 7, p. 705-712, 2008.

- KIM, G.; YI, S.; LEE, B. Purification and characterization of three different types of bile salt hydrolases from *Bifidobacterium* strains. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 2, p. 258-266, 2004.
- KNEZEVIC, P. et al. Antimicrobial activity of *Eucalyptus camaldulensis* essential oils and their interactions with conventional antimicrobial agents against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 178, p. 125-136, 2016.
- KONSTANTINOV, S. et al. Post-natal development of the porcine microbiota composition and activities. **Environmental Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 1191-1199, 2006.
- KOS, B. et al. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, n. 6, p. 981-987, 2003.
- LÆRKE, H.; HEDEMANN, M. The digestive system of the pig. In: **Nutritional Physiology of Pigs-Online Publication**. Videncenter for Svineproduktion, 2012.
- LALLÈS, J. et al. Gut function and dysfunction in young pigs: physiology. **Animal Research**, v. 53, n. 4, p. 301-316, 2004.
- LEBEER, S.; VANDERLEYDEN, J.; DE KEERSMAECKER, S. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 72, n. 4, p. 728-764, 2008.
- LESER, T. et al. Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 2, p. 673-690, 2002.
- LIU, F. et al. Dual functions of *Lactobacillus acidophilus* NCFM™ at the intermediate dose in protection against rotavirus diarrhea in gnotobiotic pigs vaccinated with a human rotavirus vaccine. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 58, n. 2, p. 171, 2014.
- MARE, L. The use of prebiotics and probiotics in pigs: a review. **Agricultural Research Council–Livestock Business Division: Animal Production**, 2009.
- MCLAMB, B. et al. Early weaning stress in pigs impairs innate mucosal immune responses to enterotoxigenic *E. coli* challenge and exacerbates intestinal injury and clinical disease. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. 38, 2013.
- MACK, D. et al. Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro. **Gut**, v. 52, n. 6, p. 827-833, 2003.
- MAH, T.; O'TOOLE, G. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in microbiology**, v. 9, n. 1, p. 34-39, 2001.
- MAINVILLE, I.; ARCAND, Y.; FARNWORTH, E. A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 99, n. 3, p. 287-296, 2005.
- MANN, E. et al. Mucosa-associated bacterial microbiome of the gastrointestinal tract of weaned pigs and dynamics linked to dietary calcium-phosphorus. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. 86950, 2014.

- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Legislação: sislegis. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/alimentacao/aditivos/aditivos-autorizados>. Acesso em: 24 de out. 2016.
- MARTEAU, P. et al. Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 6, p. 1031-1037, 1997.
- MARSHALL, B.; LEVY, S. Food animals and antimicrobials: impacts on human health. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 718-733, 2011.
- MARTINS, A. et al. Evaluation of in vitro antagonism and of in vivo immune modulation and protection against pathogenic experimental challenge of two probiotic strains of *Bifidobacterium animalis* var. lactis. **Archives of microbiology**, v. 192, n. 12, p. 995-1003, 2010.
- MATTAR, A. et al. Effect of probiotics on enterocyte bacterial translocation *in vitro*. **Pediatric Surgery International**, v. 17, n. 4, p. 265-268, 2001.
- MAYRHOFER, S. et al. Comparison of broth microdilution, Etest, and agar disk diffusion methods for antimicrobial susceptibility testing of *Lactobacillus acidophilus* group members. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 12, p. 3745-3748, 2008.
- MCFARLAND, L. From yaks to yogurt: the history, development, and current use of probiotics. **Clinical Infectious Diseases**, v. 60, n. 2, p. 85-90, 2015.
- MICHAIL, S.; KENCHE, H. Gut microbiota is not modified by randomized, double-blind, placebo-controlled trial of VSL# 3 in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 3, n. 1, p. 1-7, 2011.
- MOLLY, K. et al. Validation of the simulator of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME) reactor using microorganism-associated activities. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 7, n. 4, p. 191-200, 1994.
- MUÑOZ, M. et al. Antibiotic resistance of *Lactobacillus pentosus* and *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolated from naturally-fermented Aloreña table olives throughout fermentation process. **International Journal of Food Microbiology**, v. 172, p. 110-118, 2014.
- NADERI, A. et al. Study of antagonistic effects of *Lactobacillus* strains as probiotics on multi drug resistant (MDR) bacteria isolated from urinary tract infections (UTIs). **Iranian journal of basic medical sciences**, v. 17, n. 3, p. 201, 2014.
- NARDI, R. D. et al. Antagonism against anaerobic and facultative bacteria through a diffusible inhibitory compound produced by a *Lactobacillus* sp. isolated from the rat fecal microbiota. **Anaerobe**, v. 5, n. 3, p. 409-411, 1999.
- NAWAZ, M. et al. Characterization and transfer of antibiotic resistance in lactic acid bacteria from fermented food products. **Current microbiology**, v. 62, n. 3, p. 1081-1089, 2011.
- O'SHEA, E. F. et al. Production of bioactive substances by intestinal bacteria as a basis for explaining probiotic mechanisms: bacteriocins and conjugated linoleic acid. **International journal of food microbiology**, v. 152, n. 3, p. 189-205, 2012.

