

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS COM POTENCIAL PROBIÓTICO PARA USO
COMO PROMOTOR DE CRESCIMENTO OU COMO ADJUVANTE IMUNE EM
VACINAS DE MUCOSA NA PECUÁRIA BOVINA.**

ORIENTADO: SÁVIO HENRIQUE DE CICCO SANDES

ORIENTADOR: Prof. Dr. ÁLVARO CANTINI NUNES

BELO HORIZONTE

FEVEREIRO – 2013

SÁVIO HENRIQUE DE CICCO SANDES

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS COM POTENCIAL PROBIÓTICO PARA USO
COMO PROMOTOR DE CRESCIMENTO OU COMO ADJUVANTE IMUNE EM
VACINAS DE MUCOSA NA PECUÁRIA BOVINA.**

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

Área de Concentração: Genética Molecular, de Microrganismos e Biotecnologia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. ÁLVARO CANTINI NUNES

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte, MG

2013

"Não sei se cada um tem um destino, ou só se flutuamos sem rumo, como numa brisa...
...mas acho que talvez sejam ambas as coisas.
Talvez as duas coisas aconteçam ao mesmo tempo."

Forrest Gump

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, modelos de formação e de caráter, pelo apoio e carinho ao longo de toda vida.

Aos bons e velhos amigos da graduação, os Deboaceae, que compartilharam grande parte dessa caminhada que se iniciou, de certa forma, no ano de 2006. À Camila, ao Eudes ao Rafael, à Marina, ao Fernando, à Mariana, à Luara, à Nat, ao Fazito, entre outros pelas ótimas conversas e momentos de procrastinação demente.

Aos não somente colegas, mas bons amigos de laboratório, pela troca de experiências e angústias da pesquisa científica e pelos bons relacionamentos. Ao Bruno, à Márcia, à Cinara, à Débora, à Lenice, à Camila, ao Igor, entre outros. Em especial ao Luige, Maurício e Leonardo.

Aos excelentes professores da graduação, responsáveis pela minha formação e que constituíram o maior estímulo para entrada na vida acadêmica.

Agradeço ao meu orientador, Professor Álvaro Cantini Nunes por ter-me abertos as portas do laboratório, pelos ensinamentos, apoio e confiança.

À banca examinadora pela contribuição para o enriquecimento do manuscrito.

E finalmente aos Beatles, às genialidades de Paul McCartney e John Lennon, que me acompanharam nos momentos de solidão durante a escrita desse manuscrito.

Obrigado a todos!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS, TABELAS, QUADROS E GRÁFICOS	I
LISTA DE ABREVIATURAS	II
LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA	III
RESUMO	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	13
1.1- Sobre a pecuária bovina brasileira.....	13
1.2- Os principais aditivos para a dieta dos bovinos.....	14
1.3- Bactérias indígenas como aditivos à dieta de bovinos.....	17
1.3.1- O gênero <i>Lactobacillus</i>	18
1.3.2- O gênero <i>Weissella</i>	20
1.4- Mecanismos de ação dos probióticos	21
1.4.1- Promoção da homeostase da microbiota	21
1.4.2- Promoção da função de barreira epitelial	22
1.4.3- Modulação da resposta imune.....	22
1.4.3.1- Vacinas de mucosa utilizando BAL's como veículo de proteínas imunogênicas.....	23
1.5- Critérios para seleção de probióticos veterinários	26
2. OBJETIVOS	29
2.1- Objetivo geral.....	29
2.2- Objetivos específicos.....	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1- Amostragem.....	31
3.2- Isolamento, caracterização morfotintorial e armazenamento.....	31
3.3- Identificação molecular dos isolados.....	31
3.4- Caracterização funcional e probiótica <i>in vitro</i>	32
3.4.1- Reativação	33
3.4.2- Resistência ao suco gástrico artificial.....	33
3.4.3- Resistência aos sais biliares artificiais	33
3.4.4- Teste de hidrofobicidade da parede celular.....	33
3.4.5- Antagonismos a bactérias patogênicas.....	34
3.4.6- Produção de peróxido de hidrogênio	34
3.4.7- Antibiograma	34
3.5- Caracterização probiótica <i>in vivo</i>	35
3.5.1- Monoassociação e avaliação da colonização das mucosas	35
3.5.2- Avaliação da indução da produção de IgA	36
3.5.3- Análises estatísticas	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	38
4.1- Isolamento, caracterização morfotintorial e identificação.....	38
4.2- Caracterização funcional e probiótica <i>in vitro</i>	41
4.2.1- Resistência ao suco gástrico e sais biliares artificiais.....	41
4.2.2- Hidrofobicidade da parede celular.....	43
4.2.3- Antagonismo a bactérias patogênicas e produção de peróxido de hidrogênio	44
4.2.4- Antibiograma	48
4.3- Caracterização probiótica <i>in vivo</i> : Colonização e indução da produção de IgA.....	51
5. CONCLUSÕES.....	56
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

7. ANEXOS.....	65
8. APÊNDICES.....	67
8.1- Apêndice A: Alinhamento das sequencias obtidas pelo sequenciamento do gene 16S do rDNA com as sequencias depositadas GenBank, utilizando o algoritmo BLAST	67
8.1- Apêndice B: Curvas de crescimento obtidas para os isolados de BAL's após a manutenção em salina 0,9% ou em suco gástrico artificial por uma hora	71
8.1- Apêndice C: Curvas de crescimento obtidas para os isolados de BAL's expostas aos sais biliares artificiais	89
8.1- Apêndice D: Antagonismo: Diâmetros dos halos de inibição observados	107
8.1- Apêndice E: Síntese dos resultados dos testes <i>in vitro</i>	110

LISTAS DE FIGURAS, TABELAS, QUADROS E GRÁFICOS.

FIGURAS

Figura 1: Árvore filogenética de bactérias pertencentes ao gênero <i>Lactobacillus</i>	19
Figura 2: Árvore filogenética de BAL's construída a partir de sequencias do rDNA 16S	20
Figura 3: Principais vias de imunomodulação promovida por um probiótico	24
Figura 4: Destino das BAL's recombinantes no intestino	25
Figura 5: Representação esquemática do vetor vacinal pLBS_SMC_Em_AB	26
Figura 6: Perfis de restrição dos isolados e suas identificações ao nível de espécie	39
Figura 7: Perfis da síntese de peróxido de hidrogênio de alguns dos isolados de BAL's	45
Figura 8: Perfis de indução de IgA pelos isolados selecionados em seus sítios de inóculo	54

TABELAS E QUADROS

Tabela 1: Relação dos isolados orais e vaginais e suas respectivas identificações ao nível de espécie	40
Tabela 2: Relação dos isolados fecais e suas respectivas identificações ao nível de espécie	40
Tabela 3: Porcentagem de inibição dos isolados orais e vaginais frente ao desafio do suco gástrico e sais biliares artificiais	42
Tabela 4: Adesão microbiológica ao solvente orgânico Xileno	43
Tabela 5: Atividade antagonista e produção de peróxido de hidrogênio dos isolados	46
Tabela 6: Perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados	49
Quadro 1: Contagens relativas à capacidade de colonização dos isolados selecionados em modelo murino axênico	53
Apêndice E: Síntese dos resultados dos testes <i>in vitro</i>	110

GRÁFICOS

Apêndice B: Curvas de crescimento obtidas para os isolados de BAL's após a manutenção em salina 0,9% ou em suco gástrico artificial por uma hora.....	71
Apêndice C: Curvas de crescimento obtidas para os isolados de BAL's expostas aos sais biliares artificiais.....	89
Apêndice D: Antagonismo: Diâmetros dos halos de inibição observados	107

LISTA DE ABREVIATURAS

Abiec	Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes
BAL	Bactérias do ácido láctico
BCL	Bactérias consumidoras de lactato
BHI	Meio de cultivo microbiológico <i>Brain Heart Infusion</i>
BLAST	<i>Basic Locus Alignment Search</i>
CD	Células dendríticas
CE	Células epiteliais
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CM	Células M
CP	Células de Paneth
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i>
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IgA	Imunoglobulina A
ITS I	<i>Internal Transcribed Spacer I</i>
LEFM	Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos
LPSN	<i>List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MATS	<i>Microbial Adhesion to Solvents</i>
MRS	Meio de cultivo microbiológico De Man, Rogosa e Sharpe
NAGE	Núcleo de Análise de Genoma e Expressão Gênica
NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PIB	Produto Interno Bruto
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

%	Porcentagem
µg	Micrograma
µl	Microlitros
µM	Micromolar
g	Grama
hs	Horas
L	Litro
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
ng	Nanogramas
nM	Nanomolar
°C	Graus Célcus
OD	<i>Optical Density</i>
RPM	Rotações por minuto
s	Segundos
U	Unidades
x g	Gravidade
pmols	Picomols

RESUMO

O requisito por proteínas de origem animal foi crescente nos últimos quarenta anos, principalmente nos países em desenvolvimento, onde a economia em ascensão e o aumento do poder aquisitivo da população estimularam a procura desses produtos. Entretanto, a segurança dos principais promotores de crescimento animal utilizados foi contestada nas últimas décadas, abrindo precedente para o desenvolvimento de novas abordagens como a utilização de microrganismos. As bactérias do ácido láctico são frequentemente utilizadas para a promoção do ganho de peso em bezerros, reduzindo a frequência de diarreias neonatais. Nesse sentido, setenta isolados pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*/*Weissella* foram obtidos das mucosas oral, vaginal e intestinal desses animais e caracterizados quanto seus potenciais funcionais e probióticos. Foram avaliados a resistência ao suco gástrico e sais biliares artificiais, a hidrofobicidade da superfície celular, a capacidade de antagonizar bactérias patogênicas e de produzir peróxido de hidrogênio, além do perfil de suscetibilidade a antimicrobianos de interesse médico. Quatro isolados foram selecionados e submetidos a testes *in vivo* em camundongos axênicos, avaliando-se suas capacidades de colonizar e modular a resposta humoral das mucosas. *L. fermentum* V3B-08, *W. hellenica* V1V-30 e *L. farciminis* B4F-06 foram observados, respectivamente, colonizando as mucosas das vias aéreas, vaginal e intestinal após dez dias de monoassociação. Todos os isolados testados induziram de forma estatisticamente significativa a produção de IgA em suas respectivas mucosas de inóculo, apresentado, portanto, um grande potencial para utilização na produção animal, promovendo a proteção das mucosas de infecções ou de serem utilizados como veículo vacinal.

ABSTRACT

The requirement for animal protein has been increasing over the past forty years, especially in developing countries, where the economy is on the rise and the increased purchasing power of the population stimulated the demand for these products. However, the safety of the main animal growth promoters used has been challenged in recent decades, making reference for the development of new approaches such as the use of microorganisms. Lactic acid bacteria are often used to promote weight gain in calves, reducing the incidence of neonatal diarrhea. Accordingly, seventy isolates belonging to the genera *Lactobacillus/Weissella* were obtained from the oral, vaginal and intestinal mucosae and characterized for their functional and probiotics potentials. Were evaluated the resistance to gastric juice and bile salts, cell surface hydrophobicity, ability to antagonize pathogenic bacteria and to produce hydrogen peroxide and the antimicrobial profile. Four isolates were selected and tested *in vivo* in axenic mice, evaluating their ability to colonize and modulate mucosal antibody response. *L. fermentum* 08-V3B, *W. hellenica* V1V-30 and *L. farciminis* B4F-06 were observed, respectively, colonizing the airway, intestinal and vaginal mucosae after ten days of monoassociação. All isolates tested induced a statistically significant production of mucosal IgA in their respective inoculum presented, therefore, great potential for use in animal production, protecting mucosal infection or as a vaccine vehicle.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1-Sobre a produção e o mercado pecuário bovino brasileiro

O Brasil é um dos maiores produtores e exportadores de alimentos no mundo, sendo o agronegócio um dos componentes-chaves da economia do país, representando aproximadamente 22% do Produto Interno Bruto (PIB). De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2013) no ano de 2012 as exportações de produtos agropecuários bateram recordes perfazendo a soma de US\$ 95,81 bilhões e estabelecendo um saldo positivo da balança comercial do setor de US\$ 79,41 bilhões. Os complexos da soja (farinha, grãos e óleo) e o sucroalcooleiro, bem como as carnes, os produtos florestais e o café são os principais insumos comercializados em termos financeiros e foram responsáveis por 75,6% (US\$ 72,43 bilhões) do total de vendas em 2012.

O setor da carne bovina no país é bastante complexo e dinâmico e movimenta cerca de US\$ 170 bilhões por ano. O Brasil possui o segundo maior rebanho do mundo com aproximadamente 210 milhões de cabeças de gado (Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes – Abiec, 2010), ocupando uma área aproximada de pastagem de 172 milhões de hectares. A cadeia produtiva inicia-se com os insumos pré-criação/criação como a seleção de matrizes, a inseminação artificial, os suplementos alimentares, os defensivos agrícolas, os fertilizantes, as sementes forrageiras, os controles sanitários, etc., até a engorda do animal que segue aos frigoríficos para o abate (cerca de 40 milhões em 2010, Abiec, 2010). As peças oriundas da atividade são finalmente redistribuídas às indústrias cosméticas, farmacêuticas, alimentícia, de rações e curtumes que processam e agregam o valor final aos produtos a serem entregues ao consumidor final.

No ano de 2012 vários países restringiram a importação da carne bovina brasileira (África do Sul, Arábia Saudita, China, Coreia do Sul, Japão e Taiwan) devido às especulações em torno da segurança sanitária do país associado a um suposto caso de “vaca-louca” no estado do Paraná (Abiec, 2012¹). O setor exporta carne principalmente na forma *in natura* (78%), industrializada (11%) e miúdos (9%) e apresenta um grande número de parceiros comerciais (cerca de 140 países). A Rússia (23%), o Irã (11%) e a Venezuela (10%) se destacam como os principais compradores de carne *in natura*, os Estados Unidos (27%) e o Reino Unido (26%) de carne processada e Hong Kong (77%) de miúdos (Abiec, 2012²). Apesar das restrições de mercado por alguns países, o setor movimentou US\$ 5,76 bilhões, estabelecendo um novo recorde de vendas, tendo a Rússia (19%), Hong Kong (14%) e Egito (9,5%) como os principais importadores da carne brasileira (Abiec, 2012²).

Baseado nisso, o setor é considerado estratégico, principalmente pela crescente demanda mundial no consumo de proteínas de origem animal. Para o ano de 2013, de acordo com a Abiec (Abiec, 2013) há a previsão de crescimento de 10% nos volumes de exportações, aumentando cada vez mais a importância do produto na balança comercial brasileira.

1.2- Os principais aditivos para a dieta de bovinos

O requisito por proteínas de origem animal foi crescente nos últimos quarenta anos, principalmente nos países em desenvolvimento, como o Brasil e a China, onde a economia em ascensão e o aumento do poder aquisitivo da população estimularam a procura desse produto. O consumo mais que dobrou nesse período, de 10Kg/*per capita* ano para 25Kg/*per capita* ano, e a atividade atualmente ocupa cerca de 40% das terras agriculturáveis do planeta que, devido às práticas do setor, causam graves problemas ambientais como a erosão e a contaminação dos solos e processos de desertificação (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura, FAO, 2002¹ – do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*).

Além disso, os novos cinturões pecuários para a crescente demanda do consumo de proteínas animais pressionam e desencadeiam processos de desmatamento em grandes proporções causando perdas da biodiversidade, principalmente na América Latina. As projeções para 2030 estimam a necessidade de aumento de cerca de 360 milhões (aumento de 24%) de bovinos, de 560 milhões (aumento de 32%) de ovinos e de 130 milhões (aumento de 22%) de suínos para o suprimento da demanda mundial, podendo agravar o quadro ambiental (FAO, 2002¹). Nesse sentido, a aplicação de técnicas de manejo, como a criação intensiva, seleção de cruzamentos e a implementação de regimes de engorda podem auxiliar no aumento da produção de carne sem haver a necessidade do crescimento populacional dos animais, amenizando os potenciais impactos ecológicos (FAO, 2002¹).

Quanto aos regimes de engorda, no Brasil, para os bovinos de corte, são utilizados vários tipos de suplementos alimentares, como os antibióticos, hormônios, ácidos orgânicos e microrganismos (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa, 2001).

Os antibióticos promotores de crescimento começaram a ser utilizados em doses subterapêuticas na década de 1950 na Europa (Dibner & Richards, 2005). Os principais mecanismos de ação associados a essas substâncias são: (I) a alteração da composição da microbiota intestinal e ruminal, reduzindo a competição por nutrientes e a produção de metabólitos microbianos que deprimem o crescimento (Anderson & Skakkebaek, 1999); (II) aumento da capacidade de absorção de nutrientes pela redução da espessura da parede intestinal e da lâmina própria (Anderson & Skakkebaek, 1999); e (III) redução de infecções oportunistas e subclínicas entéricas em animais jovens cuja ocorrência é favorecida pelo desenvolvimento incompleto do sistema imune nas primeiras semanas de vida (Dibner & Richards, 2005; Al-Dobaib & Mousa, 2009).

Apesar dos benefícios, o uso dessas substâncias tornou-se um transtorno devido à seleção de linhagens patogênicas resistentes, alterando de forma considerável a terapêutica animal (Pancheniak, 2005) e humana (Castanon, 2007). As restrições começaram em 1972 na Europa com o banimento da utilização da estreptomicina, penicilina e tetraciclina após a observação da transferência de marcadores de resistência de alimentos de origem animal para *Salmonella enterica* sorovariedade Typhimurium (Cogliani *et al.*, 2011). Em 1997, ocorreu o banimento da vancomicina

após o relato de *enterococci* resistentes ao antibiótico presente em alimentos de origem animal (Cogliani *et al.*, 2011). Em 1999, o Comitê Científico da Comissão Europeia recomendou a eliminação gradual dos antimicrobianos promotores de crescimento de importância clínica, banindo os inibidores da síntese da parede celular (bambemicina e bacitracina), os promotores de poros nas membranas celulares (monoésina e salinomina), os inibidores da síntese proteica (virginiamicina, tilosina, espiramicina, avilamicina, avoparcina, ardacina e efrotomicina) e os inibidores da síntese de DNA (olaquinox e carbadox), além de promover políticas para desenvolvimento de novas classes de promotores (Cogliani *et al.*, 2011; Al-Dobaib & Mousa, 2009). No ano de 2006, a União Europeia (Parlamento e Conselho Europeu, de 22 de Setembro de 2003, Resolução nº 1831/2003) proibiu o uso de todo antibiótico como aditivo na produção animal. No Brasil, as restrições iniciaram em 1992, e desde então o MAPA, por meio de portarias e instruções normativas (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento: Instrução Normativa nº 26, de 09 de julho de 2009), vetou a utilização de vários aditivos, dentre eles, os anfenicóis, os beta-lactâmicos, as clortetraciclina, as oxitetraciclina, as penicilinas, as quinolonas, as sulfonamidas e as tetraciclina.

Os hormônios como promotores de crescimento são classificados como naturais (o-estradiol, progesterona e testosterona) e como artificiais (zeranol, trenbolone e megestrol), (I) melhorando a qualidade da carne, pela redução da deposição de gorduras, (II) aumentando a taxa de crescimento e reduzindo o volume de alimentação administrada aos animais e (III) ampliando o período de lactação de vacas (Al-Dobaib & Mousa, 2009). Entretanto, as concentrações encontradas nos alimentos de origem animal é uma preocupação corrente nos órgãos de saúde pública uma vez que muitas das substâncias usadas para a promoção de crescimento apresentam a capacidade potencial de alterar o ciclo celular de células humanas (Kang *et al.*, 2009) e desencadear processos carcinogênicos (Anderson & Skakkebaek, 1999). Além disso, em sistemas de confinamento a eliminação através das fezes e urina de certos hormônios pelos animais, como os esteroides, podem contaminar lençóis freáticos e leitos d'água (Soto *et al.*, 2004), gerando um desequilíbrio ambiental aquático pelo desbalanço da proporção de peixes machos e fêmeas (Kidd *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2008). Nesse sentido, restrições ao uso dessas substâncias foram impostas em vários países (Al-Dobaib & Mousa, 2009). No Brasil, as proibições começaram em 1991, e no ano de 2011 o MAPA proibiu a importação, produção, comercialização e uso de hormônios naturais e sintéticos para aplicação em bovinos de corte (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento: Instrução Normativa nº 55, de 01 de dezembro de 2011), permitindo somente aqueles utilizados para fins terapêuticos e reprodutivos, como a sincronização do estro.

Outros suplementos utilizados são os tampões, os surfactantes e as enzimas (Embrapa, 2001) que atuam fundamentalmente no rúmen, promovendo o ganho de peso em condições específicas. Os tampões regulam a acidez do rumem evitando quadros de acidose provocados pela fermentação microbiana em dietas com alto teor de carboidratos. Os surfactantes são utilizados para evitar a ocorrência de timpanismo através da redução da tensão superficial do líquido ruminal, evitando a formação de bolhas estáveis que perturbam a função normal do órgão. Além disso, as enzimas fibrolíticas, como as celulases e as xilanases, têm o papel de auxiliar na digestão de fibras

vegetais, aumentando o rendimento da conversão alimentar em ganho de peso (Embrapa, 2001). Entretanto, o alto custo, em comparação às outras classes de promotores de crescimento, inviabiliza a ampla utilização dessas moléculas (Jouany & Morgavi, 2007).

Uma abordagem mais recente lança mão da utilização de microrganismos como aditivos alimentares, principalmente após as restrições associadas aos riscos dos agentes antimicrobianos e dos hormônios ao equilíbrio ambiental e à saúde animal e humana (Jouany & Morgavi, 2007; Al-Dobaib & Mousa, 2009). Nesse sentido e, no caso específico para os bovinos, a administração de microrganismos tem como objetivo regular a microbiota intestinal, reduzindo a frequência de infecções entéricas (Jouany & Morgavi, 2007; Chaucheyras-Durand & Durand, 2010) e ruminal, evitando quadros de acidose (Al-Dobaib & Mousa, 2009) que, conseqüentemente, promovem o aumento nas as taxas de digestão e de conversão alimentar e reduzem a morbidade e a mortalidade dos animais (Collins *et al.*, 2009).

Os bovinos são um dos principais reservatórios de bactérias enterotoxigênicas e de caráter zoonótico (Lejeune & Wetzel, 2007), principalmente aquelas pertencentes ao gênero *Escherichia* (*E. coli* O157:H17), sendo responsáveis por grandes prejuízos econômicos e de saúde pública (Griffin & Tauxe, 1991). Além disso, as frequentes diarreias na fase monogástrica neonatal são um dos principais fatores limitantes à criação de bezerras (Gaagia *et al.*, 2010) e reduzem, na fase adulta, a produção leiteira e a taxa de concepção. Nesse sentido, as administrações de Bactérias do Ácido Láctico (BAL) e leveduras estão associadas à estabilização da microbiota intestinal, promovendo a saúde do animal, ganho de peso e reduzindo a contaminação das carcaças por microrganismos patogênicos (Collins *et al.*, 2009).

Na fase poligástrica os microrganismos atuam principalmente no rumem (Chaucheyras-Durand & Durand, 2010). Em condições normais (pH 6,0) há um equilíbrio entre as taxas de produção de ácidos graxos voláteis (acetato, propionato e butirato), sintetizada pela fermentação dos microrganismos, e a taxa de transporte dessas substâncias para o fígado do animal. Quando há o acúmulo desses ácidos ocorre o quadro de acidose ruminal (pH 5.6), promovendo a proliferação de bactérias produtoras de lactato, principalmente *Streptococcus bovis*, culminando na redução das populações de microrganismos celulolíticos e na capacidade digestiva do animal (Jouany & Morgavi, 2007). Dentre os microrganismos utilizados para o controle desse quadro têm-se as leveduras pertencentes à espécie *Saccharomyces cerevisiae* como um dos principais agentes reguladores, diminuindo as populações de microrganismos produtores de lactato, como *Str. bovis*, e estimulando a proliferação daqueles consumidores dessa substância, como *Selenomonas ruminantium* e *Megasphaera elsdenii* (Nisbet *et al.*, 1991; Collins *et al.*, 2009). Outro papel dessas leveduras é a capacidade de reduzir as concentrações de oxigênio no órgão, tornando-o estritamente anaeróbio, o que promove a proliferação de microrganismos celulolíticos (Collins *et al.*, 2009), determinando no aumento da digestibilidade das fibras alimentares e da taxa de conversão alimentar.

Além da questão econômica existe um potencial ambiental em relação à utilização de leveduras como aditivo alimentar (Collins *et al.*, 2009; Chaucheyras-Durand & Durand, 2010). O

metano é um dos principais gases do efeito estufa e cerca de 15% do total, encontrado no ambiente, é produzido no rumem em decorrência da fermentação anaeróbica de arqueias metanogênicas que o sintetiza, principalmente, a partir de acetato e hidrogênio (Takahashi *et al.*, 2005). Avaliações *in vitro* observaram que as administrações de *Sac. cerevisiae* são capazes de promover a redução da emissão de gases metano no líquido ruminal após 24 horas (Lila *et al.*, 2004), podendo balancear a microbiota ruminal em detrimento de microrganismos acetogênicos e metanogênicos. Apesar disso, existem poucas evidências concretas quanto o papel da administração de leveduras *in vivo* na redução da metanogênese ruminal, sendo necessários mais estudos a respeito (Collins *et al.*, 2009).

1.3- Bactérias indígenas como aditivos à dieta de bovinos

Apesar do grande destaque dado às leveduras, as Bactérias Consumidoras de Lactato (BCL) e as Bactérias do Ácido Lático (BAL) têm papel importante como aditivo alimentar para os bovinos. Dentre as BCL's destacam aquelas pertencentes aos gêneros *Megasphaera*, *Propionibacterium* e *Selenomonas* (Jouany & Morgavi, 2007; Collins *et al.*, 2009, Chaucheyras-Durand & Durand, 2010), sendo administradas em condições onde a dieta oferecida ao animal é rica em teores de amido e de açúcar. Alimentos ricos desses nutrientes são rapidamente fermentados, acumulando ácidos no rumem, principalmente o lactato que desequilibra a microbiota normal do animal e reduz as populações de microrganismos celulolíticos (Jouany & Morgavi, 2007). A administração dessas bactérias tem como finalidade eliminar o quadro de acidose e aumentar o pH ruminal (próximo de 6.0) pela remoção do lactato.

As BAL's, mesmo apresentando um metabolismo energético no qual o principal resíduo produzido é o lactato, também podem ser administradas em animais adultos. Os principais gêneros utilizados pertencem ao *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* e *Streptococcus* (Collins *et al.*, 2009), sendo utilizadas em casos específicos nos quais as populações de BCL's encontram-se deprimidas, modulando e promovendo a proliferação dessas bactérias pela manutenção de um nível basal de lactato (Nocek & Kautz, 2006; Chaucheyras-Durand & Durand, 2010). Além disso, a utilização das BAL's é mais destacado na fase monogástrica dos bovinos (Embrapa, 2001; Gaaglia *et al.*, 2010), destacando o gênero *Lactobacillus* cujo papel está associado à modulação da microbiota intestinal, reduzindo as taxas de infecções e preservando as mucosas de injúrias por microrganismos patogênicos (Collins *et al.*, 2009).

Baseado nisso, as BCL's, as BAL's e assim como as leveduras utilizadas como aditivos alimentares podem ser classificadas como probióticos, que, de um modo geral, são definidos como microrganismos vivos com a capacidade de conferir benefícios à saúde de seu hospedeiro quando administrado em quantidades adequadas (FAO, 2002²).

1.3.1- O gênero *Lactobacillus*

Os *Lactobacillus* são eubactérias pertencentes ao filo Firmicutes, classe Bacilli ordem Lactobacillales e família Lactobacillaceae. Não apresentam capacidade de esporulação e são caracterizados pela sua forma em bastonete ou cocobacilos, apresentando uma parede celular externa rígida constituída por peptidoglicanos, ácidos teicóicos e lipoteicóicos que lhes conferem o status de Gram positivo. Além disso, são microaerofílicos e quimio-organotróficos, requerendo meios enriquecidos para o crescimento (Felis & Dellaglio, 2007). O gênero apresenta uma estrutura filogenética bastante complicada, sendo parafilético com *Pediococcus* e apresentando quatorze agrupamentos (**Figura 1**): Grupo *L. delbrueckii*, *L. salivarius*, *L. reuteri*, *L. buchneri*, *L. alimentarius/farciminis*, *L. casei*, *L. sakei*, *L. fructivorans*, *L. coryniformis*, *L. plantarum*, *L. perolens*, *L. brevis*, espécies irmãs e espécies únicas (Felis & Dellaglio, 2007).

De acordo com o *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature* (LPSN, 2013), o gênero é bastante diverso, apresentando 185 espécies que ocupam os mais variados nichos onde os carboidratos fermentáveis encontram-se disponíveis, como a pele, os tratos gastrointestinal, respiratório e vaginal dos animais e humanos, além da matéria orgânica dos solos e associados aos vegetais (Felis & Dellaglio, 2007). Estão presentes em muitos tipos de alimentos como cereais, bebidas fermentadas, queijos e produtos lácteos, carnes e derivados, dentre outros (Hammes e Hertel, 2003). São geralmente reconhecidos como seguros (GRAS – do inglês *Generally Recognized as Safe*) por frequentemente não apresentarem fatores de virulência e patogenicidade, como as hemolisinas, as internalinas e, portanto, são utilizados como probióticos para a promoção da saúde animal e humana e bem como pela indústria alimentícia como suplemento para a obtenção de características organolépticas desejáveis.

As infecções nos primeiros dias de vida do animal são um fator limitante na criação dos bezerros e determinam a redução das taxas de crescimento e conseqüente baixa na produtividade na vida adulta (Ishihara *et al.*, 2001). Na produção bovina a utilização de *Lactobacillus* spp. é evidenciada no período pós-natal, quando o animal é mais susceptível a infecções devido ao desenvolvimento incompleto da microbiota das mucosas e do sistema humoral (Gaagìa *et al.*, 2010). Nesse sentido, Frizzo *et al.*, (2011) numa análise extensa de 21 trabalhos concluíram que a administração de *Lactobacillus* é capaz de permitir que os animais resistam melhor a infecções de mucosa uma vez que essas bactérias competem por nutrientes e produzem componentes antimicrobianos (ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas) no lúmen, permitindo-lhes ocupar nichos específicos em detrimento a microrganismos patogênicos, além de ativar o sistema imune inato dos hospedeiros (Elam *et al.*, 2003, Younts-Dahl *et al.*, 2005 Peterson *et al.*, 2007; Frizzo *et al.*, 2011). A profilaxia e saúde promovidas são, portanto, convertidas em ganhos econômicos ao produtor, aumentando ganho de peso corpóreo, cerca de 220g/dia e reduzindo a taxa de consumo alimentar, cerca de 800g/dia (Frizzo *et al.*, (2011).

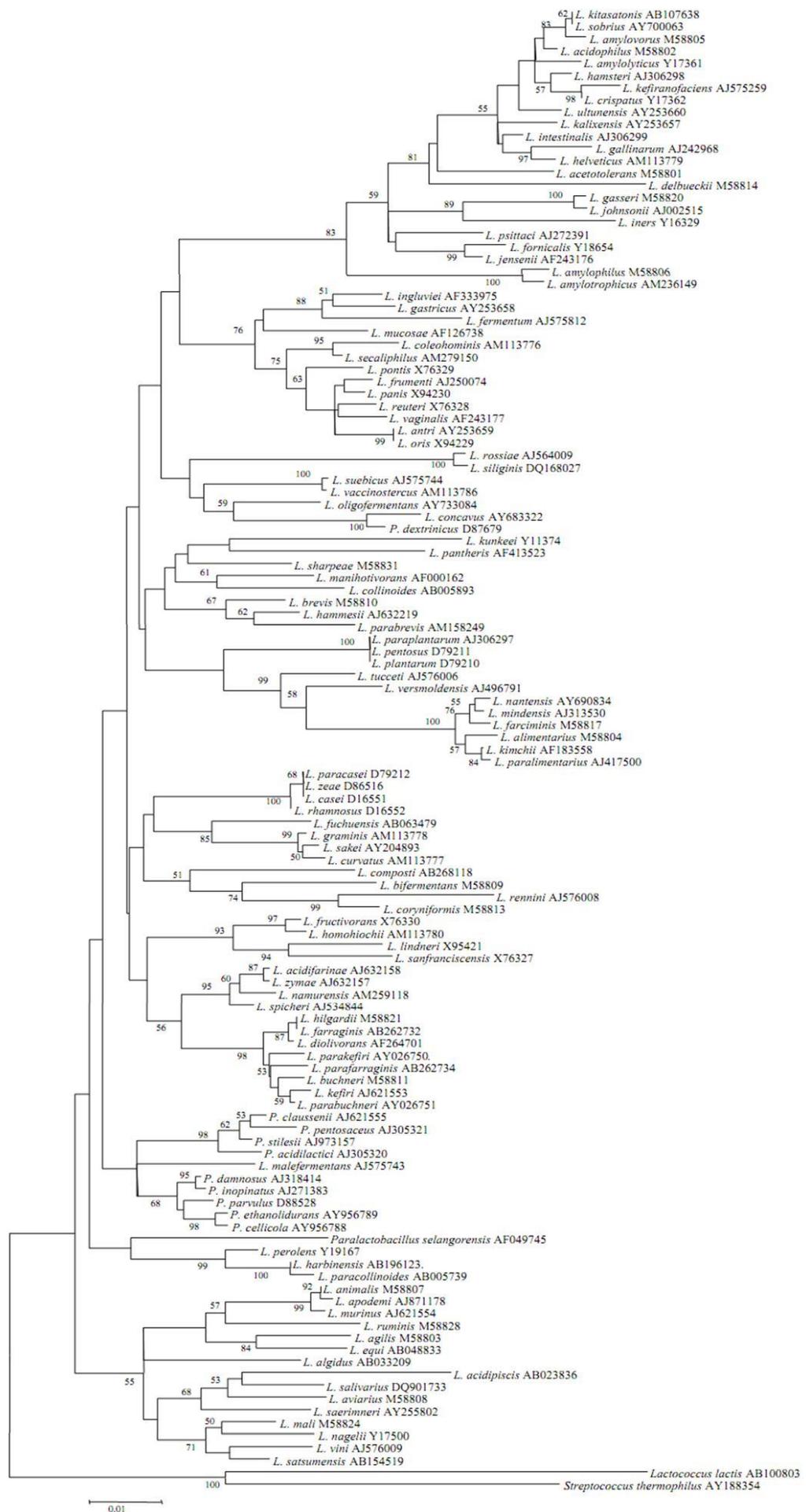


Figura 1: Árvore filogenética de bactérias pertencentes ao gênero *Lactobacillus*.

O gênero apresenta 14 agrupamentos baseados em sequências do rDNA 16S (Felis & Dellaglio, 2007).

1.3.2- O gênero *Weissella*

Taxonomicamente, o gênero *Weissella* pertence ao filo Firmicutes, classe Bacilli ordem Lactobacillales e família Leuconostocaceae. São bactérias Gram positivas, caracterizados pela sua forma de bacilo curto ou ovoide, ambos ocorrendo em pares ou cadeias curtas. Pertencem ao grupo de BAL's, são quimio-organotróficos, facultativamente anaeróbicos e sem capacidade de esporulação e motilidade (Bergey's Manual, 2009).

De acordo com o *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature* (LPSN, 2013), o gênero é constituído por 16 espécies e foi descrito por Collins *et al.*, (1993) ao observar, em uma identificação preliminar por testes bioquímicos, e mais adiante, por análises de sequências do rDNA 16S, que bactérias pertencentes à espécie *Leuconostoc paramesenteroides* se assemelhavam mais à espécies de *Lactobacillus* do que à espécies de *Leuconostoc*, formando um clado monofilético que passou, então, a ser denominado *Weissella* (**Figura 2**).

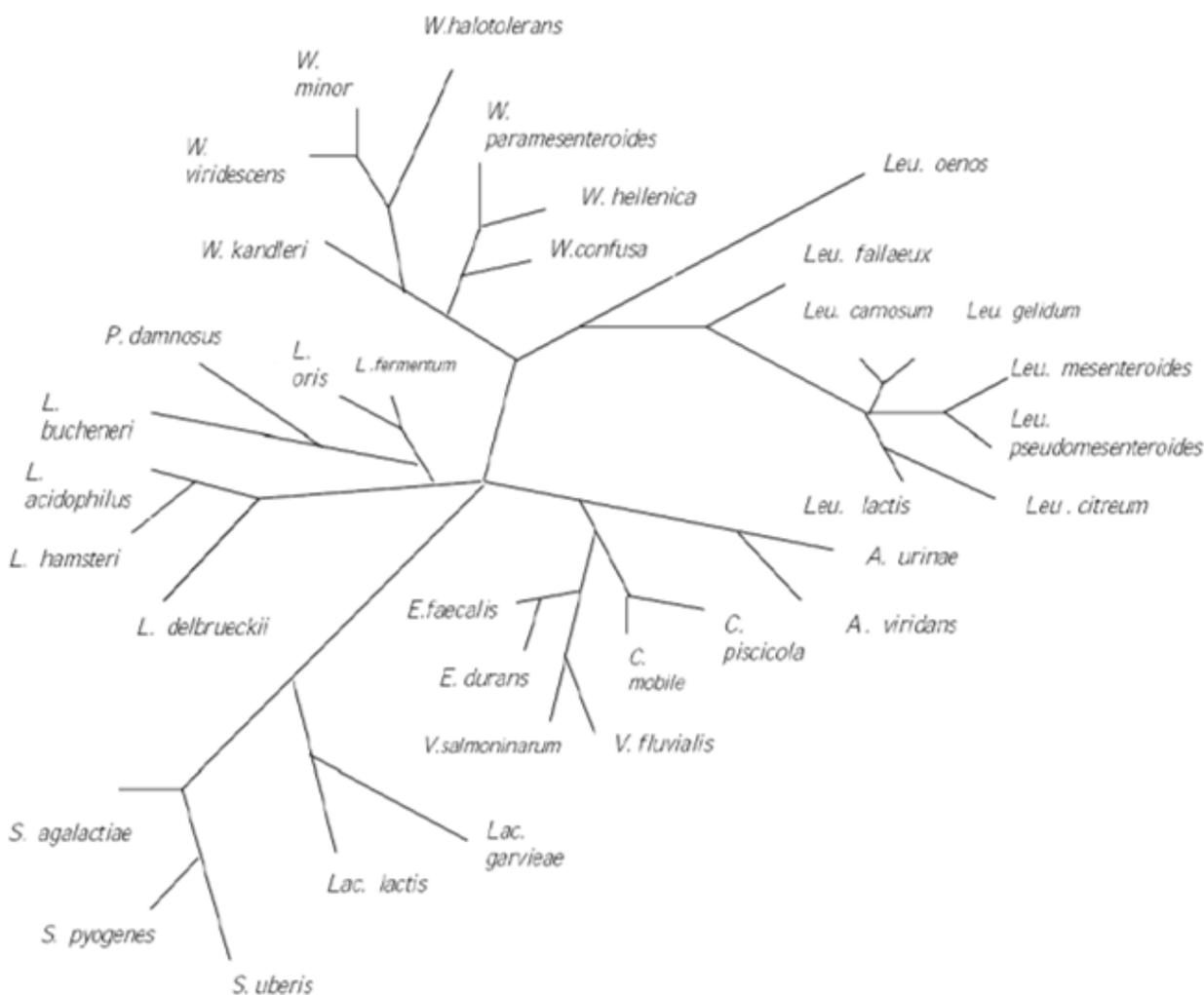


Figura 2: Árvore filogenética de BAL's construída a partir de sequências do rDNA 16S. O gênero *Weissella* forma um agrupamento monofilético, formando um novo táxon (Collins *et al.*, 1993)

Assim como os *Lactobacillus*, bactérias pertencentes ao gênero *Weissella* são encontradas colonizando os alimentos, plantas e mucosas orais e intestinais de animais e humanos (Euzéby, 2009). Além disso, podem ser encontradas em culturas de sangue e urina e bem como em drenagens ou amostras de vesículas biliares (Björkroth *et al.*, 2002), não sendo descartado potenciais patogênicos a esses microrganismos (Olano *et al.*, 2001). Apesar disso, *Weissella* spp. apresentam potenciais funcionais e probióticos, sendo isoladas novas linhagens das mucosas humanas (Lee *et al.*, 2012) e animais (Soto *et al.*, 2010; Ayeni *et al.*, 2011) para utilização como promotor da saúde em seus hospedeiros.

1.4- Mecanismos de ação dos probióticos

Um probiótico deve fundamentalmente se enquadrar em pelo menos uma das seguintes categorias: (I) manter a homeostase da microbiota e ser capaz de inibir a proliferação de patógeno pelas interações micróbio-micróbio; (II) promover a função de barreira epitelial; e (III) modular a resposta imune (Lebeer *et al.* 2008). Dado à complexidade dessas funções e o grande número de fatores associados, como diferenças na constituição da parede celular e proteínas de superfície, além da produção e eliminação de diferentes substâncias é proposto que a característica probiótica seja linhagem dependente, estabelecendo interações e respostas específicas e determinando o efeito desejado no hospedeiro (Lebeer *et al.* 2008).

No caso das BAL's, a muito são reportados trabalhos evidenciando esses benefícios, principalmente aqueles associados à microbiota intestinal dos animais onde esses organismos desempenham papéis importantes na fisiologia dos seus hospedeiros, como a atuação no auxílio da digestão e assimilação de nutrientes, proteção contra a colonização de patógenos (Pillai e Nelson 2008), prevenção de enterocolites necrotizantes em neonatos prematuros (Deshpande *et al.* 2007), regulação do armazenamento de lipídeos, prevenção de câncer colorretal (Rafter *et al.* 2007), tratamento para a síndrome do intestino irritável (Camilleri 2006) e estimulação da angiogênese intestinal (Backhed *et al.* 2005). Fora desse sítio de colonização, o uso de BAL's como probióticos também parece promissora, Falagas *et al.* (2007) reportam a possibilidade da utilização de *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* GR-1 e *L. fermentum* RC-14 no combate a vaginoses bacterianas, restaurando a microbiota normal e Meurman & Stamatova (2007) citam em sua revisão vários pontos positivos quanto a administração de probióticos para a saúde bucal, incluindo o combate a cáries.

1.4.1- Promoção da homeostase da microbiota

A manutenção do equilíbrio da microbiota pode ser dada pela atividade antagonista dos microrganismos administrados, ocorrendo pela secreção de substâncias capazes de inibir a proliferação de agentes patogênicos (Lebeer *et al.* 2008). No caso das BAL's os principais componentes produzidos são o ácido lático, o peróxido de hidrogênio e bacteriocinas.

O ácido láctico é o principal componente produzido oriundo do metabolismo energético das BAL's, sua atividade está associado à desnaturação de proteínas, devido à redução do pH local, e pela capacidade de alterar a permeabilidade da membrana externa de bactérias Gram-negativas (Alakomi *et al.*, 2000) como foi observado em *Sal. enterica* sorovariedade Typhimurium (De Keersmaecker *et al.* 2006). O peróxido de hidrogênio atua promovendo estresse oxidativo nos microrganismos, seu papel é mais destacado na mucosa vaginal onde a presença das BAL's produtoras dessa substância agem reduzindo a frequência de infecções bacterianas e promovendo saúde do órgão (Vallor *et al.*, 2001). Além disso, os efeitos antagonistas das bacteriocinas também vêm sendo observados, atuando não somente em microrganismos relacionados, mas também em agentes patogênicos como *Listeria monocytogenes* (Corr *et al.* 2007).

1.4.2- Promoção da função de barreira epitelial

Outro mecanismo associado ao efeito probiótico é a preservação da função de barreira epitelial, podendo ocorrer pela exclusão competitiva, pela indução da produção de muco e pela promoção da adesão entre as células epiteliais das mucosas.

A exclusão competitiva ocorre entre as linhagens patogênicas e os probióticos pelos mesmos sítios de adesão nas mucosas ou por nutrientes. Nesse sentido, as linhagens de BAL's mais competitivas apresentam melhores chances de colonizar o intestino, vias aéreas e vagina em detrimento de patógenos invasivos e, portanto, promover a eliminação dos mesmos. Vários fatores de exclusão competitiva putativos vêm sendo propostos como a adesina específica a manose de *L. plantarum* (Pretzer *et al.* 2005), cujas bactérias mutantes para esse gene apresentam a capacidade de aderência a células HT-29 reduzidas e permitiram a permanência da *E. coli* enteropatogênica. A camada S também parece ser importante nesses processos, Chen *et al.* (2007) demonstraram que a proteína S foi capaz de competir por sítios de adesão de *E. coli* enterohemorrágica e *Sal. enterica*. Além disso, é reportado que certas linhagens de BAL's são capazes de induzir a produção de mucinas (Mack *et al.* 2003), estimular a adesão célula-célula (Seth *et al.* 2008) e prevenir a apoptose pelas células intestinais (Yan *et al.* 2007), mantendo a integridade da barreira epitelial e reduzindo a permeabilidade das mucosas.

1.4.3- Modulação da resposta imune

A imunomodulação nos primeiros dias de vida é promovida pela colonização do intestino e contribui para o desenvolvimento normal do sistema imune através da indução da tolerância a antígenos luminais, auxiliando na prevenção de doenças autoimunes e alergias alimentares, quadro alcançado pela geração de uma resposta celular balanceada, mediada por células T auxiliares e pela síntese de imunoglobulinas A (IgA), muco e defensinas (Shi & Walker, 2004; Lebeer *et al.*, 2010).

Em um contexto na qual a microbiota está estabelecida, a administração de probióticos nas mucosas podem induzir diferentes tipos de respostas humorais (inata e/ou adquirida, local e sistêmica) associadas às variações estruturais e metabólicas de cada linhagem (Lebeer *et al.* 2008). Na mucosa intestinal, as moléculas de superfície microbianas interagem com os vários tipos celulares da parede entérica (Células Epiteliais (CE), Células de Paneth (CP) e Células M (CM)) e da *lamina propria* (linfócitos B e T e Células Dendríticas (CD)), estimulando uma resposta inata e/ou adaptativa.

A resposta inata desencadeada por probióticos é marcada pela indução de IL-8 pelas CE's, que é capaz de estimular a atividade fagocítica e a produção de óxido nítrico pelos macrófagos, além de induzir a síntese de defensinas pelas CP's (Delcenserie *et al.*, 2008; Lebeer *et al.* 2008). A resposta adaptativa é caracterizada pela apresentação dos microrganismos aos linfócitos B e T na *lamina propria*. Essa apresentação é mediada principalmente pelas CD's e é dependente da dinâmica do muco intestinal (Lebeer *et al.*, 2010). Entretanto, para que haja a apresentação, o microrganismo deve romper a barreira epitelial para ter acesso às CD's e como os probióticos não apresentam fatores de patogenicidade e virulência essa interface ocorre em três vias: (I) através das Zônulas de Oclusão, transpondo-se entre as CE's, (II) transcitose via CM's ou (III) fagocitose direta pelas DC's através da emissão de dendritos em direção ao lúmen intestinal (**Figura 3**). Uma vez fagocitado pelas DC's os componentes celulares dos probióticos podem, então, ser apresentados aos linfócitos T nos tecidos linfoides associados que, dependendo da linhagem, induzem a polarização em células T regulatória ou auxiliar do tipo 1, 2 e/ou 17 e estimulam as populações de linfócito B a produzirem IgA, protegendo o epitélio intestinal contra patógenos entéricos e toxinas (Lebeer *et al.*, 2010).

1.4.3.1- Vacinas de mucosa utilizando BAL's como veículo de proteínas imunogênicas

Um aspecto importante em relação ao uso de BAL's como probióticos é o potencial dos mesmos serem empregados como veículos vacinais de mucosa, expressando moléculas imunogênicas de interesse. Os proveitos a esse tipo de abordagem estão relacionados ao fato de que as imunizações de mucosa são capazes de gerar respostas imunes locais e sistêmicas (Neutra & Kozlowski 2006; Medina & Guzmán 2001), de apresentar baixo custo de produção, maior estabilidade e facilidade de administração em comparação a outros veículos vacinais como lipossomas, microesferas, nanopartículas (Medina & Guzmán 2001) e bactérias patogênicas atenuadas. Além disso, as capacidades imunoestimulatórias das BAL's, principalmente aquelas associadas à indução de uma resposta adaptativa e à produção de IgA antígeno-específico constituem as maiores vantagens da utilização dessas bactérias, sendo capazes de estimular uma resposta humoral eficiente e rápida (Wells & Mercenier, 2008; Mac Donald & Bell, 2010). Essas características associadas com a capacidade de sobrevivência aos desafios do trato gastrointestinal (variações de pH, sais biliares e enzimas pancreáticas), de apresentar propriedades probióticas conferem à certas BAL's uma ferramenta promissora na imunização de animais (Hanniffy *et al.* 2004).

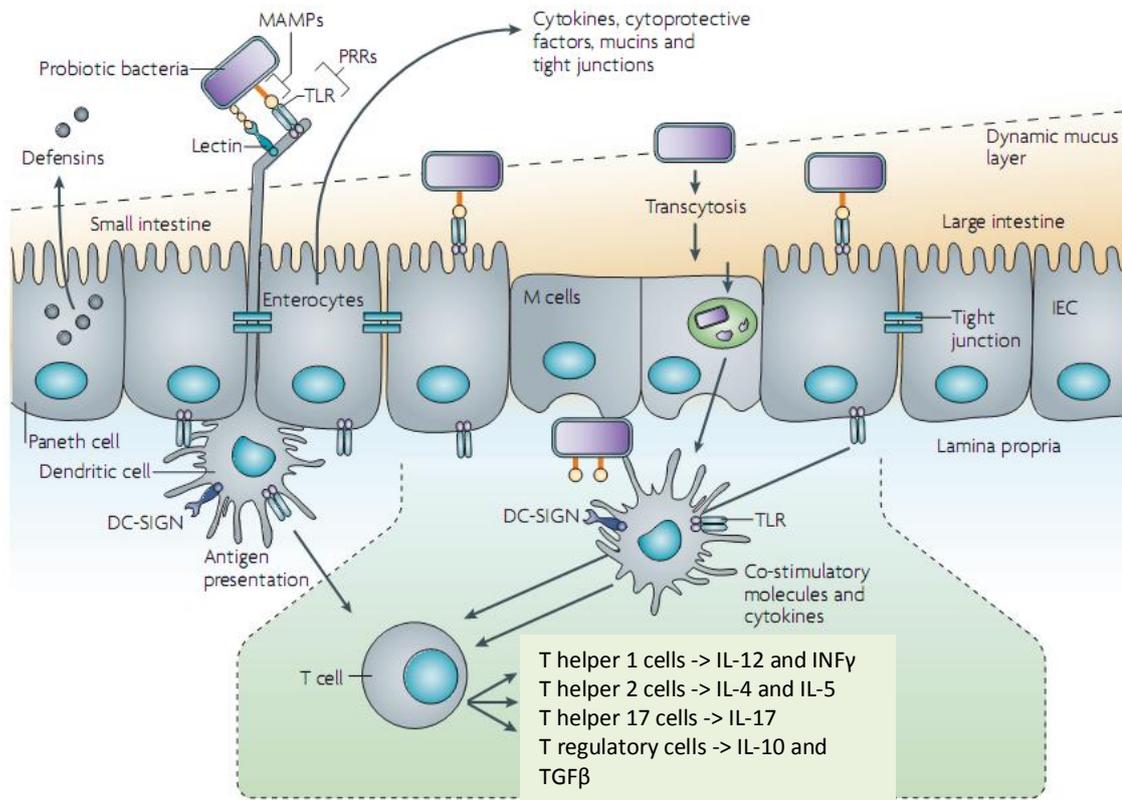


Figura 3: Principais vias de imunomodulação promovida por um probiótico.

Um probiótico é capaz de interagir com as células dendríticas na *lamina propria*. O tipo de interação é dependente da dinâmica do muco intestinal e, independente da via, é capaz de induzir a produção de citocinas, podendo atuar como adjuvante imune. (Retirado e modificado de Lebeer *et al.*, 2010).

O principal destino dessas bactérias em uma vacina oral são os linfonodos mesentéricos intestinais (tecidos linfoides associados ao intestino) e a indução da resposta imune é assistida pelas CD's que fazem o papel de apresentador de antígenos aos linfócitos T, induzindo uma resposta adaptativa e a produção de imunoglobulinas antígeno-específica (**Figura 4**).