- OHLAND, C. L.; MACNAUGHTON, W. K. Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 298, n. 6, p. 807-819, 2010.
- OUWEHAND, A. C. et al. Probiotics reduce symptoms of antibiotic use in a hospital setting: a randomized dose response study. **Vaccine**, v. 32, n. 4, p. 458-463, 2014.
- OUWEHAND, A. C.; SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. Probiotics: an overview of beneficial effects. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 82, n. 1-4, p. 279-289, 2002.
- PAPADIMITRIOU, K. et al. Discovering probiotic microorganisms: in vitro, in vivo, genetic and omics approaches. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 58, 2015.
- PELLETIER, X.; LAURE-BOUSSUGE, S.; DONAZZOLO, Y. Hydrogen excretion upon ingestion of dairy products in lactose-intolerant male subjects: importance of the live flora. **European journal of clinical nutrition**, v. 55, n. 6, p. 509-512, 2001.
- PELLETIER, C. et al. Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. **Applied and environmental microbiology**, v. 63, n. 5, p. 1725-1731, 1997.
- PLUSKE, J. R.; HAMPSON, D. J.; WILLIAMS, I. H. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. **Livestock production science**, v. 51, n. 1, p. 215-236, 1997.
- POLAK-BERECKA, M. et al. The effect of cell surface components on adhesion ability of *Lactobacillus rhamnosus*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 106, n. 4, p. 751-762, 2014.
- QUEIROZ, D. M. et al. Association between *Helicobacter* and gastric ulcer disease of the pars esophagea in swine. **Gastroenterology**, v. 111, n. 1, p. 19-27, 1996.
- REID, G. The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. **Applied and environmental microbiology**, v. 65, n. 9, p. 3763-3766, 1999.
- RESTA-LENERT, S.; BARRETT, K. E. Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC). **Gut**, v. 52, n. 7, p. 988-997, 2003.
- RINGEL, Y. et al. T1406 Probiotic bacteria *Lactobacillus acidophilus* Ncfm and *Bifidobacterium lactis* Bi-07 improve symptoms of bloating in patients with functional bowel disorders (FBD). **Gastroenterology**, v. 134, n. 4, p. 549, 2008.
- ROOSENDAAL, R. et al. Slaughter pigs are commonly infected by closely related but distinct gastric ulcerative lesion-inducing gastrospirilla. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 7, p. 2661-2664, 2000.
- ROWAN, J. P. et al. The digestive tract of the pig. **Animal Science Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Gainesville, Document AS23**, v. 1, n. 4, p. 1-7, 1997.
- RYAN, K. A. et al. Isolation of lactobacilli with probiotic properties from the human stomach. **Letters in applied microbiology**, v. 47, n. 4, p. 269-274, 2008.
- SALVETTI, E.; TORRIANI, S.; FELIS, G. E. The genus *Lactobacillus*: a taxonomic update. **Probiotics and antimicrobial proteins**, v. 4, n. 4, p. 217-226, 2012.