Entretanto, vários aspectos devem ser levados em consideração em relação a essa abordagem (Wells & Mercenier, 2008), como o tipo de resposta adaptativa promovida pelo microrganismo (Treg, Th1, Th2 ou Th17), a via de inoculação (oral, intranasal ou intravaginal) e a quantidade e a localização do antígeno expresso (secretado, ancorado ou citoplasmático). Vários trabalhos reportam estudos de proteção utilizando BAL's como veículos vacinais, demonstrando seu potencial na proteção de algumas doenças. Por exemplo, Corthésy *et al.*, (2005) observaram a proteção parcial ao *Helicobacter pylori* pela expressão citoplasmática da proteína UreaseB do mesmo patógeno. Grangette *et al.*, (2002) em um modelo semelhante demonstrou a proteção de camundongos à toxina tetânica após a administração de *Lactobacillus* transformados, Zhang *et al.*, (2005) verificou uma redução da parasitemia em camundongos desafiados com *Plasmodium yoelli* após a imunização com transformantes expressando a proteína MSP1 e De Vrese *et al.*, (2005)

observou que a capacidade adjuvante de *Lactobacillus rhamnosus* GG e de *L. acidophilus* CRL431 ao aumentar a produção de anticorpos anti-pólio no plasma de crianças previamente vacinadas.

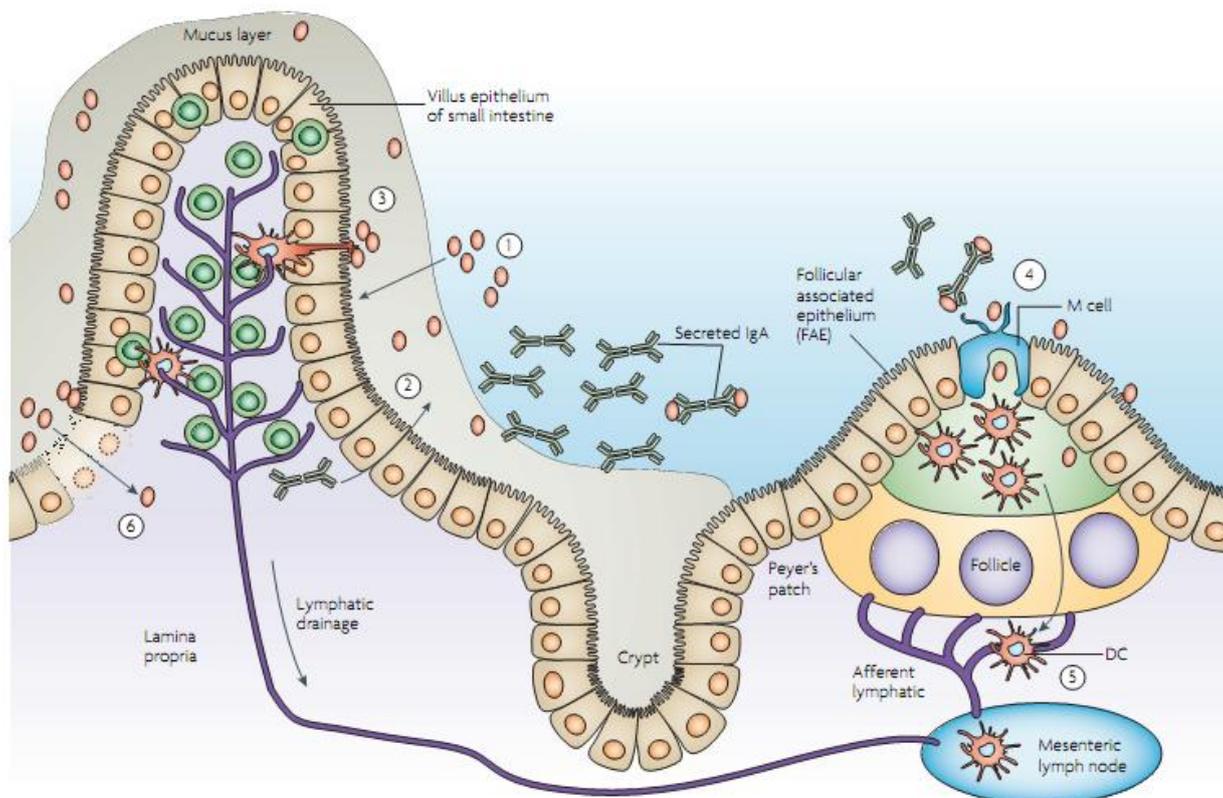


Figura 4: Destino das BAL's recombinantes no intestino. O percurso das BAL's até os linfonodos mesentéricos podem seguir vários caminhos: primeiramente a bactéria ultrapassa a barreira de muco (1), tendo suas populações controladas pela produção de IgA (2). A entrada na lamina propria pode ser realizada via CD's (3) ou CM's (4) e então transportadas para os linfonodos mesentéricos onde são apresentadas aos linfócitos T (5). Caso o epitélio esteja danificado a entrada dos microrganismos ocorre diretamente à lamina propria (6). Retirado de Wells & Mercenier, 2008.

Para tanto, plasmídios vacinais são importantes uma vez que apresentam grande versatilidade quanto ao tipo de molécula produzida e o seu endereçamento. Em 2006, Mota *et al.* construíram o plasmídio pSuperPCRLBSGFPEmAB contendo um cassete para expressão heteróloga em *Lactobacillus*. Nessa construção, a região promotora, o peptídeo sinal, a sequência de ancoragem à superfície celular e a região terminadora do gene *lbs*, codificador de um tipo de camada S de *Lactobacillus crispatus* foram clonados, além do marcador de resistência a eritromicina (*emrAM*) e do gene repórter GFP (*gfpmut2*). Linhagens com características probióticas isoladas de frango foram transformadas e expressaram o gene repórter na superfície, indicando sua robustez e podendo ser utilizado como vetor vacinal (Mota *et al.* 2006). Além disso, Moreira & Campos, 2010 (dados não publicados) modificaram o pSuperPCRLBSGFPEmAB, retirando o gene repórter GFP e introduzindo no seu lugar um sítio múltiplo de clonagem (*NheI*, *SalI*, *SacI*, *NotI*, *ClaI*) e uma sequência codificadora de cauda de histidina, permitindo uma manipulação e clonagens mais flexíveis de sequências

codificadoras de peptídeos imunogênicos, além de facilitar processos de purificação proteica (Figura 5).

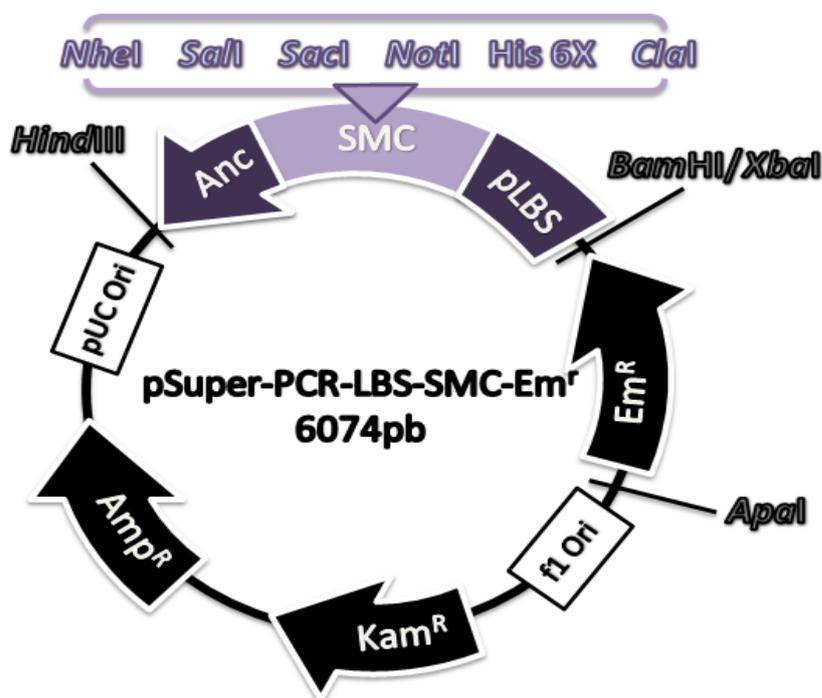


Figura 5: Representação esquemática do vetor vacinal pLBS_SMC_Em^r_AB.

O vetor pLBS_SMC_Em^r_AB apresenta a sequência promotora, peptídeo líder (representados pelo pLBS), âncora e região terminadora (representados pelo Anc) do gene *lvs* de *Lactobacillus crispatus*. O gene *mut2* do GFP foi substituído por um sítio múltiplo de clonagem (SMC) e permite a manipulação e inserção de peptídeos imunogênicos para expressão heteróloga em *Lactobacillus*. O marcador de seleção para *Lactobacillus* sp. é o da Eritromicina (Em^r) (Modificado de Mota *et al.*, 2006).

1.5-Critérios para seleção de probióticos veterinários

A complexidade das funções e o grande número de fatores associados ao efeito dos probióticos são refletidos, de certa forma, na grande diversidade dos microrganismos, sendo proposta que as características benéficas sejam linhagem-dependente e, portanto, necessitando da observação do comportamento específico de cada linhagem (Morelli, 2000).

Nesse sentido, são propostos critérios de segurança, funcionais e tecnológicos para a seleção de novas linhagens probióticas. Em relação aos aspectos de segurança, o microrganismo não deve apresentar toxicidade ou patogenicidade ao hospedeiro, deve ter sua identificação taxonômica acurada, ser geneticamente estável e oriundo da espécie ao qual se deseja aplicar o probiótico (Gaagia *et al.*, 2010). Também devem possuir capacidades adaptativas, conferindo-lhes características funcionais como a de sobreviver aos desafios impostos pelo hospedeiro, como as variações de pH ao longo do trato gastrointestinal, presença de sais biliares, imunidade local e enzimas gástricas (Hoyos, 1997; Lebeer *et al.* 2008;) bem como exibir propriedades tecnológicas

como ser viável em altas densidades populacionais, ter fácil proliferação *in vitro* e manter suas funções benéficas durante toda a cadeia produtiva (Gaagìa *et al.*, 2010).

Além disso, o microrganismo deve ter suas propriedades probióticas validadas em testes *in vitro* e *in vivo*, como produzir substâncias antagonistas e antimicrobianas, persistir no trato gastrointestinal, competir pela microbiota residente e exercer pelo menos uma das características benéficas: (I) manter a homeostase da microbiota em um contexto de infecção, (II) promover a função de barreira epitelial ou (III) modular a resposta imune (Lebeer *et al.* 2008; Gaagìa *et al.*, 2010).

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1- Objetivo Geral

Isolar e selecionar, de acordo com seus potenciais funcionais e probióticos, novas linhagens de BAL's oriundas das mucosas oral, vaginal e intestinal de bovinos para possível uso como promotor de crescimento ou como adjuvante imune em vacinas de mucosa.

2.2- Objetivos Específicos

1- Isolamento e identificação: Estabelecer culturas em meio específico para o isolamento de bactérias lácticas oriundas das fezes e das mucosas orais e vaginais e identificá-las pela análise de restrição enzimática da região 16S-23S amplificada e/ou sequenciamento da região 16S do rDNA.

2- Avaliar os potenciais funcionais e probióticos dos isolados em testes *in vitro*: (1) a capacidade dos isolados em resistir ao suco gástrico e sais biliares artificiais, (2) o potencial de colonização dos isolados através da natureza hidrofóbica da superfície celular, (3) a capacidade antagonista dos isolados a bactérias patogênicas de interesse econômico, (4) a capacidade produtora de peróxido de hidrogênio pelos isolados e (5) a presença de marcadores de resistência através do antibiograma.

3- Selecionar pelo menos uma linhagem oriunda de cada um dos sítios de isolamento para avaliar a capacidade de colonização e a indução da produção de IgA nas mucosas em modelo animal de camundongo isento de germes.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Amostragem

As amostras foram obtidas pelos raspados bucais, vaginais e de fezes de quatro novilhas (até um ano de idade) e três bezerros holandeses lactentes (até trinta dias de idade) isentos de tratamento antibiótico, pertencentes à fazenda São João localizada no município de Inhaúma, Minas Gerais. O material coletado foi mantido a 4°C durante o transporte até o processamento imediato no Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos (LEFM) localizado no Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

3.2- Isolamento, caracterização morfológica e armazenamento

As amostras foram tituladas em salina tamponada (5,61g NaCl, 1,0g KH₂PO₄, Na₂HPO₄, 0,11g KCl por litro), plaqueadas em meio ágar De Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (Merck, Darmstadt, Alemanha) e mantidas em câmara anaeróbia (Forma Scientific, Marietta, Estados Unidos) contendo uma atmosfera de 85% de N₂, 10% de H₂ e 5% de CO₂, no período de 18 a 48 horas à 37°C. As bactérias com diferentes morfotipos foram então isoladas com o auxílio de uma alça de platina e plaqueadas por esgotamento em meio ágar MRS (Difco Laboratories Inc., Detroit, Estados Unidos) nas mesmas condições anteriores. Deste isolado, apenas uma colônia por placa foi alçada e crescida em 5 mL de caldo MRS.

A caracterização morfológica se deu pelo método de Gram e as bactérias positivas e com formato bacilar ou coco-bacilar foram selecionadas e armazenadas em ultrafreezer -80°C (Coldlab, Piracicaba, Brasil) em caldo MRS (Difco Laboratories Inc., Detroit, Estados Unidos) suplementado com 20% de Glicerol.

3.3-Identificação molecular dos isolados

Os isolados selecionados foram mantidos por 18hs em 10 mL de meio caldo MRS (Difco Laboratories Inc., Detroit, Estados Unidos). As amostras foram centrifugadas a 8000 x g por 10 minutos, lavadas com 1 mL de água deionizada, suspensas em 1 mL de LiCl 5M e mantidas sob agitação durante uma hora. Em seguida, foi procedido outra centrifugação, o precipitado foi lavado com 1 mL de água deionizada e suspenso em tampão protoplasmático (50mM de Tris-HCl pH 8.0, 10mM de EDTA e 25mM de Sacarose) suplementado com lisozima (10mg/mL) e mantido a 37°C durante uma hora. A amostra foi mais uma vez centrifugada e o DNA genômico foi obtido utilizando-se o kit NucleoSpin Tissue XS (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha) de acordo com as recomendações do fabricante.

O método de identificação baseou-se na análise de restrição do DNA ribossômico amplificado de acordo com Moreira *et al.* (2005), utilizando os três polimorfismos de tamanho observados no Espaçador Transcrito Interno I (ITS I - do inglês *Internal Transcribed Spacer I*) entre os genes

codificadores das subunidades ribossômicas 16S e 23S. Os espaçadores mais as regiões conservadas a 3' do gene 16S e 5' do gene 23S foram amplificados em uma única reação utilizando 10 pmols dos iniciadores 16-1A (5' GAA TCG CTA GTA ATC G 3') e 23-1B (5' GGG TTC CCC CAT TCG GA 3') descritos por Tilsala *et al.* (1997), PCR Master Mix (Promega Corporation, Madison, Estados Unidos) com 0,2mM de cada desoxiribonucleotídeo trifosfato, 1,5mM de MgCl₂, 1,5 unidades (U) de *Taq* DNA polimerase e 10ng de DNA. A amplificação se deu ao longo de 35 ciclos (95°C por 30 segundos, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto) após a desnaturação inicial (95°C por 2 minutos) e finalizada pela extensão final (72°C por 5 minutos). Os três espaçadores amplificados foram submetidos à restrições enzimáticas independentes utilizando as seguintes endonucleases: *SphI*, *NcoI*, *NheI*, *SspI*, *Csp45I*, *EcoRV*, *DraI*, *VspI*, *HincII*, *EcoRI*, *HindIII* (Promega, Madison, Estados Unidos) e *AvrII* (New England Biolabs Inc., Ipswich, Estados Unidos). Os produtos amplificados e digeridos foram corridos em gel de agarose 1,4% e observados em transluminador ultravioleta após a coloração com brometo de etídio. Os perfis de restrição obtidos foram comparados com os perfis de bactérias de referência ou de isolados previamente identificados pertencentes ao gênero *Lactobacillus* (Anexo 1).

Para isolados os quais os perfis de restrição não foram descritos de acordo com aqueles observados no Anexo I lançou-se mão do sequenciamento e análise da região 16S do rDNA. As reações de amplificação foram realizadas utilizando 30pmols dos primers 27F (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') e 1492R (5' GGT TAC CTT GTT ACG ACT T 3') descritos por Lane (1991), 10ng de DNA molde e PCR Master Mix (Promega Corporation, Madison, Estados Unidos), com 0,2mM de cada desoxiribonucleotídeo trifosfato, 1,5mM de MgCl₂, 1,5 U de *Taq* DNA polimerase. O programa de amplificação foi o mesmo utilizado para a região 16S-23S do rDNA. Os amplicons foram purificados utilizando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Corporation, Madison, Estados Unidos) e sequenciados no Núcleo de Análise de Genoma e Expressão Gênica (NAGE), UFMG, usando o kit DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing (GE Healthcare, Piscataway, Estados Unidos) para os sistema de sequenciamento automático MegaBACE 1000 (GE Healthcare, Piscataway, Estados Unidos). As sequências obtidas foram comparadas com aquelas depositadas no GenBank, utilizando o algoritmo BLASTn 2.215 do pacote Basic Locus Alignment Search Tool 2.0 (BLAST 2.0) disponível no portal do Centro Nacional para Informação em Biotecnologia (NCBI - do inglês National Center of Biotecnology Information - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

3.4- Caracterização funcional e probiótica *in vitro*

Todos os experimentos para caracterização funcional e probiótica dos isolados foram realizados três vezes independentes e em triplicata, com exceção dos testes de antagonismo e antibiograma que foram realizados duas vezes independentes.

3.4.1- Reativação

Os isolados congelados foram reativados através de um inóculo de 2% (v/v) em 5 mL de meio caldo MRS (Difco Laboratories Inc., Detroit, Estados Unidos) e mantidos em anaerobiose (85% de N₂, 10% de H₂ e 5% de CO₂) durante 18 horas. As colônias mantidas nessas condições serviram como segundo inóculo em 5 mL de caldo MRS e mantido nas mesmas condições anteriores.

3.4.2- Resistência ao suco gástrico artificial

A avaliação da resistência ao suco gástrico artificial foi realizada de acordo com Neumann (1991) e adaptada para microplaca. As culturas em fase estacionária foram diluídas 10X em solução salina 0,9%, pH 7.0 (controle) e em suco gástrico artificial (2g/L NaCl, pepsina 3,2 g/L, pH 2,5) (teste). As amostras foram incubadas a 37°C durante 3hs, centrifugadas por 1 minuto a 13000rpm e suspendidas em caldo MRS (Difco Laboratories Inc., Detroit, Estados Unidos). As suspensões bacterianas foram alíquotadas em microplacas e incubadas à 37°C. A densidade óptica no espectro de 620_{nm} (OD_{620nm} - do inglês *Optical Density*) foram avaliadas a cada 30 minutos durante 12 horas em espectrofotômetro (Microplate Spectrophotometer System SpectraMax 340, Molecular Devices, Sunnyvale, Estados Unidos) para o estabelecimento das curvas de crescimento. As áreas sob as curvas controle e teste foram calculadas através do software Origin 7.0 (OriginLab Corp., Northampton, Estados Unidos) e a porcentagem de inibição relativa foi estabelecida pela razão da área teste sobre a área controle. Os isolados foram categorizados como resistentes, tolerantes e sensíveis para, respectivamente, valores de inibição menores que 33,0%, valores entre 33,1% e 65,9% e valores acima de 66,0%.

3.4.3- Resistência aos sais biliares artificiais

A avaliação da resistência a sais biliares foi realizada de acordo com Walker & Gilliland (1993). As bactérias ativadas e em fase estacionária foram inoculadas (2% (v/v)) em meio caldo MRS (controle) e caldo MRS contendo 0,3% (v/v) de Oxgall (Difco Laboratories Inc., Detroit, Estados Unidos) (teste) e incubadas à 37°C. As leituras espectrofotométricas (OD_{620nm}) ocorreram a cada 30 minutos durante 12 horas em espectrofotômetro (Microplate Spectrophotometer System SpectraMax 340, Molecular Devices, Sunnyvale, Estados Unidos) para o estabelecimento das curvas de crescimento. As áreas sob as curvas controle e teste foram calculadas através do software Origin 7.0 (OriginLab Corp., Northampton, Estados Unidos) e a porcentagem de inibição relativa foi estabelecida pela razão da área teste sobre a área controle. Os isolados foram categorizados como resistentes, tolerantes e sensíveis para, respectivamente, valores de inibição menores que 33,0%, valores entre 33,1% e 65,9% e valores acima de 66,0%.

3.4.4- Teste de hidrofobicidade da parede celular

A hidrofobicidade da superfície celular foi avaliada pela medida de partição a solventes orgânicos (MATS - do inglês *Microbial Adhesion to Solvents*). Um mL de culturas dos isolados em fase estacionária foram centrifugadas (3500rpm/10minutos), lavadas duas vezes com 1mL de PBS

(137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 4,3 mM de Na₂HPO₄ e 1,47 mM de KH₂PO₄, pH final de 7,4) e suspensas em 1mL de solução de KNO₃ (0,1 Molar, pH 6,2). A densidade óptica (600nm) foi ajustada para valores entre 0,5 e 0,9 (A0). Em seguida, 120µL das suspensões bacterianas foram aliqüotadas e houve a adição de 20µL de Xileno, as amostras permaneceram 10 minutos em repouso seguido de homogeneização em vortex por 2 minutos e mantidas novamente em repouso durante 50 minutos. A fase aquosa foi removida e a densidade óptica foi estabelecida (A1). A MATS foi avaliada pela porcentagem de bactérias associadas ao Xilol através da razão de (A0-A1) sobre A0. Os isolados foram categorizados como hidrofóbicos para valores de MATS maiores ou iguais a 50%.

3.4.5- Antagonismos a bactérias patogênicas

Placas contendo ágar MRS (Difco Laboratories Inc., Detroit, Estados Unidos) foram preparadas e armazenadas 24 horas a 4°C e em seguida incubadas durante 12hs a 37°C para secagem. Cinco microlitros dos isolados reativados e em fase estacionária foram inoculados mantendo um spot definido e mantidos por 18hs em anaerobiose (85% de N₂, 10% de H₂ e 5% de CO₂) a 37°C. Em meio *Brain Heart Infusion* (BHI) caldo (Acumedia Neogen Corp., Lansing, Estados Unidos) sete bactérias patogênicas - *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Escherichia coli* ATCC 25723, *Salmonella enterica* ATCC 14028 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853 - foram ativadas com inóculo de 2% e crescidas a 37°C durante 18 horas, dois repiques foram realizados. Os patógenos ativados foram inoculados (2%) em BHI semi-sólido (0,75% de ágar bacteriológico) e foram despejados sobre as placas contendo os isolados previamente mortos com vapor de clorofórmio (2mL em papel filtro por 1h), formando uma sobrecamada. A atividade antagonista foi avaliada medindo-se os halos de inibição com paquímetro digital (Mitutoyo Sul Americana Ltda., Santo Amaro, Brasil) após a incubação das placas a 37°C durante 12 horas. O antagonismo foi considerado positivo quando a medida do diâmetro halo de inibição encontrava-se maior ou igual a 10 mm.

3.4.6- Produção de peróxido de hidrogênio

A síntese de peróxido de hidrogênio foi avaliada seguindo o método colorimétrico de Rabe e Hillier (2003). Isolados em fase estacionária foram inoculados em placas contendo meio TMB-plus (Brucella Agar 43,0g, TetrametilBenzidina Dihidroclorito 0,25g, Amido 20,0g Solução de hemina (0,05%), 10,0mL, MgSO₄ 0,57g, MgSO₄.H₂O 0,12g, Solução de Peroxidase (0,1%) 10,0mL e Soro de Cavalo, 50mL em 1 litro de água destilada) e mantidos 18 horas a 37°C em anaerobiose e expostas ao ar durante 30 minutos. Os isolados foram categorizados qualitativamente como produtores de peróxido de hidrogênio quando o inóculo adquiria tons azulados devido à atividade oxidante da substância produzida.

3.4.7- Antibiograma

O antibiograma foi realizado através do método de difusão em disco. Os isolados foram mantidos em crescimento em ágar MRS (Difco Laboratories Inc., Detroit, Estados Unidos) em

anaerobiose (85% de N₂, 10% de H₂ e 5% de CO₂) durante 24 horas a 37°C. Em seguida a turbidez das amostras isoladas foi ajustada em salina 0,9% de acordo com a escala nefelométrica de McFarland equivalente a 10⁸ unidades formadoras de colônia (UFC) por mililitro – referente ao tubo de número 0,5 da escala. As amostras ajustadas foram espalhadas em placas de Petri contendo ágar MRS (Difco Laboratories Inc., Detroit, Estados Unidos) com o auxílio de zaragatoa estéril, cobrindo totalmente a superfície do meio. Em seguida os discos antimicrobianos – Amicacina (30µg), Ampicilina (10µg), Cloramfenicol (30µg), Eritromicina (15µg), Penicilina (10 U), Oxacilina (1µg) e Vancomicina (30µg) (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) - foram depositados sobre a superfície das placas e incubados em anaerobiose durante 48 horas à 37°C. Os halos de inibição de crescimento foram medidos com paquímetro digital (Mitutoyo Sul Americana Ltda., Santo Amaro, Brasil) e os isolados foram categorizados para cada um dos antibióticos como sensíveis, moderadamente sensíveis ou resistentes de acordo com Charteris *et al.* (1998).

3.5- Caracterização probiótica *in vivo*

Camundongos de ambos os sexos pertencentes à linhagem Swiss NIH (Taconic, Germantown, Estados Unidos) com padrão sanitário axênico, de sete a oito semanas de vida, foram retirados do biotério de Gnotobiologia da UFMG e foram mantidos em mini-isoladores Alesco ALE.MIL.01.03 (Alesco Ind. e Com. Ltda., SP, Brasil) em biotério com controle circadiano (12 horas diurno/12 horas noturno) e de temperatura (18°C a 23°C) ao longo de todo o experimento. Os animais receberam *ad libitum* ração sólida e água esterilizadas, respectivamente, por calor seco e úmido. O experimento foi realizado em duplicata, utilizando três animais em cada grupo amostral. O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG e as documentações referentes às permissões encontram-se no protocolo de número 203/2009, aprovado em 09/02/2009.

3.5.1- Monoassociação e avaliação da colonização das mucosas

Quatro isolados, um oriundo de cada uma das mucosas oral e vaginal e dois oriundos das fezes foram selecionados, baseado nos testes *in vitro*, quanto suas características funcionais e probióticas. Os animais foram contidos e monoassociados (dose única) em condições estéreis com 10⁶ UFC's (volume de 10µL) pela via intranasal ou intravaginal com, respectivamente, um isolado bucal (G1) e um vaginal (G2) previamente selecionados. Dois isolados pertencentes às fezes foram usados para a monoassociação, nas mesmas condições anteriores, através de um inóculo de 10⁸ UFC's (volume de 100µL) pela via intragástrica (Grupos G3 e G4). O controle negativo (G0) utilizado foram camundongos axênicos. No décimo dia os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e foram coletados os seguintes materiais: Grupo G1: traqueia e pulmão; G2: vagina; G3 e G4: intestinos. No grupo G0 foram coletados todos os materiais anteriormente citados. Os órgãos e as fezes foram pesados, macerados, titulados, plaqueados em ágar MRS (Difco Laboratories Inc., Detroit, Estados Unidos) e incubados em anaerobiose (85% de N₂, 10% de H₂ e 5% de CO₂) no período de 24 a 48 horas a 37°C a fim de se obter as contagens microbiológicas.

3.5.2- Avaliação da indução da produção de Imunoglobulina A (IgA)

Os pulmões, os fluidos vaginais e intestinais dos animais pertencentes, respectivamente, aos grupos G1, G2 e G3/G4 foram coletados no décimo dia após a monoassociação dos animais. O material foi pesado, homogeneizado e diluído na proporção de 1:4 em salina tamponada suplementada com coquetel de inibidor de protease (1,04mM AEBSF, 800nM Aprotinin, 40µM Bestatin, 140µM E-64, 200µM Leupeptin, 150µM Pepstatin A) (Sigma-Aldrich Co., Saint. Louis, Estados Unidos) e armazenados a -20°C até seu processamento. Amostras recém-descongeladas foram centrifugadas à 2000 X g por 30 minutos a 4°C. Os níveis de IgA foram avaliados por ELISA de captura usando anticorpos anti-IgA de camundongo produzido em cabra (Sigma-Aldrich Co., Saint. Louis, Estados Unidos) e anticorpos anti-IgA de camundongo conjugado com peroxidase produzido em cabra (Sigma-Aldrich Co., Saint. Louis, Estados Unidos). A reação colorimétrica foi avaliada utilizando-se o-fenileno-diamino (OPD, Sigma-Aldrich Co., Saint. Louis, Estados Unidos) como substrato. As concentrações da imunoglobulina foram determinadas usando um padrão de IgA purificado (Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, Estados Unidos).

3.5.3- Análises estatísticas

As análises foram realizadas no software BioEstat 5.0. Foram realizados os testes de normalidade de Kolmogorov-Smirnov para os dados obtidos. As análises das variâncias das médias entre os grupos foram avaliadas pelo teste de Tukey, sendo considerados estatisticamente significativos valores de significância maior que 95% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1- Isolamento, caracterização morfológica e identificação

Cento e nove linhagens bacterianas foram submetidas à coloração de Gram, selecionando-se 77 isolados que se adequaram aos critérios de seleção quanto à constituição e forma da parede celular: coloração Gram-positiva e formato bacilar ou coco-bacilar. Do total de isolados selecionados, 28 foram oriundos da mucosa oral, 2 da mucosa vaginal e 47 das fezes.

A identificação ao nível de espécie seguiu a proposta de Moreira *et al.* (2005), através da avaliação dos perfis de restrição enzimática dos polimorfismos de tamanho observados nos três Espaçadores Transcritos Internos I (ITS I - do inglês *Internal Transcribed Spacer I*) entre os genes codificadores das subunidades ribossômicas 16S e 23S. Esse método é capaz de discernir preditivamente o gênero de BAL's comumente cultivado em meio MRS, devido ao número e a diferenças de tamanho encontradas na região ITS de determinadas espécies: *Streptococcus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc*, apresentam apenas um tipo de espaçador, que quando amplificado é capaz de formar apenas uma banda; *Enterococcus*, *Oenococcus* apresentam dois tipos de espaçadores; e *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Weissella* apresentam três. Desse modo, isolados previamente selecionados tiveram seus ácidos desoxirribonucleicos extraídos e submetidos à técnica em questão. Dos 77 isolados, 7 apresentaram apenas uma banda, sendo preditivamente classificados como pertencentes aos gêneros *Streptococcus/Lactococcus/Leuconostoc*, sendo retirados do pool de amostragem.

Em seguida, procedeu-se a digestão enzimática dos amplicons referente às amostras pertencentes ao gênero *Lactobacillus/Pediococcus/Weissella* (70 isolados). Doze enzimas foram utilizadas (*SphI*, *NcoI*, *NheI*, *SspI*, *Csp45I*, *EcoRV*, *DraI*, *VspI*, *HindII*, *EcoRI*, *HindIII* e *AvrII*) e com elas foi possível identificar nove espécies de *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. animalis*, *L. casei*, *L. farciminis*, *L. fermentum*, *L. johnsonii*, *L. perolens*, *L. reuteri* e *L. salivarius*) pela comparação dos perfis obtidos com aqueles previamente estabelecidos (**Anexo I**).

L. acidophilus, *L. animalis*, *L. casei*, *L. farciminis*, *L. fermentum*, *L. johnsonii*, *L. perolens*, e *L. salivarius* foram identificados pela análise direta dos perfis encontrados no Anexo I. *L. reuteri* teve sua identificação confirmada pelo sequenciamento da região do rDNA 16S, uma vez que seu perfil de restrição identificava-se com os perfis de *L. panis* e *L. pontis* (**Figura 6**). Além disso, três grupos de isolados não apresentaram perfis semelhantes com aqueles encontrados no Anexo I e também tiveram o sequenciamento da região do rDNA 16S realizado, confirmando a identificação dos mesmos como *W. cibaria*, *W. hellenica* e *W. paramesenteroides* (**Apêndice A e Figura 6**).

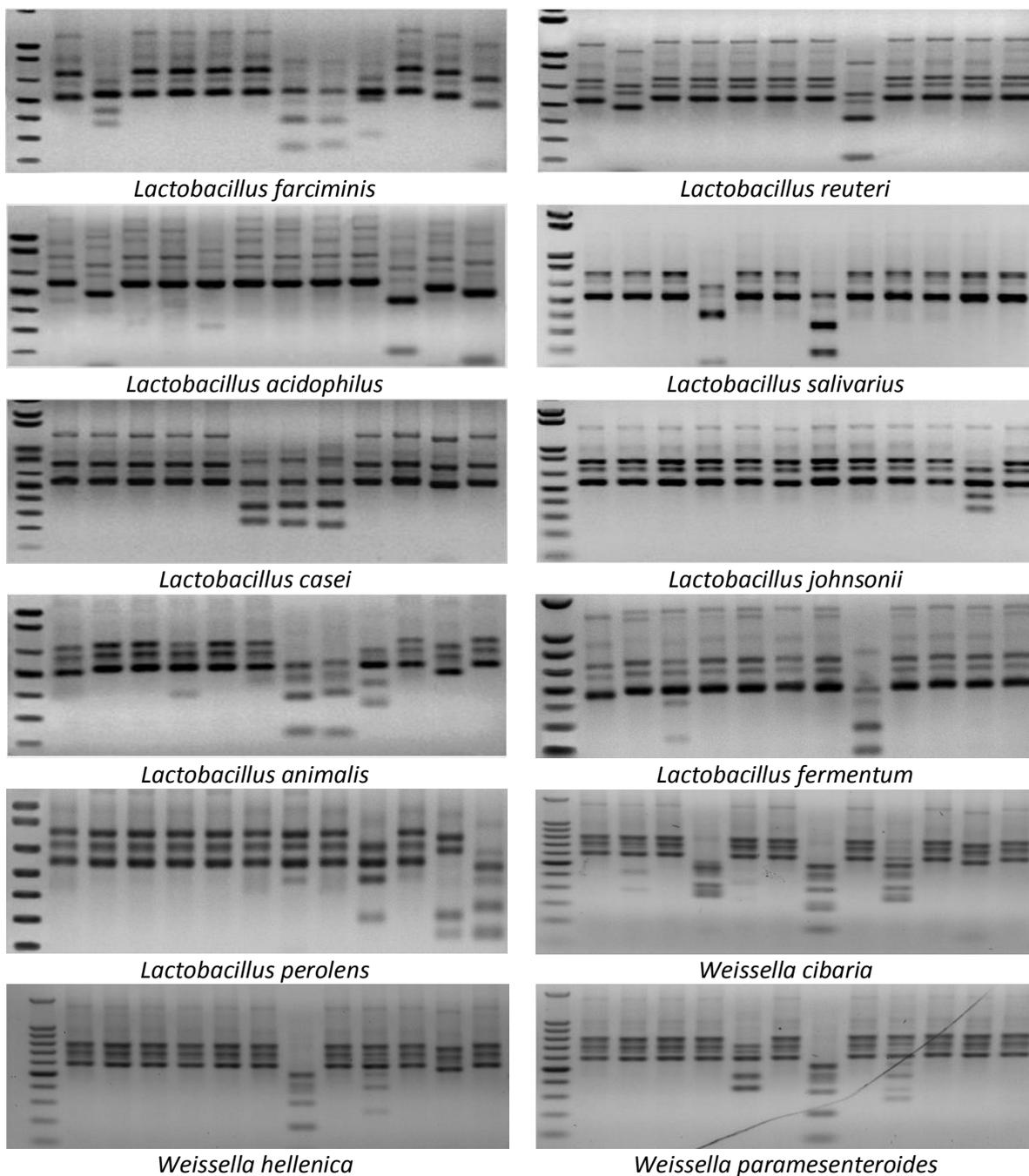


Figura 6: Perfis de restrição dos isolados e suas identificações ao nível de espécie. *L. reuteri*, *W. cibaria*, *W. hellenica* e *W. paramesenteroides* tiveram suas identificações confirmadas pelo sequenciamento do rDNA 16S.

Dos 28 isolados orais, *L. fermentum* foi a espécie predominante (53,5%), seguido de *W. paramesenteroides* (35,5%), *W. cibaria* (7,5%) e *L. perolens* (3,5%), na mucosa vaginal, foram obtidos dois isolados pertencentes à espécie *W. hellenica* (Tabela 1).

Tabela 1: Relação dos isolados orais e vaginais e suas respectivas identificações ao nível de espécie.

Isolados Oraís			
Isolado	Identificação	Isolado	Identificação
V1B - 01	<i>Lactobacillus fermentum</i>	V2B - 05	<i>Lactobacillus perolens</i>
V1B - 02	<i>Lactobacillus fermentum</i>		
V1B - 03	<i>Lactobacillus fermentum</i>	V3B - 12	<i>Weissella cibaria</i>
V1B - 04	<i>Lactobacillus fermentum</i>	VL1 - 15	<i>Weissella cibaria</i>
V3B - 08	<i>Lactobacillus fermentum</i>		
V3B - 09	<i>Lactobacillus fermentum</i>	V2B - 06	<i>Weissella paramesenteroides</i>
V3B - 10	<i>Lactobacillus fermentum</i>	V3B - 07	<i>Weissella paramesenteroides</i>
V1L - 13	<i>Lactobacillus fermentum</i>	V3B - 11	<i>Weissella paramesenteroides</i>
V2L - 18	<i>Lactobacillus fermentum</i>	V1L - 14	<i>Weissella paramesenteroides</i>
V2L - 20	<i>Lactobacillus fermentum</i>	V1L - 16	<i>Weissella paramesenteroides</i>
V3L - 24	<i>Lactobacillus fermentum</i>	V1L - 17	<i>Weissella paramesenteroides</i>
V3L - 25	<i>Lactobacillus fermentum</i>	V2L - 19	<i>Weissella paramesenteroides</i>
V3L - 26	<i>Lactobacillus fermentum</i>	V2L - 21	<i>Weissella paramesenteroides</i>
V3L - 27	<i>Lactobacillus fermentum</i>	V2L - 22	<i>Weissella paramesenteroides</i>
V3L - 28	<i>Lactobacillus fermentum</i>	V3L - 23	<i>Weissella paramesenteroides</i>
Isolados Vaginais			
Isolado	Identificação	Isolado	Identificação
V1V - 29	<i>Weissella hellenica</i>	V1V - 30	<i>Weissella hellenica</i>

Das fezes foram obtidas sete espécies, sendo *L. reuteri* a predominante (77,5%), seguido de *L. johnsonii* (10%), *L. acidophilus*, *L. animalis*, *L. casei*, *L. farciminis* e *L. salivarius* tiveram a abundância relativa de 2,5 % com apenas um isolado representando cada espécie (**Tabela 2**). Trabalhos recentes limitam-se ao isolamento e caracterização probiótica de linhagens oriunda das mucosas intestinais (Soto *et al.*, 2010, Maldonado *et al.*, 2012, Ripamonti *et al.*, 2011, Ayeni *et al.*, 2011), negligenciando os potenciais associados à microbiota de outras mucosas. Nesses trabalhos bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Weissella* foram isolados destacando-se as espécies *L. reuteri*, *L. fermentum*, *L. johnsonii*, *L. animalis*, *L. casei*, *L. farciminis* e *L. salivarius* além de *W. paramesenteroides* e *W. confusa*.

Tabela 2: Relação dos isolados fecais e suas respectivas identificações ao nível de espécie.

Isolados Fecais					
Isolado	Identificação	Isolado	Identificação	Isolado	Identificação
B1F - 36	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	B1F - 35	<i>Lactobacillus reuteri</i>	B5F - 09	<i>Lactobacillus reuteri</i>
		B2F - 41	<i>Lactobacillus reuteri</i>	B6F - 01	<i>Lactobacillus reuteri</i>
B4F - 04	<i>Lactobacillus animalis</i>	B4F - 01	<i>Lactobacillus reuteri</i>	B6F - 02	<i>Lactobacillus reuteri</i>
		B4F - 03	<i>Lactobacillus reuteri</i>	B6F - 03	<i>Lactobacillus reuteri</i>
B4F - 02	<i>Lactobacillus casei</i>	B4F - 07	<i>Lactobacillus reuteri</i>	B6F - 04	<i>Lactobacillus reuteri</i>
		B4F - 08	<i>Lactobacillus reuteri</i>	B6F - 05	<i>Lactobacillus reuteri</i>
B4F - 06	<i>Lactobacillus farciminis</i>	B4F - 09	<i>Lactobacillus reuteri</i>	B6F - 06	<i>Lactobacillus reuteri</i>
		B5F - 01	<i>Lactobacillus reuteri</i>	B6F - 07	<i>Lactobacillus reuteri</i>
B1F - 34	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	B5F - 02	<i>Lactobacillus reuteri</i>	B6F - 08	<i>Lactobacillus reuteri</i>
B2F - 40	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	B5F - 03	<i>Lactobacillus reuteri</i>	B6F - 10	<i>Lactobacillus reuteri</i>
B3F - 44	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	B5F - 04	<i>Lactobacillus reuteri</i>	B6F - 11	<i>Lactobacillus reuteri</i>
B3F - 46	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	B5F - 05	<i>Lactobacillus reuteri</i>	B3F - A	<i>Lactobacillus reuteri</i>
		B5F - 06	<i>Lactobacillus reuteri</i>	B3F - B	<i>Lactobacillus reuteri</i>
B1F - 31	<i>Lactobacillus reuteri</i>	B5F - 07	<i>Lactobacillus reuteri</i>	B3F - C	<i>Lactobacillus reuteri</i>
B1F - 32	<i>Lactobacillus reuteri</i>	B5F - 08	<i>Lactobacillus reuteri</i>		
				B2F - 38	<i>Lactobacillus salivarius</i>

4.2- Caracterização funcional e probiótica *in vitro*

As avaliações dos aspectos funcionais e dos potenciais probióticos foram realizados com o objetivo de se observar o comportamento específico das linhagens e de estabelecer critérios para a seleção para posteriores testes *in vivo*, sendo realizadas em todos os isolados pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Weissella*, independente do sítio de isolamento, oral, vaginal ou intestinal.

4.2.1 – Resistência ao suco gástrico e sais biliares artificiais

Para o estabelecimento das funções benéficas, um probiótico deve apresentar características adaptativas que lhes permitem resistir e proliferar ao trânsito gastrointestinal, como as variações de pH e osmolaridade e bem como a ação dos fluidos gástricos e entéricos (Hoyos, 1997; Lebeer *et al.* 2008). O suco gástrico, devido ao pH extremamente reduzido e à presença de enzimas proteolíticas, atua reduzindo a diferença de pH intra e extracelular, desbalanceando processos de transporte transmembrana, além de promover a desnaturação e degradação proteica. Os sais biliares são constituídos por moléculas anfipáticas com potencial antimicrobiano, apresentando atividade sobre a superfície bacteriana além de agir como detergente destruindo diretamente a membrana (Lebeer *et al.*, 2008). Portanto, o suco gástrico e os sais biliares constituem uma classe de substâncias de importância uma vez que é capaz reduzir drasticamente as populações microbianas (Gaagia *et al.*, 2010), podendo interferir no efeito probiótico. Nesse sentido, os isolados obtidos foram expostos a essas substâncias, avaliando-se a cinética de crescimento nas condições adversas.

Os gráficos referentes aos resultados à exposição ao suco gástrico e sais biliares são apresentados no **Apêndice B e C**, respectivamente, e a porcentagem de inibição para cada isolado é apresentado na **Tabela 3**. Experimentos têm demonstrado que linhagens de BAL's geralmente são tolerantes ao suco gástrico artificial em estudos *in vitro* (Mirlohi *et al.*, 2009; Ripamonti, *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2013), sendo observado resultados semelhantes nesse trabalho. Nesse aspecto, somente o isolado oral *W. paramesenteroides* V3B-07, o isolado vaginal *W. hellenica* V1V-30 e os isolados fecais *L. johnsonii* B1F-34 e *L. johnsonii* B2F-40 foram considerados moderadamente sensíveis (inibição entre 33% e 66%). O restante da amostragem apresentou inibição de crescimento menor que 33% e foram consideradas resistentes.

A origem de isolamento tem sido relatada como um critério relevante para a seleção de probióticos, uma vez que é esperada uma melhor capacidade adaptativa e, conseqüentemente, melhores características funcionais das linhagens oriundas de um ambiente semelhante àquele em que ela foi isolada (Morelli, 2000; Saarela, 2000; Gaagia *et al.*, 2010). Tal fato foi observado no desafio aos sais biliares onde, de um modo geral, os isolados provenientes da mucosa intestinal apresentaram melhor capacidade de crescimento quando submetido a esse tipo de estresse. De um modo geral, 50% dos isolados orais foram categorizados como sensíveis (inibição acima de 66%), 46,5% como moderadamente sensíveis (inibição entre 33% e 66%) e 3,5% como resistente (inibição

abaixo de 33%). Em contrapartida, os isolados fecais foram considerados sensíveis para somente 15% das amostras, moderadamente sensíveis para 37,5% e 47,5% considerados resistentes, destacando-se *L. reuteri* B3F-B com apenas 4,72% de inibição.

Tabela 3: Porcentagem de inibição dos isolados orais e vaginais frente ao desafio do suco gástrico e sais biliares artificiais. SG (Suco gástrico). SB (Sais biliares).

Isolados Oraís					
Isolado	SG (%)	SB (%)	Isolado	SG (%)	SB (%)
<i>L. fermentum</i> V1B-01	0,00	76,65	<i>L. perolens</i> V2B-05	0,00	68,29
<i>L. fermentum</i> V1B-02	6,59	45,97			
<i>L. fermentum</i> V1B-03	0,00	80,31	<i>W. cibaria</i> V3B-12	2,72	79,62
<i>L. fermentum</i> V1B-04	8,72	44,79	<i>W. cibaria</i> VL1-15	2,71	71,97
<i>L. fermentum</i> V3B-08	17,23	14,75			
<i>L. fermentum</i> V3B-09	0,29	38,76	<i>W. paramesenteroides</i> V2B - 06	0,00	71,65
<i>L. fermentum</i> V3B-10	30,77	62,42	<i>W. paramesenteroides</i> V3B - 07	41,79	77,79
<i>L. fermentum</i> V1L-13	4,03	48,09	<i>W. paramesenteroides</i> V3B - 11	0,00	72,20
<i>L. fermentum</i> V2L-18	7,42	43,76	<i>W. paramesenteroides</i> V1L - 14	21,88	91,84
<i>L. fermentum</i> V2L-20	5,24	72,51	<i>W. paramesenteroides</i> V1L - 16	17,07	75,35
<i>L. fermentum</i> V3L-24	0,00	41,01	<i>W. paramesenteroides</i> V1L - 17	15,19	56,84
<i>L. fermentum</i> V3L-25	12,12	67,99	<i>W. paramesenteroides</i> V2L - 19	13,29	60,63
<i>L. fermentum</i> V3L-26	15,97	63,89	<i>W. paramesenteroides</i> V2L - 21	7,63	58,26
<i>L. fermentum</i> V3L-27	3,27	81,39	<i>W. paramesenteroides</i> V2L - 22	11,37	52,68
<i>L. fermentum</i> V3L-28	16,79	54,92	<i>W. paramesenteroides</i> V3L - 23	0,00	55,89
Isolados Vaginais					
Isolado	SG (%)	SB (%)	Isolado	SG (%)	SB (%)
<i>W. hellenica</i> V1V-29	0,57	83,80	<i>W. hellenica</i> V1V-30	45,86	72,27
Isolados Fecais					
Isolado	SG(%)	SB(%)	Isolado	SG(%)	SB(%)
<i>L. acidophilus</i> B1F-36	3,64	68,12	<i>L. reuteri</i> B5F-02	14,24	14,35
			<i>L. reuteri</i> B5F-03	4,44	27,01
<i>L. animalis</i> B4F-04	1,50	65,43	<i>L. reuteri</i> B5F-04	0,03	29,95
			<i>L. reuteri</i> B5F-05	14,07	35,50
<i>L. casei</i> B4F-02	0,00	76,73	<i>L. reuteri</i> B5F-06	11,44	17,27
			<i>L. reuteri</i> B5F-07	1,51	24,54
<i>L. farciminis</i> B4F-06	6,10	52,20	<i>L. reuteri</i> B5F-08	13,00	23,81
			<i>L. reuteri</i> B5F-09	16,22	26,91
<i>L. johnsonii</i> B1F-34	39,98	98,85	<i>L. reuteri</i> B6F-01	6,10	27,15
<i>L. johnsonii</i> B2F-40	34,42	100,00	<i>L. reuteri</i> B6F-02	10,08	24,79
<i>L. johnsonii</i> B3F-44	19,49	54,44	<i>L. reuteri</i> B6F-03	15,89	29,71
<i>L. johnsonii</i> B3F-46	1,08	61,61	<i>L. reuteri</i> B6F-04	11,45	22,65
			<i>L. reuteri</i> B6F-05	12,21	25,46
<i>L. reuteri</i> B1F-31	0,00	54,45	<i>L. reuteri</i> B6F-06	19,53	18,23
<i>L. reuteri</i> B1F-32	3,64	28,09	<i>L. reuteri</i> B6F-07	6,87	36,62
<i>L. reuteri</i> B1F-35	1,68	60,13	<i>L. reuteri</i> B6F-08	9,74	43,28
<i>L. reuteri</i> B2F-41	7,06	68,25	<i>L. reuteri</i> B6F-10	1,74	23,18
<i>L. reuteri</i> B4F-01	16,51	26,11	<i>L. reuteri</i> B6F-11	19,08	20,34
<i>L. reuteri</i> B4F-03	6,41	37,51	<i>L. reuteri</i> B3F-A	0,03	33,86
<i>L. reuteri</i> B4F-07	5,33	47,36	<i>L. reuteri</i> B3F-B	15,23	4,72
<i>L. reuteri</i> B4F-08	6,68	45,04	<i>L. reuteri</i> B3F-C	5,33	32,62
<i>L. reuteri</i> B4F-09	14,24	36,24			
<i>L. reuteri</i> B5F-01	10,89	42,85	<i>L. salivarius</i> B2F-38	15,91	100,00

4.2.2- Hidrofobicidade da superfície celular

O teste de hidrofobicidade permite avaliar qualitativamente a natureza polar da superfície bacteriana, sendo importante indicador do potencial de adesão do microrganismo em superfícies apolares como as do epitélio intestinal, vaginal e das vias aéreas (Kos *et al.*, 2003). Nesse sentido, a fim de se estabelecer mais um critério de seleção, os isolados foram submetidos à avaliação da polaridade da superfície celular pela interação com o hidrocarboneto apolar Xileno, observado por Pelletier *et al.*, (1997) como um solvente orgânico capaz de mimetizar o aspecto hidrofóbico do epitélio das mucosas.

Os resultados referentes a esse teste encontram-se na **Tabela 4**. Entre os isolados orais, 53,5% e 43,5% foram categorizados como hidrofóbicos e hidrofílicos, respectivamente, destacando *W. paramesenteroides* V3B-11 com 80% de associação ao Xilol. Os isolados vaginais foram hidrofóbicos, destacando a natureza apolar de *W. hellenica* V1V-30 próximo de 99%. Dentre os isolados fecais, 77,5% apresentaram a característica desejável sendo *L. salivarius* B2F-38 com aproximadamente 100% de associação, a maior encontrada entre todas as amostras.

Apesar da avaliação da polaridade evidenciar o caráter hidrofóbico da parede celular dos isolados, o teste é apenas um indicador primário para adesão de microrganismos nas superfícies epiteliais, uma vez que a interação entre micróbio-hospedeiro é um processo complexo, envolvendo interações específicas molécula-molécula presentes nas superfícies das células epiteliais e dos microrganismos (Lebeer *et al.*, 2008; Mangoni, 2009), sendo necessários ensaios diretos como aqueles realizados em cultivos celulares ou em animais axênicos. Nesse sentido, a avaliação da hidrofobicidade, apesar de fornecer um dado numérico é um teste qualitativo preditivo, devendo-se lançar mão de metodologias mais robustas.