- SAPIERZYŃSKI, R. et al. Effect of *Helicobacter* sp. infection on the number of antral gastric endocrine cells in swine. **Polish journal of veterinary sciences**, v. 10, n. 2, p. 65-70, 2006.
- SCHOSTER, A. et al. Effect of a probiotic on prevention of diarrhea and *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* shedding in foals. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 29, n. 3, p. 925-931, 2015.
- SILVA, B. C. et al. In vitro assessment of functional properties of lactic acid bacteria isolated from faecal microbiota of healthy dogs for potential use as probiotics. **Beneficial microbes**, v. 4, n. 3, p. 267-275, 2013.
- SOCCOL, C. R. et al. The potential of probiotics: a review. **Food Technology and Biotechnology**, v. 48, n. 4, p. 413-434, 2010.
- SOUZA, T. C. et al. In vitro evaluation of *Bifidobacterium* strains of human origin for potential use in probiotic functional foods. **Beneficial microbes**, v. 4, n. 2, p. 179-186, 2013.
- SPINLER, J. K. et al. Human-derived probiotic *Lactobacillus reuteri* demonstrate antimicrobial activities targeting diverse enteric bacterial pathogens. **Anaerobe**, v. 14, n. 3, p. 166-171, 2008.
- SUO, C. et al. Effects of *Lactobacillus plantarum* ZJ316 on pig growth and pork quality. **BMC veterinary research**, v. 8, n. 1, p. 1, 2012.
- 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**, v. 10, n. 4, p. 251-255, 2008.
- THACKER, P. A. Alternatives to antibiotics as growth promoters for use in swine production: a review. **Journal of animal science and biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 1, 2013.
- TYNKKYNEN, S.; SINGH, K. V.; VARMANEN, P. Vancomycin resistance factor of *Lactobacillus rhamnosus* GG in relation to enterococcal vancomycin resistance (van) genes. **International journal of food microbiology**, v. 41, n. 3, p. 195-204, 1998.
- TRAESEL, C. K. et al. Óleos essenciais como substituintes de antibióticos promotores de crescimento em frangos de corte: perfil de soroproteínas e peroxidação lipídica. **Ciência rural**, v. 41, n. 2, 2011.
- TSAI, Y.; CHENG, P.; PAN, T. The immunomodulatory effects of lactic acid bacteria for improving immune functions and benefits. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 96, n. 4, p. 853-862, 2012.
- VALERIANO, V. D.; BALOLONG, M.; KANG, D. Probiotic Roles of *Lactobacillus* spp. in Swine: Insights from Gut Microbiota. **Journal of Applied Microbiology**, doi: 10.1111/jam.13364, p. 1-31, 2016.
- VARANKOVICH, N. V.; NICKERSON, M. T.; KORBER, D. R. Probiotic-based strategies for therapeutic and prophylactic use against multiple gastrointestinal diseases. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 1-14, 2015.
- VONDRUSKOVA, H. et al. Alternatives to antibiotic growth promoters in prevention of diarrhoea in weaned piglets: a review. **Veterinarni Medicina**, v. 55, n. 5, p. 199-224, 2010.

VUONG, C. N. et al. Role of probiotics on immune function and their relationship to antibiotic growth promoters in poultry, a brief review. **International Journal of Probiotics & Prebiotics**, v. 11, n. 1, p. 1-6, 2016.

WALKER, D K.; GILLILAND, S. E. Relationships among bile tolerance, bile salt deconjugation, and assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of dairy science**, v. 76, n. 4, p. 956-961, 1993.

WANG, W. et al. Increased proportions of *Bifidobacterium* and the *Lactobacillus* group and loss of butyrate-producing bacteria in inflammatory bowel disease. **Journal of clinical microbiology**, v. 52, n. 2, p. 398-406, 2014.

YANG, F. et al. The use of lactic acid bacteria as a probiotic in Swine diets. **Pathogens**, v. 4, n. 1, p. 34-45, 2015.

ZHOU, J. S.; GOPAL, P. K.; GILL, H. S. Potential probiotic lactic acid bacteria *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019) do not degrade gastric mucin *in vitro*. **International journal of food microbiology**, v. 63, n. 1, p. 81-90, 2001.

ZIEMER, C. J. et al. Fate and transport of zoonotic, bacterial, viral, and parasitic pathogens during swine manure treatment, storage, and land application. **Journal of animal science**, v. 88, n. 13, p. 84-94, 2010.

ANEXO

Anexo 1 – Tabela com as médias dos diâmetros (mm) dos halos de inibição do ensaio de atividade antagonista das linhagens de *Lactobacillus* contra amostras reveladoras.

Bactérias reveladoras								
Amostras	<i>Salmonella</i> Typhimurium	<i>Enterococcus</i> <i>faecalis</i>	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	<i>Bacillus</i> <i>cereus</i>	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>	<i>Klebsiella</i> <i>pneumoniae</i>	<i>Acinetobacter</i> <i>baumannii</i>	KPC
Lac1	26,9	25,7	-	27,8	25,1	30,6	21,3	27,6
Lac2	-	-	-	-	-	-	-	-
Lac3	20,7	-	-	22,6	20,4	19,8	22,4	22,0
Lac4	28,0	21,2	-	22,9	29,2	26,0	-	22,7
Lac5	-	-	-	-	-	-	-	28,6
Lac6	31,7	24,7	14,5	22,5	32,8	21,2	18,2	22,7
Lac7	-	-	-	-	-	-	-	-
Lac8	19,6	13,0	-	22,7	30,5	-	20,5	18,6
Lac9	-	-	-	-	-	-	-	-
Lac10	17,6	-	-	-	-	-	-	-
Lac11	16,0	21,5	-	-	20,3	-	-	-
Lac12	28,4	30,0	-	24,2	23,4	17,8	21,7	17,2
Lac13	21,8	15,4	-	-	22,9	-	-	-
Lac14	-	-	-	-	-	-	-	-
Lac15	20,0	-	-	14,6	21,8	20,6	25,9	17,1
Lac16	17,4	-	-	23,1	25,0	19,3	22,2	20,1
Lac17	24,0	-	-	25,9	24,9	-	16,1	27,2
Lac18	-	19,0	27,2	22,7	-	-	-	-
Lac19	27,7	29,2	-	28,0	27,4	29,3	27,1	16,4