Tabela 4: Adesão microbiológica ao solvente orgânico Xileno. AMSO (Adesão microbiológica a solventes orgânicos)

Isolados Oraais			
Isolado	AMSO(%)	Isolado	AMSO(%)
<i>L. fermentum</i> V1B-01	63,70	<i>L. perolens</i> V2B-05	54,92
<i>L. fermentum</i> V1B-02	56,47		
<i>L. fermentum</i> V1B-03	56,31	<i>W. cibaria</i> V3B-12	61,85
<i>L. fermentum</i> V1B-04	53,61	<i>W. cibaria</i> VL1-15	47,58
<i>L. fermentum</i> V3B-08	60,57		
<i>L. fermentum</i> V3B-09	44,44	<i>W. paramesenteroides</i> V2B-06	51,37
<i>L. fermentum</i> V3B-10	48,59	<i>W. paramesenteroides</i> V3B-07	58,55
<i>L. fermentum</i> V1L-13	47,89	<i>W. paramesenteroides</i> V3B-11	80,64
<i>L. fermentum</i> V2L-18	52,41	<i>W. paramesenteroides</i> V1L-14	47,60
<i>L. fermentum</i> V2L-20	47,12	<i>W. paramesenteroides</i> V1L-16	48,05
<i>L. fermentum</i> V3L-24	52,45	<i>W. paramesenteroides</i> V1L-17	48,55
<i>L. fermentum</i> V3L-25	59,70	<i>W. paramesenteroides</i> V2L-19	46,61
<i>L. fermentum</i> V3L-26	54,66	<i>W. paramesenteroides</i> V2L-21	49,38
<i>L. fermentum</i> V3L-27	46,33	<i>W. paramesenteroides</i> V2L-22	45,97
<i>L. fermentum</i> V3L-28	47,47	<i>W. paramesenteroides</i> V3L-23	50,65
Isolados Vaginais			
Isolado	AMSO(%)	Isolado	AMSO(%)
<i>W. hellenica</i> V1V-29	65,48	<i>W. hellenica</i> V1V-30	98,94

Tabela 4: Continuação.

Isolados Fecais			
Isolado	AMSO(%)	Isolado	AMSO(%)
<i>L. acidophilus</i> B1F-36	70,28	<i>L. reuteri</i> B5F-02	52,46
		<i>L. reuteri</i> B5F-03	72,68
<i>L. animalis</i> B4F-04	67,87	<i>L. reuteri</i> B5F-04	61,24
		<i>L. reuteri</i> B5F-05	49,61
<i>L. casei</i> B4F-02	64,12	<i>L. reuteri</i> B5F-06	60,99
		<i>L. reuteri</i> B5F-07	66,61
<i>L. farciminis</i> B4F-06	56,07	<i>L. reuteri</i> B5F-08	60,32
		<i>L. reuteri</i> B5F-09	48,54
<i>L. johnsonii</i> B1F-34	71,45	<i>L. reuteri</i> B6F-01	55,47
<i>L. johnsonii</i> B2F-40	60,30	<i>L. reuteri</i> B6F-02	56,40
<i>L. johnsonii</i> B3F-44	66,94	<i>L. reuteri</i> B6F-03	48,58
<i>L. johnsonii</i> B3F-46	51,07	<i>L. reuteri</i> B6F-04	46,54
		<i>L. reuteri</i> B6F-05	50,59
<i>L. reuteri</i> B1F-31	90,43	<i>L. reuteri</i> B6F-06	42,14
<i>L. reuteri</i> B1F-32	27,93	<i>L. reuteri</i> B6F-07	48,54
<i>L. reuteri</i> B1F-35	78,00	<i>L. reuteri</i> B6F-08	46,22
<i>L. reuteri</i> B2F-41	74,89	<i>L. reuteri</i> B6F-10	61,02
<i>L. reuteri</i> B4F-01	83,40	<i>L. reuteri</i> B6F-11	55,75
<i>L. reuteri</i> B4F-03	67,05	<i>L. reuteri</i> B3F-A	67,92
<i>L. reuteri</i> B4F-07	54,08	<i>L. reuteri</i> B3F-B	56,22
<i>L. reuteri</i> B4F-08	63,04	<i>L. reuteri</i> B3F-C	61,32
<i>L. reuteri</i> B4F-09	59,68		
<i>L. reuteri</i> B5F-01	47,95	<i>L. salivarius</i> B2F-38	99,85

4.2.3- Antagonismo a bactérias patogênicas e produção de peróxido de hidrogênio

A atividade antagonista é um critério fundamental para a seleção de novas linhagens para a aplicação em animais (Collins *et al.*, 2009), reduzindo a frequência de infecções intestinais e de mucosas além da contaminação das carcaças (Gaagia *et al.*, 2010). Em relação às BAL's várias substâncias estão associadas ao efeito antagonista como o ácido lático, o peróxido de hidrogênio e as bacteriocinas (Collins *et al.*, 2009). Nesse sentido, os isolados foram mantidos em ágar MRS, permitindo sua proliferação e a produção e difusão de substâncias antimicrobianas. Em seguida utilizou-se um amplo espectro de bactérias patogênicas intestinais e sistêmicas a fim de se observar o efeito das substâncias produzidas pelas BAL's sobre as mesmas.

As infecções intestinais, principalmente aquelas provocadas por *Escherichia coli* enterotoxigênica acometem principalmente os bezerros nas primeiras semanas de vida e reduzem as taxas de crescimento, além de provocar morbidade e mortalidade, causando graves prejuízos aos produtores rurais. Os resultados referentes ao antagonismo podem ser observados na **Tabela 5**. A relação antagonica de cada isolado frente a um determinado patógeno foi categorizada como atividade positiva (+) ou negativa (-) baseada na medida dos diâmetros dos halos de inibição. A maioria dos isolados apresentou antagonismo a todos os patógenos testados, exceto alguns isolados fecais os quais não foram capazes de inibir o crescimento de alguns dos patógenos avaliados, principalmente os Gram-negativos *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* e o Gram-positivo

Enterococcus faecium. As medidas dos diâmetros dos halos de inibição podem ser observadas no **Apêndice D**.

O peróxido de hidrogênio é um agente antagonista que pode estar associado à capacidade de colonização vaginal (Vallor *et al.* 2001), sendo importante para a manutenção do equilíbrio da microbiota através do combate a bactérias patogênicas (Collins *et al.*, 2009). Nesse sentido, a avaliação da produção dessa substância se deu de forma qualitativa lançando-se mão do meio TMB-plus (Rabe & Hillier, 2003), no qual o peróxido de hidrogênio produzido por determinadas linhagens é capaz de se complexar com a peroxidase e promover uma reação oxidativa e colorimétrica sobre o tetrametil-benzidina-dihidroclorito, gerando uma coloração azulada.

Na **Tabela 5** encontram-se os resultados quanto à síntese de peróxido de hidrogênio pelos isolados. De um modo geral, e de forma contrária à encontrada por Maldonado *et al.*, 2012 na qual somente cerca de 20% dos isolados orais e intestinais de bovinos foram capazes de produzir o peróxido de hidrogênio, a maioria dos isolados orais (92,8%) e intestinais (82,5%) desse estudo produziu a substância de interesse (**Figura 7**), sendo somente as linhagens *L. fermentum* V2L-18, *W. paramesenteroides* V2L-21, *L. acidophilus* B1F-36, *L. farciminis* B4F-06, *L. johnsonii* B1F-34, *L. johnsonii* B3F-44, *L. johnsonii* B3F-46, *L. reuteri* B1F-31, *L. reuteri* B1F-35 consideradas não produtoras. Os isolados vaginais também foram capazes de produzir a substância, sendo promissora aplicação dessas linhagens nesses sítios para a promoção da homeostase vaginal.

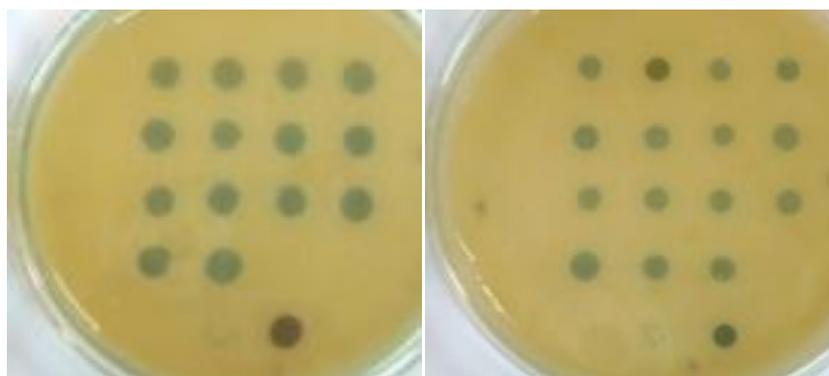


Figura 7: Perfis da síntese de peróxido de hidrogênio de alguns dos isolados de BAL's.

4.2.4- Antibiograma

A presença de resíduos de antibióticos em alimentos de origem animal é cada vez mais preocupante, sendo capazes de selecionar microrganismos resistentes e alterar a terapêutica humana e animal. Além disso, a crescente utilização de diferentes linhagens microbiológicas como culturas iniciadoras ou como aditivo alimentar contendo genes de resistência associados a elementos móveis agravam o quadro uma vez que esses marcadores podem se disseminar para organismos patogênicos. Nesse sentido, a EFSA (do inglês *Europe Food Safety Authority*) estabeleceu critérios para a seleção de microrganismos a serem utilizados como aditivos alimentares, sendo um deles a avaliação da presença de marcadores de resistência de importância médica e veterinária (EFSA, 2008). O antibiograma é um teste que avalia a segurança dos microrganismos, e de certa forma a estabilidade genética, pela presença de marcadores de resistência em elementos móveis, sendo considerado um importante critério para a seleção de novas linhagens de microrganismos a serem utilizados em culturas iniciadoras ou como aditivo alimentar para humanos e animais (EFSA, 2008). Portanto, foi avaliada a susceptibilidade dos isolados frente aos antibióticos pertencentes à classe dos betalactâmicos (ampicilina, penicilina e oxacilina), aminoglicosídeos (amicacina), macrolídeos (eritromicina), fenicóis (cloranfenicol) e glicopeptídeos (vancomicina) pela técnica de difusão de disco.

Os resultados referentes aos perfis antimicrobianos dos isolados encontram-se na **Tabela 6**. Em relação à susceptibilidade à ampicilina e cloramfenicol, todos os isolados foram categorizados como sensíveis. Quanto aos isolados orais todos foram sensíveis à eritromicina, 85,5% sensíveis à penicilina (14,5% moderadamente sensíveis), 85% resistentes à amicacina (10,5% moderadamente sensíveis e 3,5% sensíveis), 92% resistentes à oxacilina (4% sensíveis e moderadamente sensíveis) e 100% resistentes à vancomicina. Os perfis microbianos dos isolados vaginais foram praticamente idênticos, diferindo apenas na susceptibilidade à amicacina (*W. hellenica* V1V-29 resistente e V1V-30 sensível) e penicilina (*W. hellenica* V1V-29 moderadamente sensível e V1V-30 sensível). Dos isolados fecais, 95% foram sensíveis à eritromicina (5% moderadamente sensíveis), 90% sensíveis à penicilina (10% moderadamente sensíveis), 55% resistentes à amicacina (22,5% sensíveis e moderadamente sensíveis), 100% resistentes à oxacilina e 97,5% resistentes à vancomicina (2,5% moderadamente sensíveis).

De um modo geral, os isolados de BAL's desse estudo apresentaram resistência à amicacina, oxacilina e vancomicina, sendo considerada intrínseca para o gênero *Lactobacillus*, uma vez que os marcadores associados encontram-se estavelmente localizados no cromossomo bacteriano (vancomicina) ou não sendo transmitidos através de elementos móveis como plasmídios (amicacina e oxacilina) (Marthur & Singh, 2005). Devido ao escasso conhecimento a respeito da susceptibilidade aos antimicrobianos do gênero *Weissella*, optou-se manter o mesmo critério de análise realizada para o gênero *Lactobacillus*, uma vez que os dois táxos são filogeneticamente relacionados. Nesse sentido, e para o espectro de antibióticos usados, todos os isolados poderiam ser selecionados para aplicação em nutrição animal.

Tabela 6: Perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados. Os antibióticos utilizados foram Amicacina (AC), Ampicilina (AP), Cloranfenicol (CL), Eritromicina (ER), Penicilina (PN), Oxacilina (OX) e Vancomicina (VN).

Isolados Orais	Antibiótico							Isolados Orais	Antibiótico							
	AC	AP	CL	ER	PN	OX	VN		AC	AP	CL	ER	PN	OX	VN	
<i>L. fermentum</i> V1B-01	MS	S	S	S	S	R	R	<i>L. perolens</i> V2B-05	R	S	S	S	S	R	R	
<i>L. fermentum</i> V1B-02	R	S	S	S	S	R	R									
<i>L. fermentum</i> V1B-03	R	S	S	S	S	R	R	<i>W. cibaria</i> V3B-12	R	S	S	S	S	R	R	
<i>L. fermentum</i> V1B-04	R	S	S	S	S	R	R	<i>W. cibaria</i> VL1-15	R	S	S	S	MS	R	R	
<i>L. fermentum</i> V3B-08	R	S	S	S	S	R	R									
<i>L. fermentum</i> V3B-09	R	S	S	S	S	S	R	<i>W. paramesenteroides</i> V2B - 06	R	S	S	S	MS	R	R	
<i>L. fermentum</i> V3B-10	R	S	S	S	S	R	R	<i>W. paramesenteroides</i> V3B - 07	R	S	S	S	MS	R	R	
<i>L. fermentum</i> V1L-13	S	S	S	S	S	MS	S	<i>W. paramesenteroides</i> V3B - 11	R	S	S	S	S	R	R	
<i>L. fermentum</i> V2L-18	R	S	S	S	S	R	R	<i>W. paramesenteroides</i> V1L - 14	S	S	S	S	S	R	R	
<i>L. fermentum</i> V2L-20	R	S	S	S	S	R	R	<i>W. paramesenteroides</i> V1L - 16	R	S	S	S	S	R	R	
<i>L. fermentum</i> V3L-24	R	S	S	S	S	R	R	<i>W. paramesenteroides</i> V1L - 17	R	S	S	S	S	R	R	
<i>L. fermentum</i> V3L-25	R	S	S	S	S	R	R	<i>W. paramesenteroides</i> V2L - 19	R	S	S	S	S	R	R	
<i>L. fermentum</i> V3L-26	R	S	S	S	S	R	R	<i>W. paramesenteroides</i> V2L - 21	R	S	S	S	S	R	R	
<i>L. fermentum</i> V3L-27	MS	S	S	S	S	R	R	<i>W. paramesenteroides</i> V2L - 22	R	S	S	S	S	R	R	
<i>L. fermentum</i> V3L-28	MS	S	S	S	S	R	R	<i>W. paramesenteroides</i> V3L - 23	R	S	S	S	MS	R	R	
Isolados Vaginais	AC	AP	CL	ER	PN	OX	VN	Isolados Vaginais	AC	AP	CL	ER	PN	OX	VN	
<i>W. hellenica</i> V1V-29	R	S	S	S	S	R	R	<i>W. hellenica</i> V1V-30	S	S	S	S	MS	R	R	

Tabela 6: Continuação.

Isolados fecais	Antibiótico							Isolados fecais	Antibiótico						
	AC	AP	CL	ER	PN	OX	VN		AC	AP	CL	ER	PN	OX	VN
<i>L. acidophilus</i> B1F-36	MS	S	S	S	S	R	R	<i>L. reuteri</i> B5F-02	R	S	S	MS	S	R	R
<i>L. animalis</i> B4F-04	R	S	S	S	S	R	R	<i>L. reuteri</i> B5F-03	MS	S	S	S	S	R	R
<i>L. casei</i> B4F-02	R	S	S	S	MS	R	R	<i>L. reuteri</i> B5F-04	MS	S	S	S	S	R	R
<i>L. farciminis</i> B4F-06	R	S	S	S	S	R	R	<i>L. reuteri</i> B5F-05	S	S	S	S	S	R	R
<i>L. johnsonii</i> B1F-34	R	S	S	S	S	R	MS	<i>L. reuteri</i> B5F-06	R	S	S	S	S	R	R
<i>L. johnsonii</i> B2F-40	R	S	S	S	S	R	R	<i>L. reuteri</i> B6F-07	MS	S	S	S	S	R	R
<i>L. johnsonii</i> B3F-44	R	S	S	S	S	R	R	<i>L. reuteri</i> B5F-08	MS	S	S	S	S	R	R
<i>L. johnsonii</i> B3F-46	R	S	S	S	S	R	R	<i>L. reuteri</i> B5F-09	R	S	S	S	S	R	R
<i>L. reuteri</i> B1F-31	MS	S	S	S	S	R	R	<i>L. reuteri</i> B6F-01	R	S	S	S	S	R	R
<i>L. reuteri</i> B1F-32	S	S	S	S	S	R	R	<i>L. reuteri</i> B6F-02	S	S	S	S	S	R	R
<i>L. reuteri</i> B1F-35	MS	S	S	S	S	R	R	<i>L. reuteri</i> B6F-03	R	S	S	S	S	R	R
<i>L. reuteri</i> B2F-41	S	S	S	S	S	R	R	<i>L. reuteri</i> B6F-04	MS	S	S	S	S	R	R
<i>L. reuteri</i> B4F-01	S	S	S	S	S	R	R	<i>L. reuteri</i> B6F-05	S	S	S	S	S	R	R
<i>L. reuteri</i> B4F-03	R	S	S	S	MS	R	R	<i>L. reuteri</i> B6F-06	R	S	S	S	S	R	R
<i>L. reuteri</i> B4F-07	S	S	S	S	S	R	R	<i>L. reuteri</i> B6F-07	S	S	S	S	S	R	R
<i>L. reuteri</i> B4F-08	R	S	S	S	S	R	R	<i>L. reuteri</i> B6F-08	R	S	S	S	MS	R	R
<i>L. reuteri</i> B4F-09	MS	S	S	S	S	R	R	<i>L. reuteri</i> B6F-10	R	S	S	S	S	R	R
<i>L. reuteri</i> B5F-01	S	S	S	S	S	R	R	<i>L. reuteri</i> B6F-11	R	S	S	S	S	R	R
								<i>L. reuteri</i> B3F-A	R	S	S	S	S	R	R
								<i>L. reuteri</i> B3F-B	R	S	S	S	MS	R	R
								<i>L. reuteri</i> B3F-C	R	S	S	MS	S	R	R
								<i>L. salivarius</i> B2F-38	R	S	S	S	S	R	R

4.3- Caracterização probiótica *in vivo* - Colonização e indução da produção de IgA

A seleção de novas linhagens probióticas deve obedecer a critérios levando em consideração aspectos funcionais, tecnológicos e de segurança (Collins *et al.*, 2009, Gaagia *et al.*, 2010). Nesse sentido, ao longo do trabalho foram utilizados alguns parâmetros para se avaliar esses aspectos, como a inibição ao suco gástrico e sais biliares artificiais, a hidrofobicidade da superfície celular, a atividade antagonista a bactérias patogênicas, a produção de peróxido de hidrogênio e a resistência a antibióticos. A síntese dos resultados, excetuando-se o antibiograma, é mostrada no **Apêndice E**.

Para o estabelecimento das funções probióticas no sítio intestinal um determinado isolado deve ser capaz de sobreviver às condições de adversidade impostas pelo hospedeiro além de competir com a microbiota para o seu estabelecimento (Lebeer *et al.*, 2008). Além disso, é desejável que as linhagens utilizadas sejam oriundas do mesmo sítio o qual serão administrados, uma vez que é esperado que os fatores adaptativos estejam presentes nos isolados (Morelli, 2000; Saarela, 2000; Gaagia *et al.*, 2010). Vários fatores estão associados à sobrevivência ao trato gastrointestinal e fundamentam-se na manutenção da constituição da integridade da parede celular, no reparo e proteção do DNA e proteínas, além da presença de moléculas transportadoras na superfície microbiana, bombeando íons protonizados e bile para o ambiente extracelular (Lebeer *et al.*, 2008).

Nesse sentido, e levando também em consideração as características da parede celular e o antagonismo a bactérias patogênicas, foram selecionados dois isolados fecais para avaliações *in vivo*. *Lactobacillus farciminis* B4F-06 e *Lactobacillus reuteri* B3F-B apresentaram amplo espectro antagonista, inibindo o crescimento de todos os patógenos testados, apresentaram superfície celular hidrofóbica, foram resistentes à simulação com suco gástrico artificial (15,23% e 6,10% de inibição, respectivamente) e, respectivamente, resistente e tolerante aos sais biliares (4,72% e 52,20% de inibição).

O peróxido de hidrogênio é uma substância antagonista associado à saúde vaginal (Vallor *et al.* 2001). A base genética da produção dessa substância não é clara (Lebeer *et al.*, 2008), mas é evidente o seu papel no antagonismo a patógenos bacterianos como aquelas pertencentes ao gênero *Salmonella* (Pridmore *et al.*, 2008). O isolamento de linhagens probióticas e sua administração para o controle de vaginoses provocadas por microrganismos patogênicos é uma importante ferramenta para a manutenção da saúde do plantel, uma vez que a via vaginal é uma importante etapa para o estabelecimento da microbiota de bezerros neonatos, evitando a diarreia neonatal, uma das principais causas de mortalidade nesse grupo (Nader-Macías *et al.*, 2008). Nesse sentido, o critério de seleção de um isolado vaginal para os testes *in vivo* se baseou principalmente na capacidade de produção dessa substância. Além disso, o espectro antagonista e a hidrofobicidade da superfície celular também foram considerados, sendo *W. hellenica* V1V-30 escolhida dentre os isolados vaginais por apresentar as melhores características.

Recentemente, estudos avaliam a capacidade de isolados de BAL's modularem a resposta imune da mucosa dos tratos aéreos além de competir com microrganismos patogênicos por sítios de

adesão, auxiliando no combate a infecções provocadas por Orthomyxoviridae (H1N1), por Paramyxoviridae (Pneumovirus) e por bactérias pneumocócicas (Harata *et al.*, 2010; Stanislaw *et al.*, 2011; Licciardi *et al.*, 2012). Nesse sentido, um isolado oral foi selecionado para inóculo intranasal em camundongos. O critério de seleção levou em consideração o espectro antagonista e a hidrofobicidade da parede celular, sendo o isolado *L. fermentum* V3B-08 escolhido para os testes *in vivo*.

Para a avaliação da capacidade de adesão ao tecido epitelial das mucosas, os isolados selecionados: *L. fermentum* V3B-08 (G1), *W. hellenica* V1V-30 (G2), *L. farciminis* B4F-06 (G3) e *L. reuteri* B3F-B (G4) foram utilizados para monoassociar animais axênicos nos sites os quais foram isolados (exceto *L. fermentum* V3B-08, inóculo intranasal).

Os resultados referentes à estabilidade dos isolados nas mucosas encontram-se no **Quadro 1**. Vários mecanismos estão associados com a interação e adesão aos epitélios das mucosas, incluindo a hidrofobicidade da superfície celular (Klayraung *et al.*, 2008). Entretanto, a interação mucosa-microrganismo é bastante complexa, demandando interações moleculares específicas como a participação de proteínas de adesão à fibronectina, camada S, moléculas de adesão ao muco, entre outras (Lebeer *et al.*, 2008). Nesse sentido, a incapacidade de adesão e manutenção de *L. reuteri* B3F-B poderia estar associado à ausência desses fatores ou pela incapacidade de sobreviver a certos estresses causados pelo trânsito intestinal não avaliados neste trabalho, como o choque osmótico e enzimas entéricas. Outro fato a ser levado em consideração são os títulos plaqueados em ágar MRS, diluições de sexta e quarta ordem foram realizadas para os macerados intestinais, existindo a possibilidade da manutenção do isolado em populações reduzidas não detectada pelo método utilizado. Por outro lado, *L. farciminis* B4F-06 apresentou estabilidade, permanecendo no trato gastrointestinal ao longo dos dez dias de monoassociação, sendo interessante a avaliação do isolado frente a infecções intestinais. Os isolados oral e vaginal também apresentaram estabilidade nos sítios avaliados, apresentando o potencial quanto à competição por sítios de adesão em contextos de infecção da mucosa.

IgA é a principal imunoglobulina produzida pelas mucosas, sendo de fundamental importância para a saúde das mesmas, ligando-se à superfície bacteriana que medeiam a adesão às células epiteliais e impedindo a ligação do patógeno aos receptores usados em sua translocação (Strugnell & Wijburg, 2010).

Os pulmões dos animais pertencentes ao grupo G1, os fluidos vaginais dos animais pertencentes ao grupo G2 e os conteúdos intestinais dos animais pertencente aos grupos G3 e G4 foram coletados para avaliar o potencial imunomodulador dos isolados selecionados quanto à produção de IgA nos sítios de inóculo. Os materiais obtidos foram submetidos à ELISA de captura, os dados referentes ao experimento foram submetidos ao teste de normalidade e à análise de variância das médias pelo teste de Tukey. Os resultados são mostrados na **Figura 8**.

De um modo geral, todos os isolados induziram de forma estatisticamente significativa a produção de IgA, incluindo, e de forma surpreendente, o grupo G4, no qual as populações de *L. reuteri* B3F-B não foram detectados nas contagens intestinais (**Quadro 1**). Tal fato pode ser explicado pela possibilidade do isolado ter se estabilizado em contagens relativamente reduzidas e, conseqüentemente, não sendo observadas nos títulos nos quais os materiais foram plaqueados.

Quadro 1: Contagens relativas à capacidade de colonização dos isolados selecionados em modelo murino axênico.

<i>L. fermentum</i> V3B-08 (G1)	
Traqueia	$6,5 \times 10^5 \pm 0,71 \times 10^5$ UFC/g
Pulmão	$2,1 \times 10^4 \pm 0,14 \times 10^4$ UFC/g
<i>W. hellenica</i> V1V-30 (G2)	
Vagina	$2,95 \times 10^4 \pm 0,21 \times 10^4$
<i>L. farciminis</i> B4F-06 (G3)	
Duodeno	$2,03 \times 10^7 \pm 0,18 \times 10^7$ UFC/g
Jejuno	$8,28 \times 10^7 \pm 1,75 \times 10^7$ UFC/g
Íleo	$3,16 \times 10^7 \pm 0,02 \times 10^7$ UFC/g
Ceco	$3,97 \times 10^8 \pm 0,35 \times 10^7$ UFC/g
Cólon	$3,48 \times 10^7 \pm 0,28 \times 10^7$ UFC/g
<i>L. reuteri</i> B3F-B (G4)	
Não detectado	

Em animais isentos de germes o contato com a microbiota comensal é capaz de promover a diferenciação das CM's no epitélio, a entrada de linfócitos T e B na *lamina propria*, a formação dos centros germinativos e a produção de IgA. A natureza da IgA produzida é considerada polirreativa, gerando anticorpos com especificidades distintas. Cerca de 85% da IgA secretada em animais axênicos após monoassociação não são reativas com a bactéria colonizadora, atuando nos mais diferentes antígenos lumiais (Strugnell & Wijburg, 2010). Nesse sentido, a administração de linhagens probióticas capazes de induzir a síntese de IgA, como as desse estudo, é interessante, uma vez que essa indução apresenta um caráter profilático devido à inespecificidade das IgA's produzidas podendo atuar no combate a patógenos e toxinas. Além disso, um dos principais requisitos para a utilização de BAL's como veículos vacinais de mucosa é a sua capacidade de estimular uma resposta humoral através da indução de IgA (Wells & Mercenier, 2008), nesse sentido, todos isolados selecionados nesse estudo apresentam o potencial para essa finalidade.

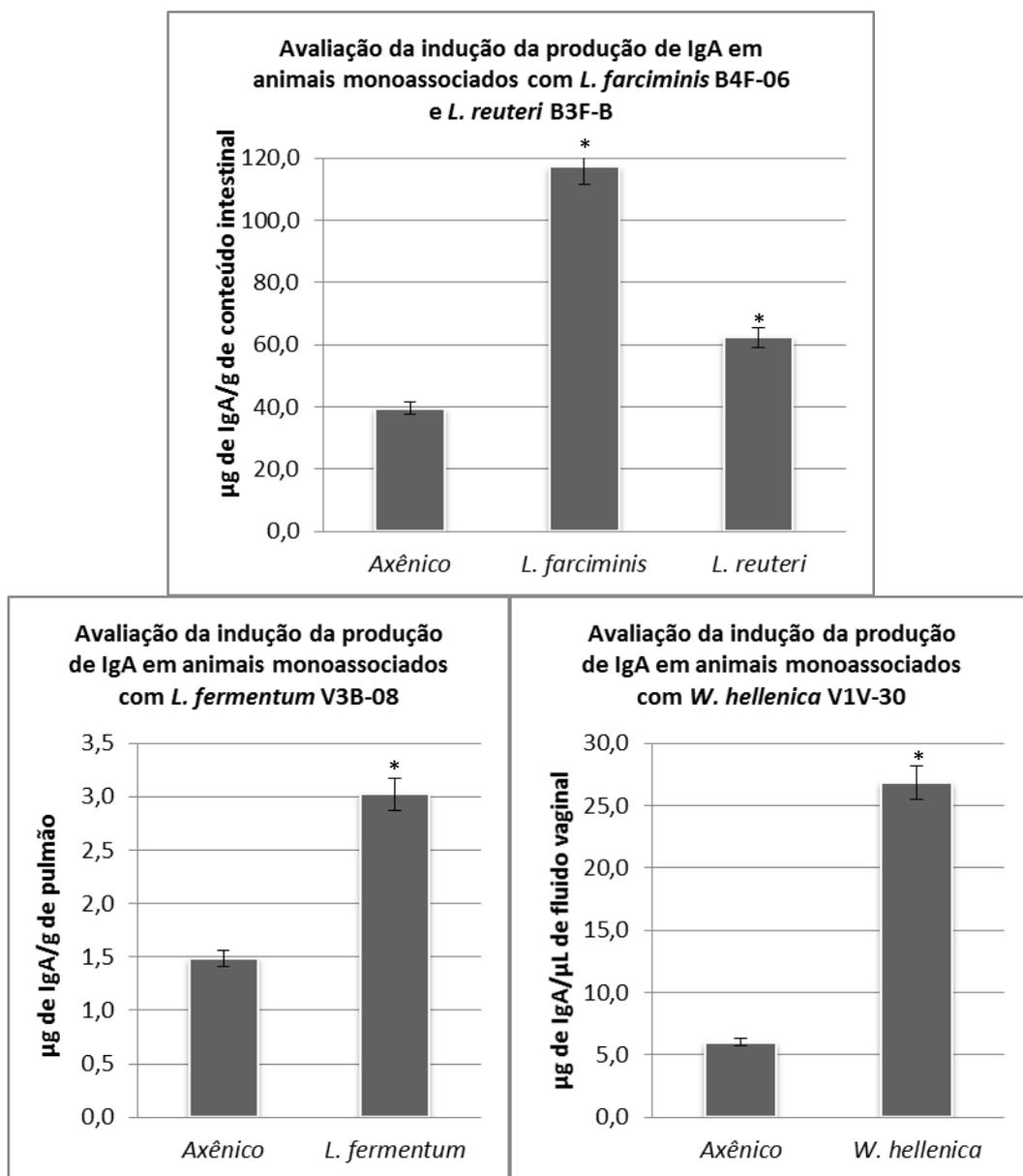


Figura 8: Perfis de indução de IgA pelos isolados seleccionados em seus sítios de inóculo. (*) Estatisticamente significativo ($p < 0,05$).

5. CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

A obtenção de novas linhagens probióticas devem seguir critérios funcionais, tecnológicos e de segurança. Nesse sentido, foram isoladas setenta linhagens de diferentes mucosas dos bovinos pertencentes ao gênero *Lactobacillus/Weissella* que foram submetidos a testes fenotípicos/fisiológicos a fim de se selecionar pelo menos um isolado proveniente de cada um dos sítios de isolamento para a realização de testes *in vivo*. De um modo geral, a grande maioria da amostra foi capaz de resistir aos desafios impostos pelo suco gástrico artificial o que não ocorreu com os sais biliares, onde somente os isolados fecais apresentaram melhores resultados. O teste de hidrofobicidade da superfície celular também foi utilizado e foi mais um critério de seleção. A atividade antagonista demonstrou que a maioria dos isolados foi capaz de antagonizar um grande espectro de bactérias patogênicas, além de produzirem peróxido de hidrogênio. Além disso, o antibiograma revelou que a resistência aos antibióticos testados estava mantida de forma intrínseca, não associada a elementos móveis.

A partir da caracterização *in vitro* foi possível selecionar quatro linhagens: *L. fermentum* V3B-08 (G1), *W. hellenica* V1V-30 (G2), *L. farciminis* B4F-06 (G3) e *L. reuteri* B3F-B (G4). Todas foram capazes de induzir de forma estatisticamente significativa a produção de IgA em camundongos axênicos, apresentado, portanto, um grande potencial para utilização na produção animal, protegendo as mucosas de infecção ou como veículo vacinal.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abiec, 2010.** Perfil da Cadeia Produtiva da Carne (2010). Acessado em: <http://www.abiec.com.br/img/Upl/osetor-101012.pdf>
- Abiec¹, 2012.** Lições da Vaca Louca (Notícia). Acessado em: <http://www.abiec.com.br/noticia.asp?id=843#.UR5HiR2-o6U>
- Abiec², 2012.** Relatório de Exportações de Carne Bovina do Brasil no ano de 2012. Acessado em: http://www.abiec.com.br/download/relatorioexportacao2012_jan_dez.pdf
- Abiec, 2013.** Exportações tendem a ganhar força em 2013 (Notícia). Acessado em: <http://www.abiec.com.br/noticia.asp?id=842#.UR5FfB2-o6U>
- Alakomi, H.L. et al. (2000).** Lactic Acid permeabilizes Gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol.66:2001-2005
- Al-Dobaib, S.N. and Mousa, H.M (2009).** Benefits and risks of growth promoters in animal production. *J. Food Agr. Environ.* Vol.7(2):202-208.
- Andersson, A.M. and Skakkebaek, N. E. (1999).** Exposure to exogenous estrogens in food: Possible impact on human development. *Eur. J. Endocrinol.* Vol.140(6):477-485.
- Ayeni, F.A. et al. (2011).** Evaluation of the functional potential of *Weissella* and *Lactobacillus* isolates obtained from Nigerian traditional fermented foods and cow's intestine. *Int. J. Food Microbiol.* Volume 147: 97–104.
- Backhed, F. et al. (2005).** Host-Bacterial Mutualism in the Human Intestine. *Science.* Volume 307:1915-1920.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2009).** Volume 3: The Firmicutes. Paul De Vos, George Garrity, Dorothy Jones, Noel R. Krieg, Wolfgang Ludwig, Fred A. Rainey, Karl-Heinz Schleifer and William B. Whitman.
- Björkroth K.J. et al. (2002).** Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp. nov., detected in food and clinical samples. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, Volume 52:141-148.
- Camilleri, M.M.D. (2006).** Probiotics and irritable bowel syndrome: rationale, putative mechanisms, and evidence of clinical efficacy. *J. Clin. Gastroenterol.* Volume 40: 264-269.
- Castanon, J.I.R. (2007).** History of the use of antibiotic as growth promoters in european poultry feeds. *Poultry Science*, Volume 86:2466 - 2471.
- Charteris, W.P. et al. (1998).** Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *J. Food Protec.* Volume 61:1636-1643.
- Chaucheyras-Durand and Durand H. (2010).** Probiotics in animal nutrition and health. *Beneficial Microbes.* Volume 1: 3-9
- Chen, X. et al. (2007).** The S-layer proteins of *Lactobacillus crispatus* strain ZJ001 is responsible for competitive exclusion against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium*. *Int. J. Food Microbiol.* Volume 115:307-312.
- Cogliani, C. et al. (2011).** Restricting antimicrobial use in food animals: lessons from Europe. *Microbe.* Volume 6:274-279.
- Collins J.W. et al. (2009).** Application of Prebiotics and Probiotics in Livestock. Springer References.
- Collins, M.D. et al. (1993).** Taxonomic studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *J. Appl. Bacteriol.* Volume 75: 595 - 603.

- Corr S.C. et al. (2007).** Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. PNAS. Volume 104:7617-7621.
- Corthésy, B. et al. (2005).** Oral immunization of mice with lactic acid bacteria producing *Helicobacter pylori* urease B subunit partially protects against challenge with *Helicobacter felis*. J. Infect. Dis. Volume 192:1441-1449.
- De Keersmaecker, S.C.J. et al. (2006).** Strong antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* GG against *Salmonella typhimurium* is due to accumulation of lactic acid. FEMS Microbiology. Volume 259:89–96.
- De Vrese, M. et al. (2005).** Probiotic bacteria stimulate virus-specific neutralizing antibodies following a booster polio vaccination. Eur. J. Nutr. Volume 44:406-413.
- Delcenserie, V. et al. (2008).** Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract. Curr. Issues Mol. Biol. Volume 10: 37-54.
- Deshpande, G. et al. (2007).** Probiotics for prevention of necrotising enterocolitis in preterm neonates with very low birthweight: a systematic review of randomised controlled trials. Lancet. Volume 369: 1614-1620.
- Dibner, J.J. and Richards, J.D. (2005).** Antibiotic growth promoters in agriculture: History and mode of action. Poultry Sci. Volume 84:634-643.
- EFSA (2008).** Technical guidance. Update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. The EFSA Journal. Volume 732:1-15.
- Elam, N. A. et al. (2003).** Effects of live cultures of *Lactobacillus acidophilus* (strains NP45 and NP51) and *Propionibacterium freudenreichii* on performance, carcass, and intestinal characteristics, and *Escherichia coli* strain O157 shedding of finishing beef steers. J. Anim. Sci. Volume 81: 2686-2698.
- Embrapa, 2001.** Documento 106 (Uso de Aditivos na Dieta de Bovinos de Corte).
- Euzéby, J.P (2009).** List of bacterial names with standing in nomenclature: A folder available on the Internet. Acessado em: <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/ww/weissella.html>
- Falagas, M. E. et al. (2007).** Probiotics for the treatment of women with bacterial vaginosis. Clin. Microbiol. Infect. Volume 13:657–664.
- FAO/WHO¹, 2002.** World Agriculture: Towards 2015/2030 Summary Report.
- FAO/WHO², 2002.** Guidelines for the evaluation of probiotics in food.
- Felis, G.E. and Dellaglio, F. (2007).** Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. Curr. Issues Intest. Microbiol. Volume 8:44-61.
- Frizzo, L.S. et al. (2011).** Effects of probiotics on growth performance in young calves: A meta-analysis of randomized controlled trials. Anim. Feed Sci. Tech. Volume 169 :147-156.
- Gabryszewski, S.J. et al. (2011).** *Lactobacillus*-mediated priming of the respiratory mucosa protects against lethal pneumovirus infection. J. Immunol. Volume 186:1151–1161.
- Gaggia, F. et al. (2010).** Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. Int. J. Microbiol. Volume 141:S15–S28.
- Grangette, C. et al. (2002).** Protection against tetanus toxin after intragastric administration of two recombinant lactic acid bacteria: impact of strain viability and in vivo persistence. Vaccine. Volume 20:3304-3309.
- Griffin, P.M. and Tauxe, R.V. (1991).** The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. Epidemiol. Ver. Volume 13:60–98.

- Hammes, W.P. e Hertel, C. (2003).** The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. The Prokaryotics - An Envolving Eletronic Resource for the Microbiological Community. Release 3.15.
- Hanniffy, S. et al. (2004).** Potential and opportunities for use of recombinant lactic acid bacteria in human health. *Adv. Appl. Microbiol.* Volume 56: 1-64.
- Harata, G. et al. (2010).** Intranasal administration of *Lactobacillus rhamnosus* GG protects mice from H1N1 influenza virus infection by regulating respiratory immune responses. *Lett. Appl. Microbiol.* Volume 50: 597–602.
- Hoyos, G. (1997).** Aplicación de la biotecnología en la producción animal: La experiencia mexicana de una década. *Memorias del 1er Simposio Mexicano sobre Probióticos*, paginas 131-148.
- Ishihara, N. et al. (2001).** Improvement of intestinal microflora balance and prevention of digestive and respiratory organ diseases in calves by green tea extracts. *Livest. Prod. Sci.* Volume 68: 217–229.
- Jouany J.P. and Morgavia D.P. (2007).** Use of 'natural' products as alternatives to antibiotic feed additives in ruminant production. *Animal.* Volume 1: 1443-1466.
- Kang, J.S. et al. (2009).** Low dose estrogen supplementation reduces mortality of mice in estrogendependent human tumor xenograft model. *Biol. Pharm. Bull.* Volume 32:150-152.
- Kidd, K.A et al. (2007).** Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *PNAS* Volume 104: 8897–8901
- Klayraung, S. et al. (1998).** Probiotic properties of Lactobacilli isolated from Thai Tradicional Food. *Sci. Pharm.* Volume 76: 485-503.
- Lane D.J:** 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Edited by Stackebrandt E, Goodfellow M. Chichester: Wiley; 1991:115-175.
- Lebeer, S. et al. (2008).** Genes and molecules of Lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiol. Mol. Biol. R.* Volume 72: 728-764.
- Lebeer S. et al. (2010).** Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nat. Ver. Microbiol.* Volume 8: 171-184.
- Lee, K.W. et al. (2012).** Probiotic properties of *Weissella* strains isolated from human faeces. *Anaerobe.* Volume 18: 96–102.
- Lejeune, J.T. and Wetzel, A.N. (2007).** Preharvest control of *Escherichia coli* O157 in cattle. *J. Anim. Sci.* Volume 85: E73–E80.
- Licciardi, P.V. et al. (2012).** Protecting against pneumococcal disease: Critical interactions between probiotics and the airway microbiome. *Plos Pathogens.* Volume 8: e1002652.
- Lila Z.A, et al. (2004).** Effects of a twin strain of *Saccharomyces cerevisiae* live cells on mixed ruminal microorganism fermentation in vitro. *J Anim Sci.* Volume 82:1847–1854.
- LPSN, 2013.** Euzéby, J.P. List of bacterial names with standing in nomenclature: A folder available on the Internet. *Int. J. Syst. Bacteriol.* Volume 47: 590-592. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/>>
- Mac Donald T.T. and Bell I. (2010).** Probiotics and the immune response to vaccines. 3rd International Immunonutrition Workshop. Session 8: Probiotics in the defence and metabolic balance of the organism.
- Mack, D. R. et al. (2003).** Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro. *Gut.* Volume 52: 827-833.
- Maldonado, N.C. et al. (2012).** Lactic acid bacteria isolated from young calves – Characterization and potential as probiotics. *Res. Vet. Sci.* Volume 92: 342–349.

Mangoni, J (2009). Potencial probiótico de lactobacilos de origem suína (2009).Dissertação (Mestre em Zootecnia). Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondo.

MAPA, 2009. Instrução Normativa nº 26, de 09 de julho de 2009.

MAPA, 2011. Instrução Normativa nº 55, de 01 de dezembro de 2011.

MAPA, 2013. Secretaria de Relações Internacionais do Agronegócio - Balança Comercial do Agronegócio – Dezembro/2012.

Marthur, S. and Singh, R. (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria – a review. Int. J. Food Microbiol. Volume 105: 281–295.

Medina, E. and Guzmán, C. A. (2001). Use of live bacterial vaccine vectors for antigen delivery: potential and limitations. Vaccine. Volume 19: 1573-1580.

Meurman, J. H. and Stamatova, I. (2007). Probiotics: contributions to oral health. Oral Diseases. Volume 13: 443–451.

Mirlohi, M. et al. (2009). Investigation of acid and bile tolerance of native lactobacilli isolated from fecal samples and commercial probiotics by growth and survival studies. Iranian Journal of Biotechnology. Volume 7: 233 - 240.

Moreira J.L.S. et al. (2005). Identification to the species level of *Lactobacillus* isolated in probiotic prospecting studies of human, animal or food origin by 16S-23S rRNA restriction profiling. BMC Microbiology. Volume 5, issue 15.

Morelli, L. (2000). In vitro selection of probiotic lactobacilli: a critical appraisal. Current Issues in Intestinal Microbiology, Norfolk, v. 1, n. 2, p. 59 - 67, 2000.

Mota R. M. et al. (2006). Genetic transformation of novel isolates of chicken *Lactobacillus* bearing probiotic features for expression of heterologous proteins: a tool to develop live oral vaccines. BMC Biotechnology. Volume 6, issue 2.

Nader-Macías, M.E.F. et al. (2008). Advances in the design of probiotic products for the prevention of major diseases in dairy cattle. J. Ind. Microbiol. Biot. Volume 35: 1387-1395.

Neumann, E. (1991). Comportamento “*in vitro*” de estirpes de *Lactobacillus acidophilus* sensível e resistente à bacteriocina sob condições do trato digestivo. 1991. Dissertação (mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

Neutra, M.R. and Kozlowski, P.A. (2006). Mucosal vaccines: the promise and the challenge. Nat. Ver. Immunol. Volume 6: 148-158.

Nisbet, D.J. et al. (1991). Effect of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on lactate utilization by the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. J. Anim. Sci. Volume 69: 4628-4633.

Nocek, J.E. and Kautz, W.P. (2006). Direct-fed microbial supplementation on ruminal digestion, health, and performance of pre- and postpartum dairy cattle. J. Dairy Sci. Volume 89: 260-266.

Olano A., et al. (2001). *Weissella confusa* (basonym: *Lactobacillus confusus*) bacteremia: a case report. J. Clin. Microbiol. Volume 39: 1604-1607.

Pancheniak, E.F.R. (2005). Isolamento, seleção, caracterização bioquímica e molecular para produção e avaliação do potencial probiótico de *Lactobacillus reuteri* LPB P01-001 em suínos. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

Parlamento e Conselho Europeu (2003). Resolução nº 1831/2003. Endereço na Internet: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:268:0029:0043:EN:PDF>

Pelletier, C. et al. (1997). Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. Appl. Environ.

Microbiol. Volume 63: 1725 - 1731.

Peterson, R.E. et al. (2007). Effect of *Lactobacillus acidophilus* Strain NP51 on *Escherichia coli* O157:H7 fecal shedding and finishing performance in beef feedlot cattle. J. Food Protect. Volume 70: 287-291.

Pillai, A. and Nelson, R. (2008). Probiotics for treatment of *Clostridium difficile*-associated colitis in adults. Cochrane Database Syst. Rev. CD004611.

Pretzer, G. et al. (2005). Biodiversity-based identification and functional characterization of the mannose-specific adhesin of *Lactobacillus plantarum*. J. Bacteriol. Volume 187: 6128-6136.

Pridmore, R. D. et al. (2008). Hydrogen peroxide production by *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 and its role in anti-*Salmonella* activity. Volume 283: 210–215.

Rabe, L.K. and Hillier S.L. (2003). Optimization of media for detection of hydrogen peroxide production by *Lactobacillus* species. J. Clin. Microbiol. Volume 41: 3260-3264.

Rafter, J. et al. (2007). Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients. American Journal of Clinical Nutrition. Volume 85: 488-496.

Ripamonti, B. et al. (2011). Screening of species-specific lactic acid bacteria for veal calves multi-strain Probiotic adjunct. Anaerobe. Volume 17: 97-105.

Saarela, M. et al. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. Journal of Biotechnology. Volume. 84: 197 - 215.

Seth, A. et al. (2008). Probiotics ameliorate the hydrogen peroxide-induced epithelial barrier disruption by a PKC- and MAP kinase-dependent mechanism. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. Volume 294: G1060-G1069.

Shi H.N. and Walker A. (2004). Bacterial colonization and the development of intestinal defences. Can. J. Gastroenterol. Volume 18: 493-500.

Silva, B.C. et al. (2013). In vitro assessment of functional properties of lactic acid bacteria isolated from faecal microbiota of healthy dogs in probiotics screening. Beneficial Microbes. Artigo a ser impresso.

Soto A.M. et al. (2004). Androgenic and estrogenic activity in water bodies receiving cattle feedlot effluent in Eastern Nebraska, USA. Environ. Health Perspect. Volume 112: 346-352.

Soto, L.P. et al. (2010). Molecular microbial analysis of *Lactobacillus* strains isolated from the gut of calves for potential probiotic use. Veterinary Medicine International. Volume 1, article ID 274987.

Strugnell R.A. and Wijburg, O.L.C. (2010). The role of secretory antibodies in infection immunity. Nat. Rev. Microbiol. Volume 8: 656-667.

Takahashi J. et al. (2005). Mitigation of methane emission and energy recycling in animal agricultural systems. Asian Aust. J. Anim. Sci. Volume 18:1199–1208.

Tilsala-Timisjärvi A. and Alatossava T. (1997). Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. Int. J. Food Microbiol. Volume 35: 49-56.

Vallor, A.C. et al. (2001). Factors associated with acquisition of, or persistent colonization by, vaginal lactobacilli: role of hydrogen peroxide production. J. Infect. Dis. Volume 184: 1431-1436.

Walker D.K. and Gilliland S. E. (1993). Relationships Among bile tolerance, bile salt deconjugation, and assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. J. Dairy Sci. Volume 76: 956-961.

Wells, J. M. and Mercenier, A. (2008). Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria. Nat. Rev. Microbiol. Volume 6: 349-362.

Yan F. et al. (2007). Soluble proteins produced by probiotic bacteria regulate intestinal epithelial cell survival and growth. *Gastroenterology*. Volume 132: 562-575.

Younts-Dahl S.M. et al. (2005). Reduction of *Escherichia coli* O157 in finishing beef cattle by various doses of *Lactobacillus acidophilus* in direct-fed microbials. *J. Food Protect.* Volume 68: 6-10.

Zheng W. et al. (2008). Analysis of steroid hormones in a typical dairy waste disposal system. *Environ. Sci. Technol.* Volume 15: 530-535.

Zhang, Z.H. et al. (2005). Oral vaccination of mice against rodentia malaria with recombinant *Lactococcus lactis* expressing MSP-1. *World J. Gastroenterol.* Volume 11:6975-6980.

7. ANEXOS

7. ANEXOS

Anexo I: Perfis de digestão esperado para a determinação das espécies de *Lactobacillus*.

As “+” representam digestões positivas do espaçador entre as regiões 16-23S para os espaçadores maiores, intermediários e menores encontrados em *Lactobacillus*.

<i>SphI</i>	<i>NcoI</i>	<i>NheI</i>	<i>SspI</i>	<i>Csp45I</i>	<i>EcoRV</i>	<i>DraI</i>	<i>VspI</i>	<i>HincII</i>	<i>EcoRI</i>	<i>HindIII</i>	<i>AvrII</i>	Identificação
+++	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	<i>L. gastricus</i>
+++	+-	---	---	---	---	+++	+++	+-	---	+++	+++	<i>L. farciminis</i>
+++	+++	---	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	<i>L. antri</i>
+++	+++	---	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	<i>L. panis</i>
+++	+++	---	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	<i>L. pontis</i>
+++	+++	---	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	<i>L. reuteri</i>
+++	+++	---	---	---	---	---	+++	+-	---	---	---	<i>L. reuteri</i>
+++	+++	---	---	---	---	---	+++	+-	---	---	---	<i>L. frumenti</i>
+++	+++	---	---	---	---	---	+++	+-	---	---	---	<i>L. vaginalis</i>
+++	+++	---	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	<i>L. vaginalis</i>
+++	+++	---	+++	---	---	---	+++	---	---	---	---	<i>L. coleohominis</i>
+++	---	+-	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	<i>L. fermentum</i>
+++	---	+++	---	---	---	+++	+++	---	---	+++	---	<i>L. sanfranciscensis</i>
+++	---	+++	+++	---	---	---	+++	---	---	---	---	<i>L. agilis</i>
+++	---	---	+++	---	---	+++	---	+-	---	---	---	<i>L. satsumensis</i>
+++	---	---	+++	---	---	+++	+++	+-	---	+++	---	<i>L. fructivorans</i>
+++	---	---	+++	---	---	+++	---	---	---	---	---	<i>L. mali</i>
+++	---	---	+++	---	---	---	+++	+++	---	---	---	<i>L. paraplantarum</i>
+++	---	---	+++	---	---	---	+++	+++	---	---	---	<i>L. pentosus</i>
+++	---	---	+++	---	---	---	+++	+++	---	---	---	<i>L. plantarum</i>
+++	---	---	+++	+-	---	---	+++	+++	---	---	---	<i>L. plantarum</i>
+++	---	---	+++	---	---	---	+++	+++	---	+++	---	<i>L. kefir</i>
+++	---	---	+++	---	---	---	+++	+++	---	+++	---	<i>L. hilgardii</i>
+++	---	---	+++	---	---	---	+++	+++	---	+++	---	<i>L. parafarraginis</i>
+++	---	---	---	+-	+++	+++	---	---	---	+++	---	<i>L. camelliae</i>
+++	---	---	---	---	---	+++	+++	+-	---	+++	+++	<i>L. alimentarius</i>
+++	---	---	---	---	---	+++	+++	+-	---	+++	+++	<i>L. paralimentarius</i>
+++	---	---	---	---	---	+++	+++	+-	---	+++	---	<i>L. animalis</i>
+++	---	---	---	---	---	+++	---	+-	---	+++	---	<i>L. rossiae</i>
+++	---	---	---	---	---	+++	---	---	+-	---	---	<i>L. vini</i>
+++	---	---	---	---	---	+++	---	---	---	+++	---	<i>L. sakei</i>
+++	---	---	---	---	---	---	+++	+++	---	+++	---	<i>L. diolivorans</i>
+++	---	---	---	---	---	---	+++	---	---	+++	---	<i>L. brevis</i>
---	+++	+-	---	+-	---	+-	---	---	---	+++	---	<i>L. kalixensis</i>
---	+++	---	---	+++	---	---	---	---	---	---	---	<i>L. delbrueckii</i>
---	+++	---	---	+-	---	---	---	---	+++	+++	+++	<i>L. acidophilus</i>
---	+++	---	---	+-	+++	---	---	---	+++	+++	+++	<i>L. crispatus</i>
---	+++	---	---	+-	+++	---	---	---	+++	+++	+++	<i>L. kefiranofaciens</i>
---	---	---	+++	---	---	+++	---	---	---	---	---	<i>L. salivarius</i>
---	---	---	+++	+++	---	+++	---	+-	---	---	---	<i>L. ruminis</i>
---	---	---	---	---	+++	+++	+++	---	---	+++	---	<i>L. casei</i>
---	---	---	---	---	+++	+++	---	+-	---	+++	---	<i>L. rhamnosus</i>
---	---	---	---	---	+++	---	---	+-	---	---	+++	<i>L. iners</i>
---	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	+-	+++	<i>L. gasseri</i>
---	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	+-	---	<i>L. johnsonii</i>
---	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	---	---	<i>L. jensenii</i>
---	---	---	---	---	---	---	---	+-	---	+++	+++	<i>L. perolens</i>

7. APÉNDICES


```

Query 600 TGAAGTGAAAGCCCTCAGCTCAACTGAGGAATTGCTTTGGAAACTGGATGACTTGAGTGC 659
          |||
Sbjct 634 TGAAGTGAAAGCCCTCAGCTCAACTGAGGAATTGCTTTGGAAACTGGATGACTTGAGTGC 693

Query 660 AGTAGAGGAACAGTGGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAAATGCGTAGATATATGGAAGAA 719
          |||
Sbjct 694 AGTAGAGGAA-AGTGG-ACTCCATGTGTAGCGGTGAAA-TGCGTAGATATATGGAAGAA 750

Query 720 CCACCAAGTGGCGAAGGCGGGCTTTTCTGGGACTTGGTACTGACGTTTGAAGGCTCGGAA 779
          | |||
Sbjct 751 C-ACCA-GTGGCGAAGGCGG-CTTT-CTGG-ACT-GTAACTGACGTT-GA-GGCTCG-AA 801

Query 780 AAGTGTGGG 788
          | |||
Sbjct 802 A-GTGTGGG 809

```

Weissella hellenica gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: 4-7

Sequence ID: dbj|AB621968.1|

Length: 1451

Score Expect Identities Gaps Strand
1221 bits(661) 0.0 695/709(98%) 11/709(1%) Plus/Plus

```

GTAACGCTGGCGGCGTGCTAATACTGCAGGTTAACGCTTTGTGCTTAATTGAGATGATGAGCTTGCTCTGATTTGATTTTTTGG
ATTTCAAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCTCTTAGCAGGGGGATAACATTTGGAAACAAGTGCTAA
TACCGTATAATATCAACAACCGCATGGTTGTTGATTGAAAGATGGTTCTGCTATCACTAAGAGATGGACCCGCGGTGCATTAG
CTAGTTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGGCAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGACTGAGACAC
GGCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTGTGATG
AAGGGTTTTCGGCTCGTAAAAACTGTTATAAGAGAAGAACGGCACTGAGAGTAACTGTTTCAGTGTGTGACGGTATCTTACCAG
AAAGGAACGGCTAAATACGTGCCAGCAGACCGCGGATAATACGTATGTTCCAGCGTTATCCGATTTATTGGGCGTAAAGCG
AGCGCAGACGGTTATTTAAGTCTGAAGTGAAAGCCCTCAGCTCAAACCTGAGGGCAATTGCTCTTGGAAACTGGATGACTTGAG
TGCAGTAGAGGAAAGTGGAACTCCATGTGTACGCGGTGACATGC

```

```

Query 3 AACGCTGGCGGCGTGC-TAATAC-TGCAGGT-TAACGCTTTGTGCTTAATTGAGATGATG 59
          |||
Sbjct 11 AACGCTGGCGGCGTGCATAATACATGCAAGTCAAGCTTTGTGCTTAATTGAGATGATG 70

Query 60 AGCTTGCTCTGATTTGATTTTTGATTTCAAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGG 119
          |||
Sbjct 71 AGCTTGCTCTGATTTGATTTTTGATTTCAAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGG 130

Query 120 GTAACCTACCTCTTAGCAGGGGGATAACATTTGGAAACAAGTGCTAATACCGTATAATAT 179
          |||
Sbjct 131 GTAACCTACCTCTTAGCA-GGGGATAACATTTGGAAACAAGTGCTAATACCGTATAATAT 189

Query 180 CAACAACCGCATGGTTGTTGATTGAAAGATGGTTCTGCTATCACTAAGAGATGGACCCGC 239
          |||
Sbjct 190 CAACAACCGCATGGTTGTTGATTGAAAGATGGTTCTGCTATCACTAAGAGATGGACCCGC 249

Query 240 GGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGGCAATGATGCATAGCCGAGTTG 299
          |||
Sbjct 250 GGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGGCAATGATGCATAGCCGAGTTG 309

Query 300 AGAGACTGATCGGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCCACTCCTACGGGAGGCAGCAG 359
          |||
Sbjct 310 AGAGACTGATCGGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCCACTCCTACGGGAGGCAGCAG 369

Query 360 TAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTGTGATGAAGG 419
          |||
Sbjct 370 TAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTGTGATGAAGG 429

Query 420 GTTTCGGCTCGTAAAAACTGTTATAAGAGAAGAACGGCACTGAGAGTAACTGTTTCAGTG 479
          |||
Sbjct 430 GTTTCGGCTCGTAAAAACTGTTATAAGAGAAGAACGGCACTGAGAGTAACTGTTTCAGTG 489

Query 480 TGTGACGGTATCTTACCAGAAAGGAACGGCTAAATACGTGCCAGCAGACCGCGGATAATA 539
          |||

```

```

Sbjct 490 TGTGACGGTATCTTACCAGAAAGGAACGGCTAAATACGTGCCAGCAG-CCGCGG-TAATA 547
Query 540 CGTATGTTCCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTATTTA 599
      |||
Sbjct 548 CGTATGTTCCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTATTTA 607
Query 600 AGTCTGAAGTGAAGGCCCTCAGCTCAAACCTGAGGGCAATTGCTCTTGAAACTGGATGAC 659
      |||
Sbjct 608 AGTCTGAAGTGAAGGCCCTCAGCTCAA-CTGAGG--AATTGCT-TTGAAACTGGATGAC 663
Query 660 TTGAGTGCAGTAGAGGAAAGTGAACCCATGTGTACGCGGTGACATGC 708
      |||
Sbjct 664 TTGAGTGCAGTAGAGGAAAGTGAACCCATGTGTGTA-GCGGTGAAATGC 711

```

***Weissella paramesenteroides* gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: 606**

Sequence ID: dbj|AB775181.1|

Length: 1542

Score Expect Identities Gaps Strand
1411 bits(764) 0.0 788/798(99%) 7/798(0%) Plus/Plus

```

GCGGCGTGCTAATACCTGCAGTCTGAACGCTTTGTCTTTAACTTGATCTGACGAGCTTGCTCTGATGTGATTTTATCTGACAA
AGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCTCTTAGCAGGGGATAACATTTGGAAACAAGTGCTAATACCGTAT
AATACCAACAACCGCATGGTTGTTGGTTGAAAGATGGTTCTGCTATCACTAAGAGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGG
TAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCATA
CTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTGTGATGAAGGGTTT
CGGCTCGTAAACACTGTTATAAGAGAAGAACGGCACTGAGAGTAACTGTTCAAGTGTGTGACGGTATCTTACCAGAAAGGAAC
GGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTTCCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACG
GTTATTTAAGTCTGAAGTGAAGGCCCTCAGCTCAAACCTGAGGAATGGCTTTGAAACTGGATGACTTGAGTGCAGTAGAGGAAA
AGTGAACCTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATTATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTCTGGACTGTTACTGA
CGTTGAGGCTCGAAAGTGTGGGTAGCAAAACAGGCATTAGATACCCTGGGTT

```

```

Query 1 GCGGCGTG-CTAATACCTGC-AGTCTGAACGCTTTGTCTTTAACTTGATCTGACGAGCTT 58
      |||
Sbjct 35 GCGGCGTGCTAATACATGCAAGTC-GAACGCTTTGTCTTTAA-TTGATCTGACGAGCTT 92
Query 59 GCTCTGATGTGATTTTATCTGACAAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACC 118
      |||
Sbjct 93 GCTCTGATGTGATTTTATCTGACAAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACC 152
Query 119 TACCTCTTAGCAGGGGATAACATTTGGAAACAAGTGCTAATACCGTATAATACCAACAAC 178
      |||
Sbjct 153 TACCTCTTAGCAGGGGATAACATTTGGAAACAAGTGCTAATACCGTATAATACCAACAAC 212
Query 179 CGCATGGTTGTTGGTTGAAAGATGGTTCTGCTATCACTAAGAGATGGACCCGCGGTGCAT 238
      |||
Sbjct 213 CGCATGGTTGTTGGTTGAAAGATGGTTCTGCTATCACTAAGAGATGGACCCGCGGTGCAT 272
Query 239 TAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACT 298
      |||
Sbjct 273 TAGCTAGTTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGGCAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACT 332
Query 299 GATCGGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAA 358
      |||
Sbjct 333 GATCGGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAA 392
Query 359 TCTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTGTGATGAAGGGTTTCGG 418
      |||
Sbjct 393 TCTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTGTGATGAAGGGTTTCGG 452
Query 419 CTCGTAACACTGTTATAAGAGAAGAACGGCACTGAGAGTAACTGTTCAAGTGTGTGACG 478
      |||
Sbjct 453 CTCGTAACACTGTTATAAGAGAAGAACGGCACTGAGAGTAACTGTTCAAGTGTGTGACG 512
Query 479 GTATCTTACCAGAAAGGAACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTATGTTT 538
      |||

```

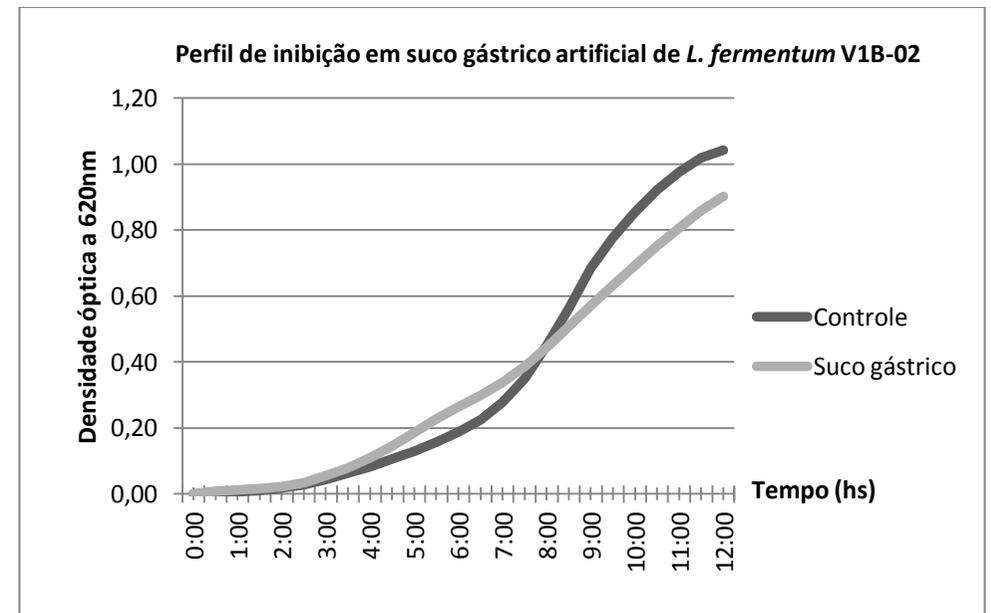
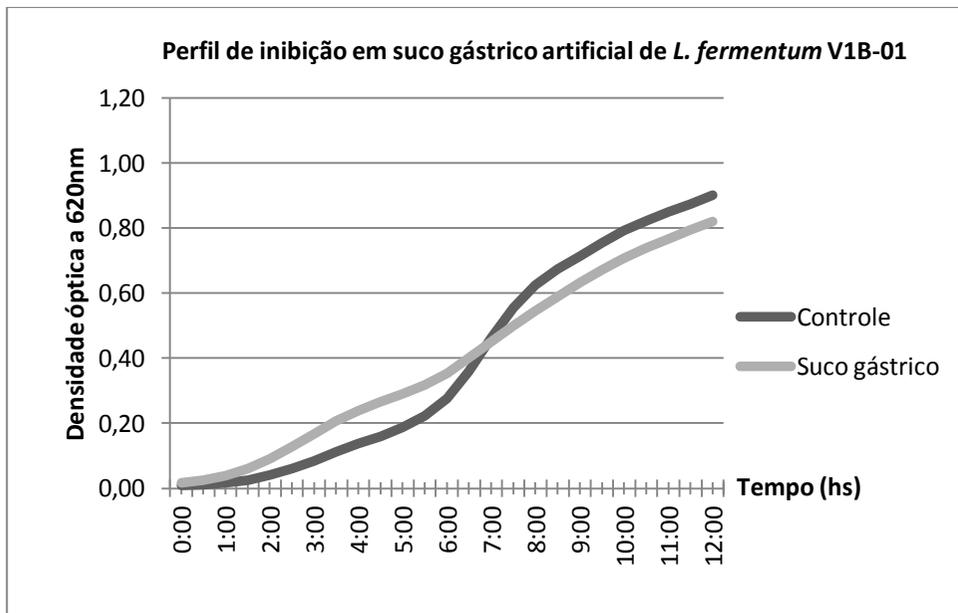
```

Sbjct  513  GTATCTTACCAGAAAGGAACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTTC  572
Query  539  CAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTATTTAAGTCTGAAG  598
      |||
Sbjct  573  CAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTATTTAAGTCTGAAG  632
Query  599  TGAAAGCCCTCAGCTCAACTGAGGAATGGCTTTGGAAACTGGATGACTTGAGTGCAGTAG  658
      |||
Sbjct  633  TGAAAGCCCTCAGCTCAACTGAGGAATGGCTTTGGAAACTGGATGACTTGAGTGCAGTAG  692
Query  659  AGGAAAAGTGGAACCTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAT-TATGGAAGAACACCAGT  717
      |||
Sbjct  693  AGGAAA-GTGAACCTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGT  751
Query  718  GGCGAAGGCGGCTTTCTGGACTGTTACTGACGTTGAGGCTCGAAAGTGTGGGTAGCAAAC  777
      |||
Sbjct  752  GGCGAAGGCGGCTTTCTGGACTGTAACCTGACGTTGAGGCTCGAAAGTGTGGGTAGCAAAC  811
Query  778  AGGCATTAGATACCCTGG  795
      |||
Sbjct  812  AGG-ATTAGATACCCTGG  828

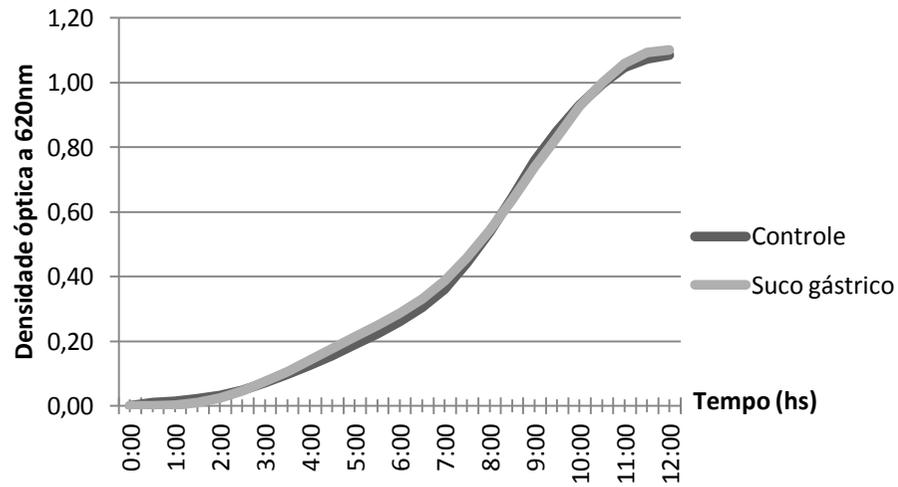
```

7.2- Apêndice B: Curvas de crescimento obtidas para os isolados de BAL's após a manutenção em salina 0,9% ou em suco gástrico artificial por uma hora.

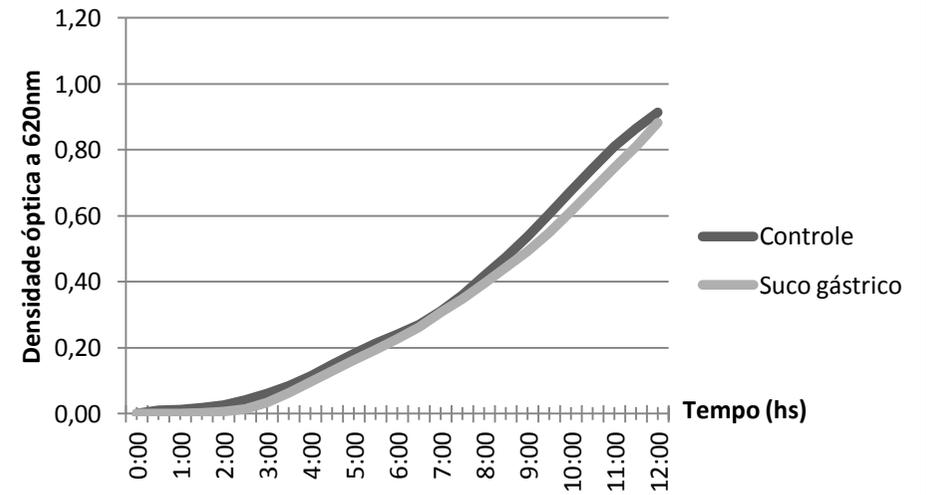
A linha preta e cinza equivale, respectivamente, ao crescimento bacteriano sem e com o desafio (suco gástrico artificial). A porcentagem de inibição é demonstrada nos Quadros 3 e 4.



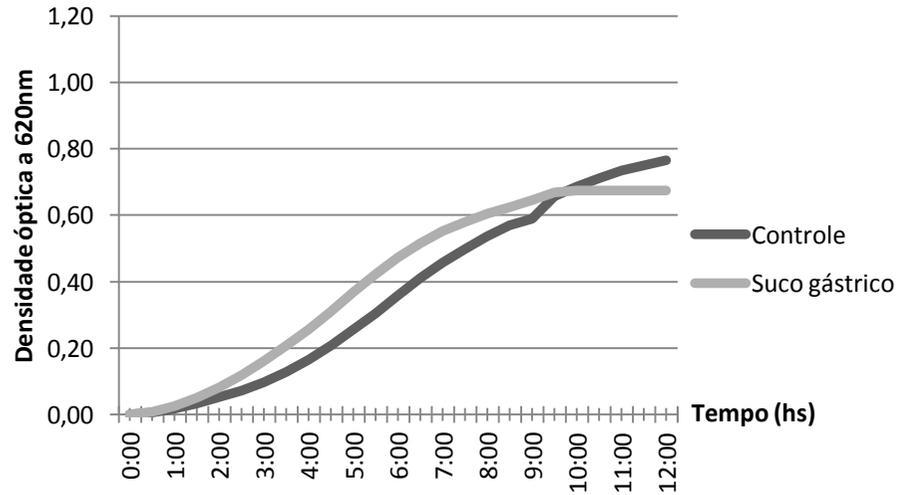
Perfil de inibição em suco gástrico artificial de *L. fermentum* V1B-03



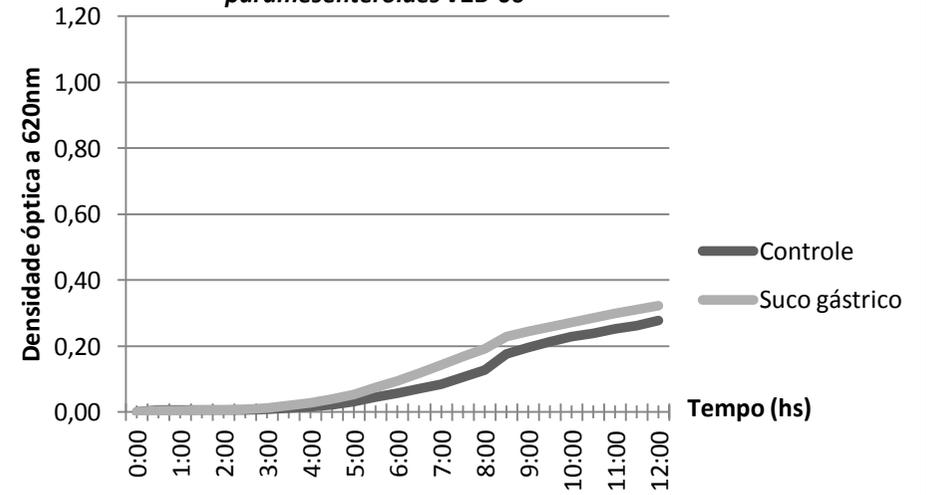
Perfil de inibição em suco gástrico artificial de *L. fermentum* V1B-04

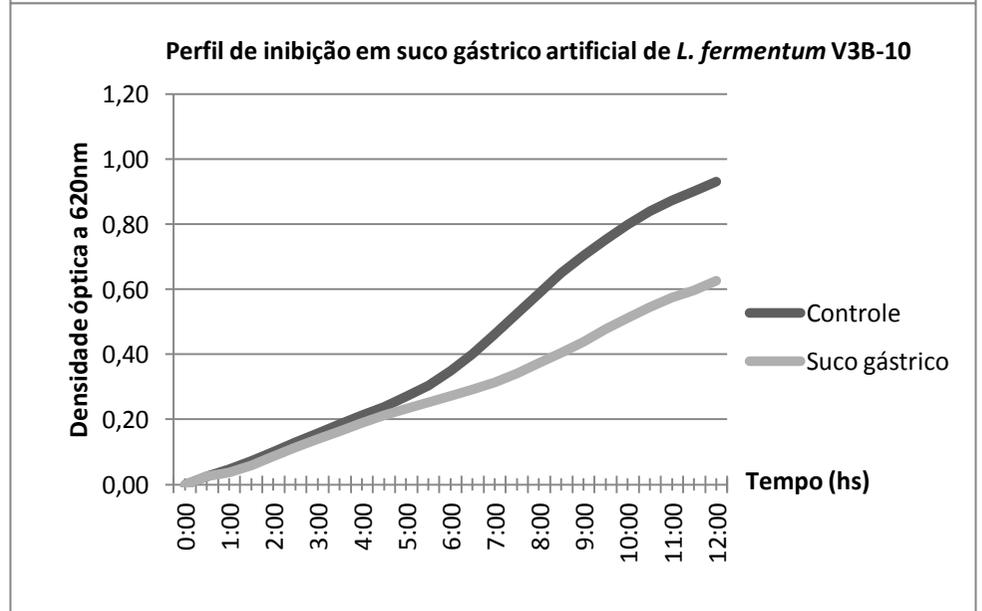
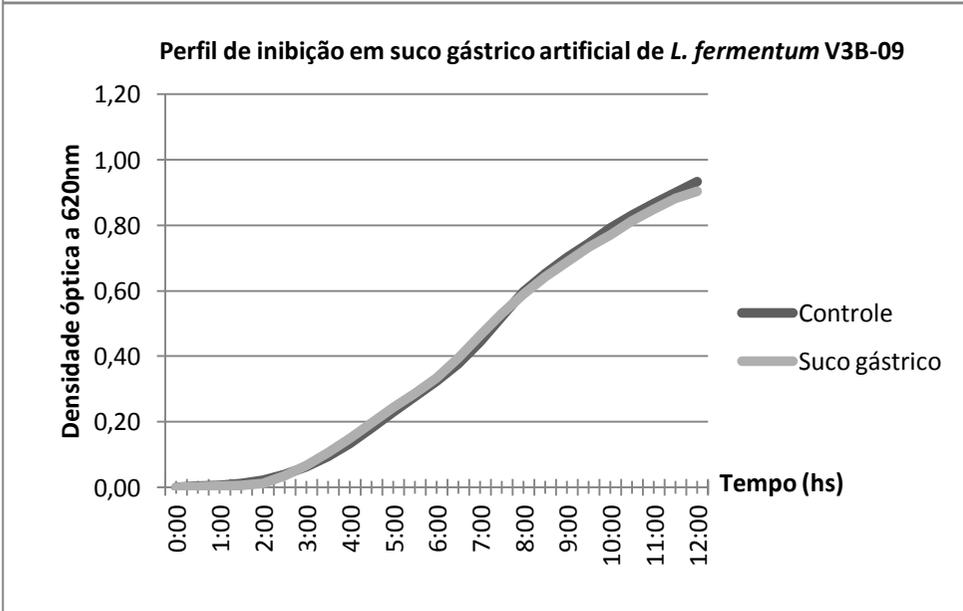
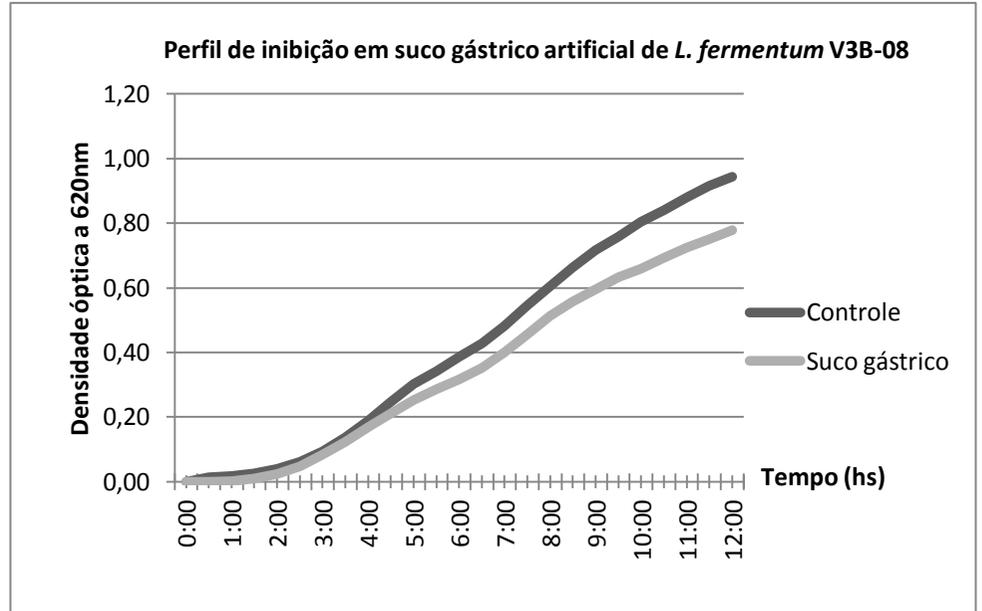
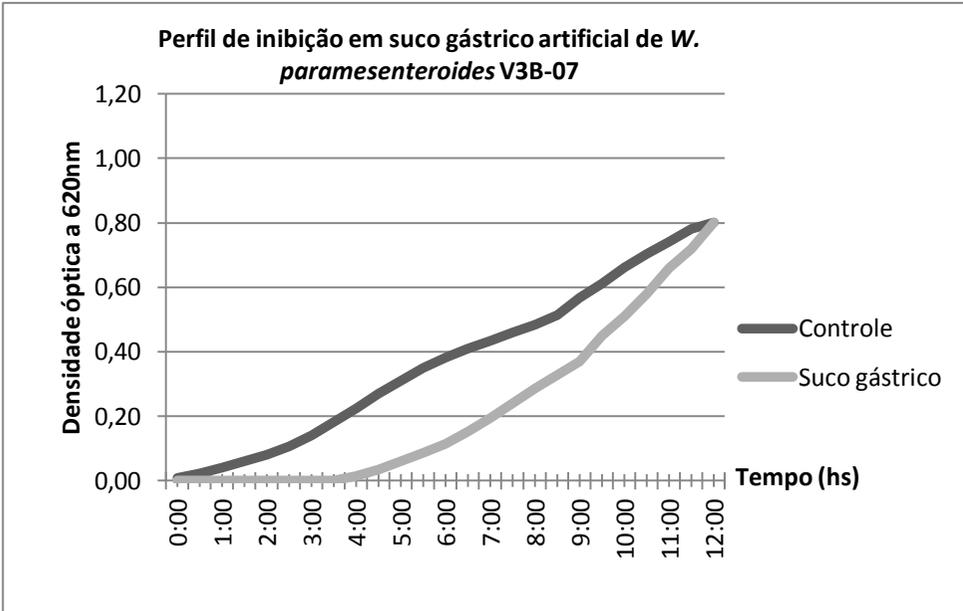


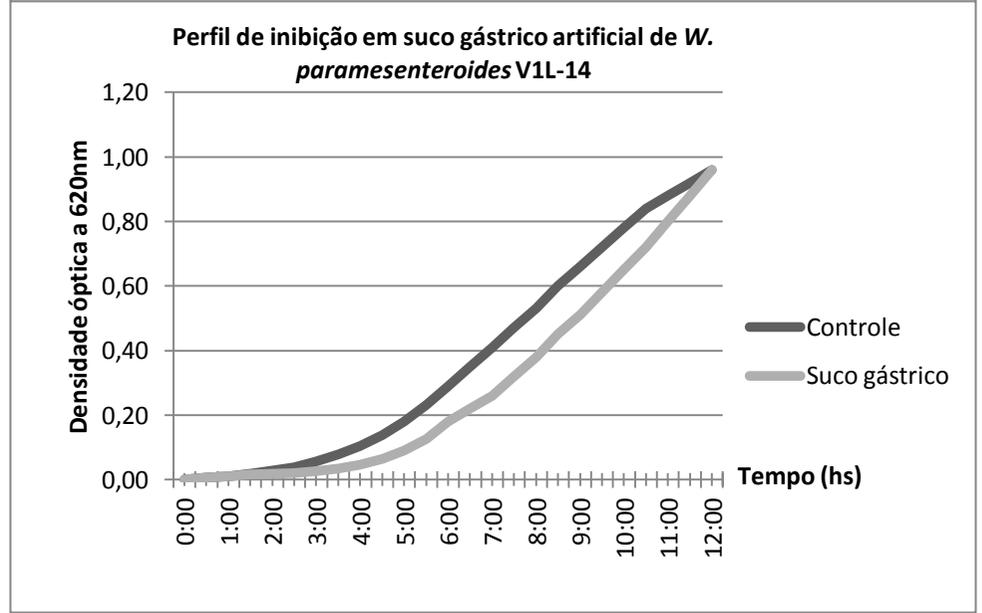
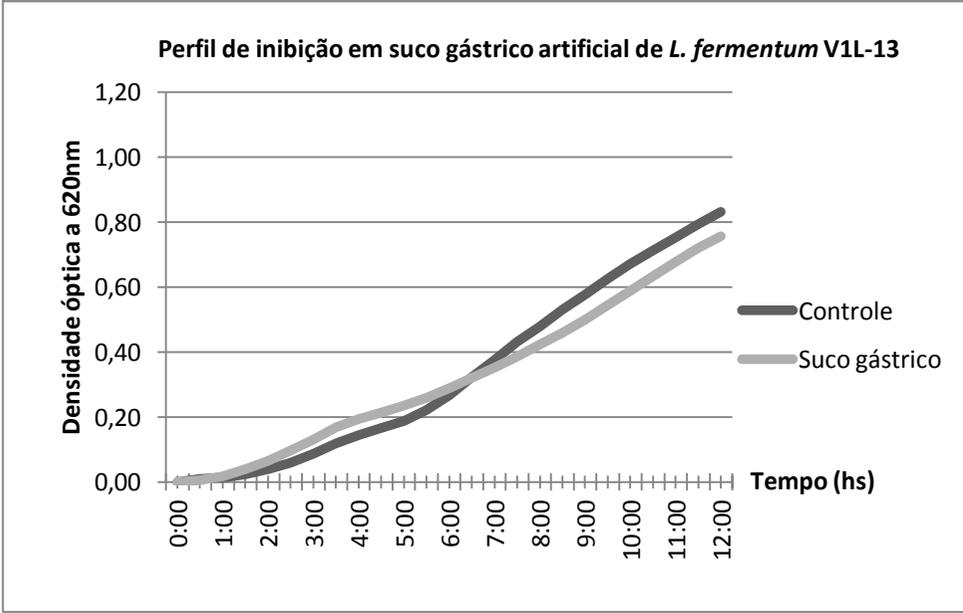
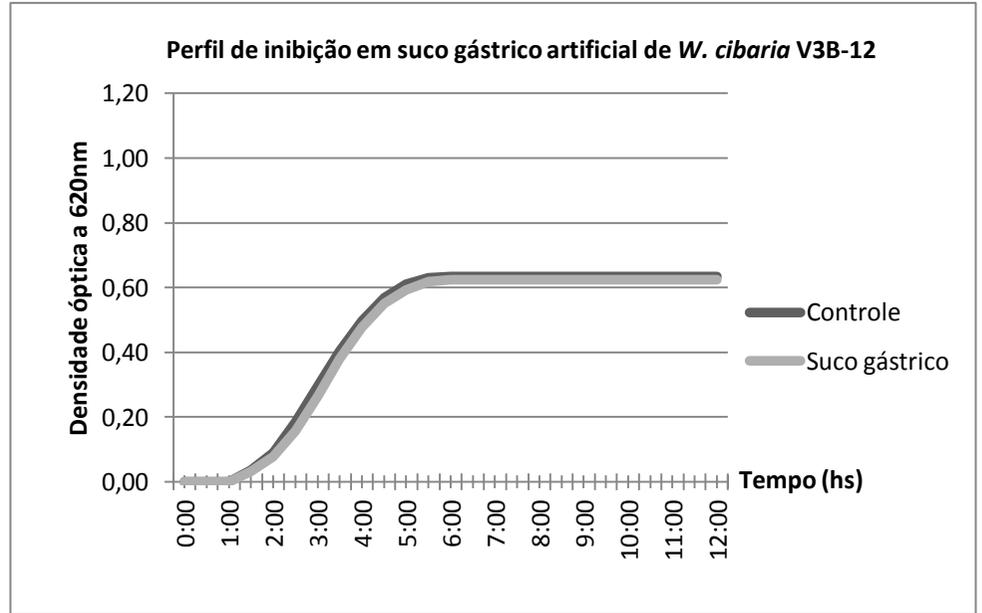
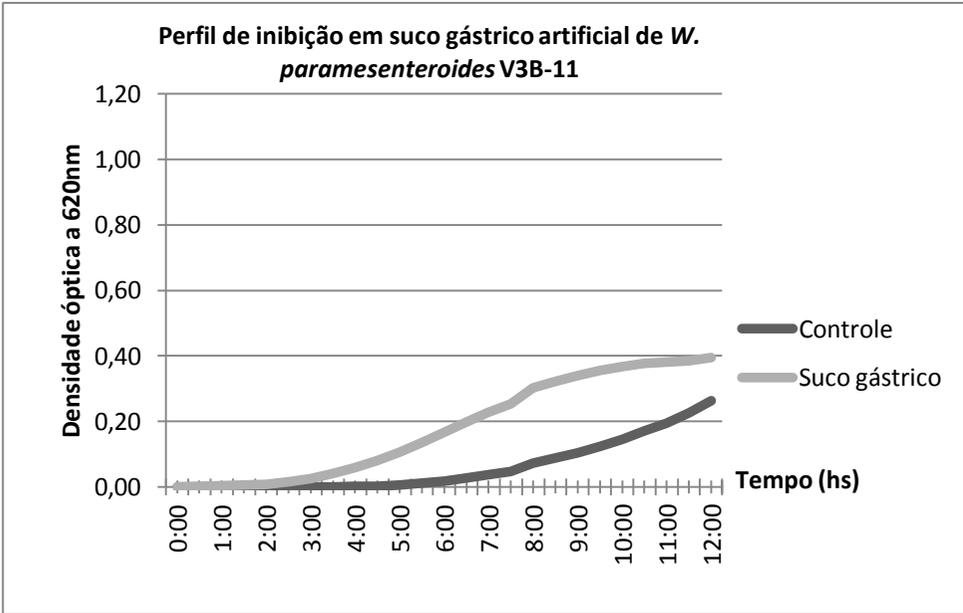
Perfil de inibição em suco gástrico artificial de *L. perolens* V2B-05



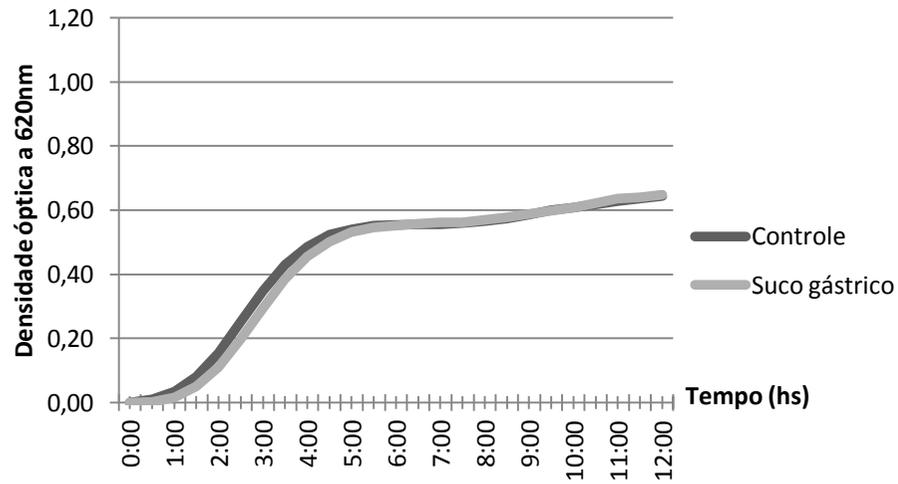
Perfil de inibição em suco gástrico artificial de *W. paramesenteroides* V2B-06



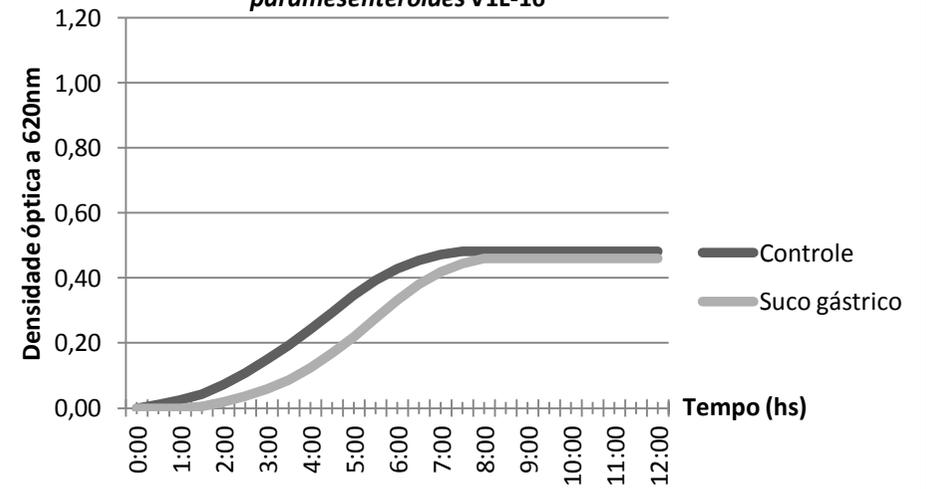




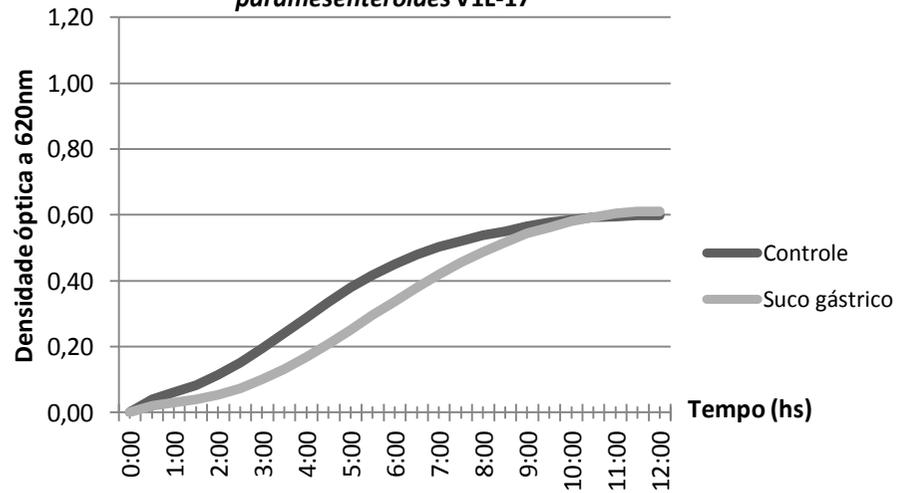
Perfil de inibição em suco gástrico artificial de *W. cibaria* V1L-15



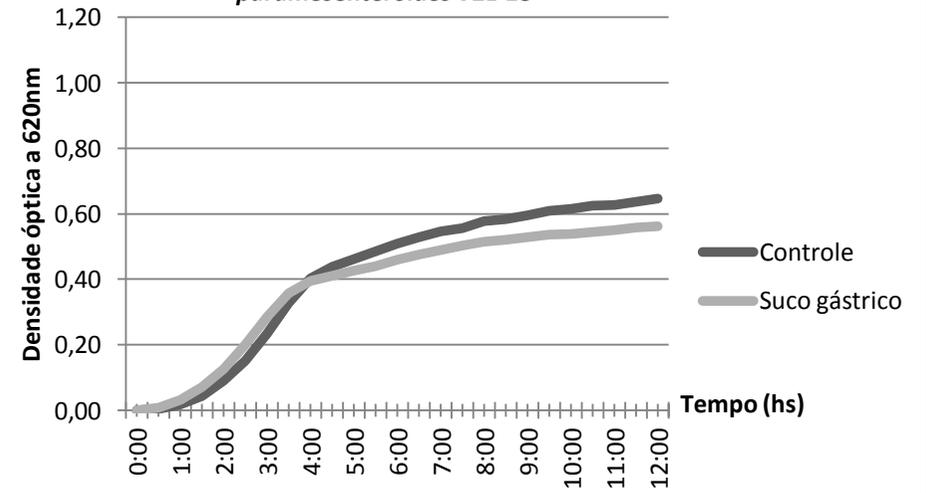
Perfil de inibição em suco gástrico artificial de *W. paramesenteroides* V1L-16

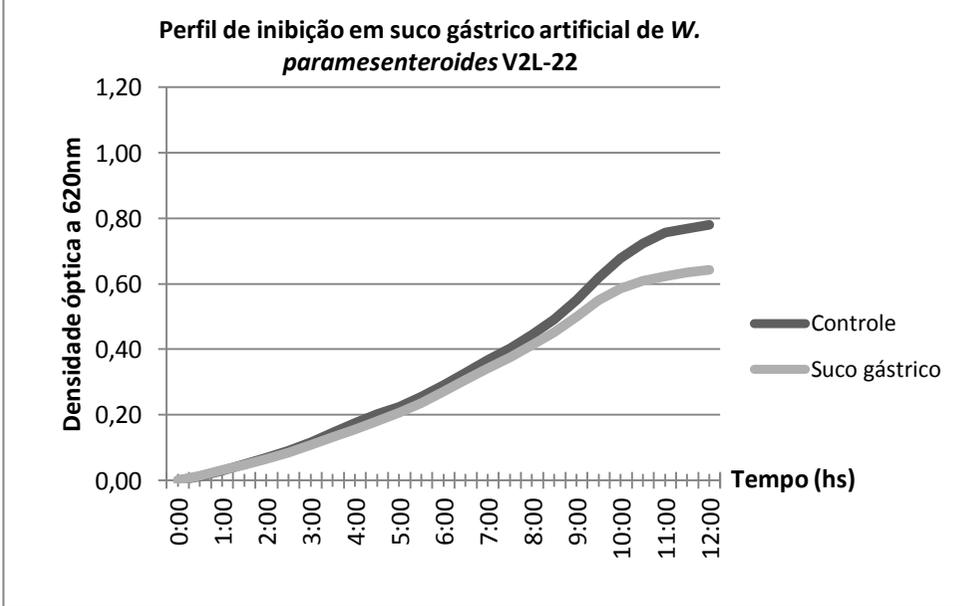
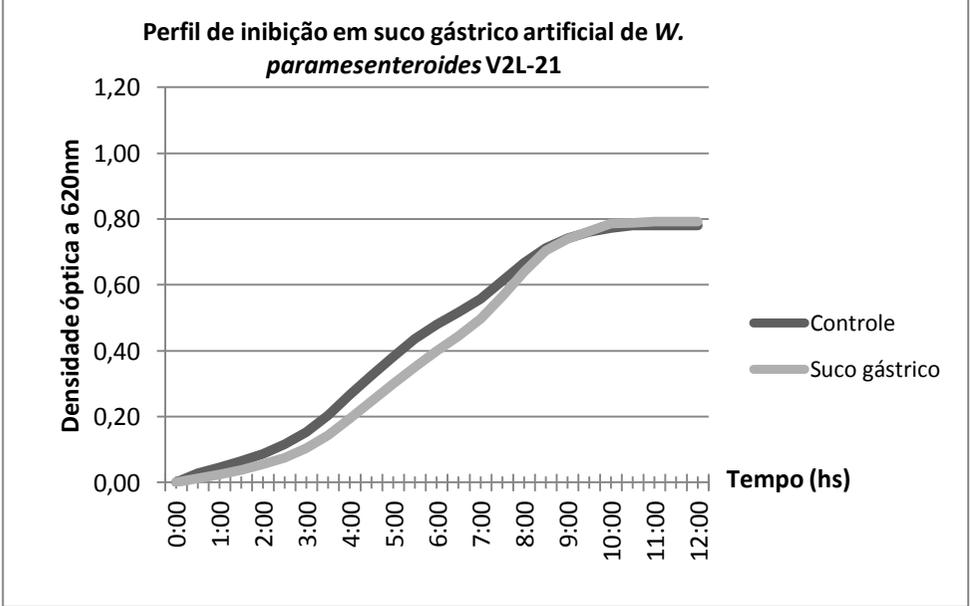
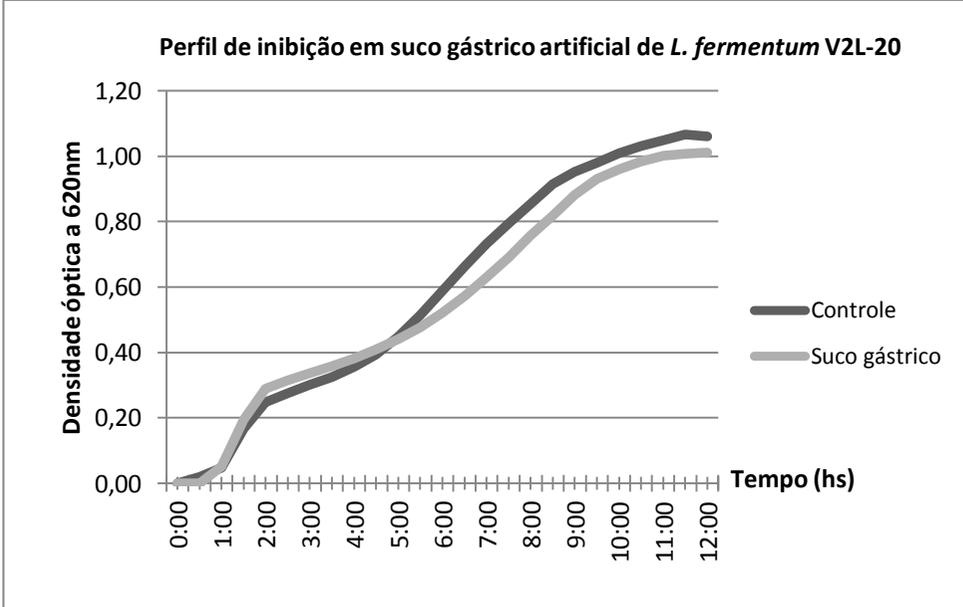
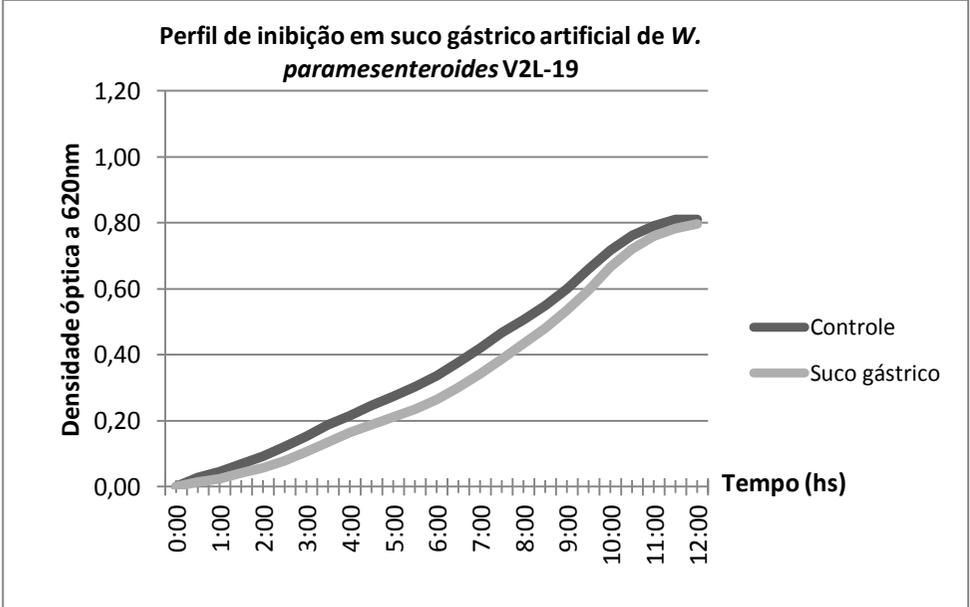


Perfil de inibição em suco gástrico artificial de *W. paramesenteroides* V1L-17

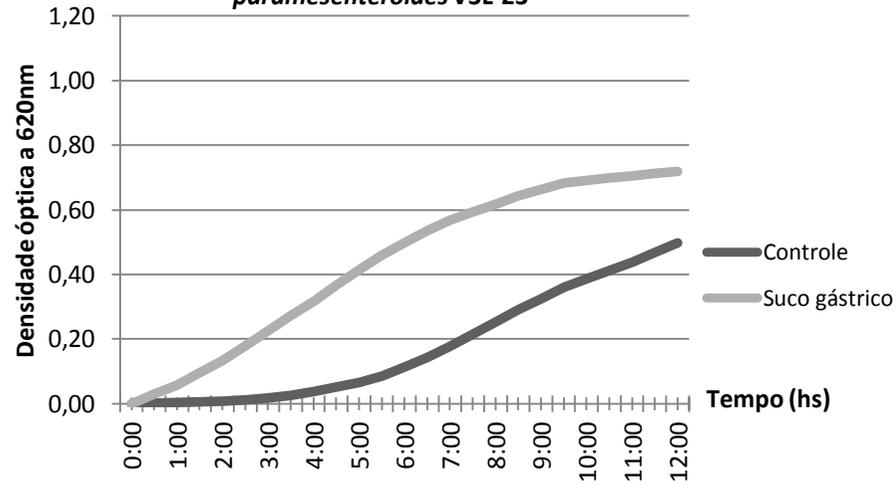


Perfil de inibição em suco gástrico artificial de *W. paramesenteroides* V2L-18

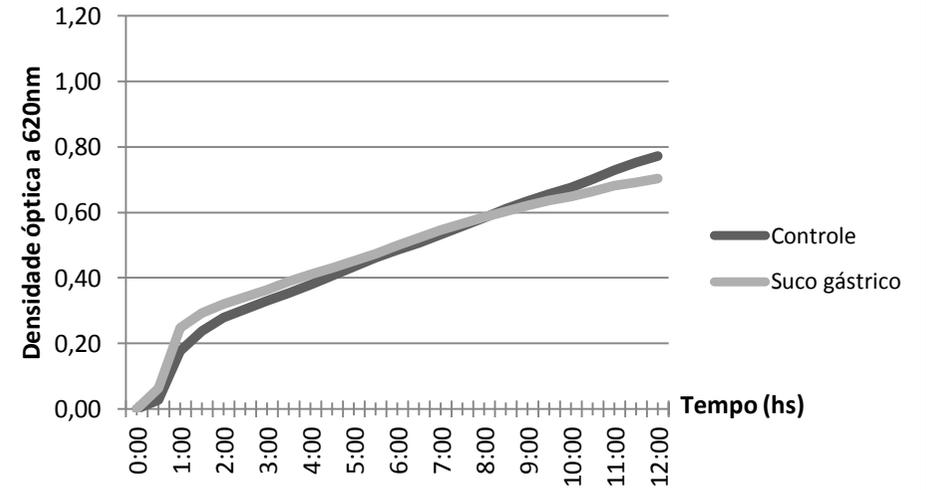




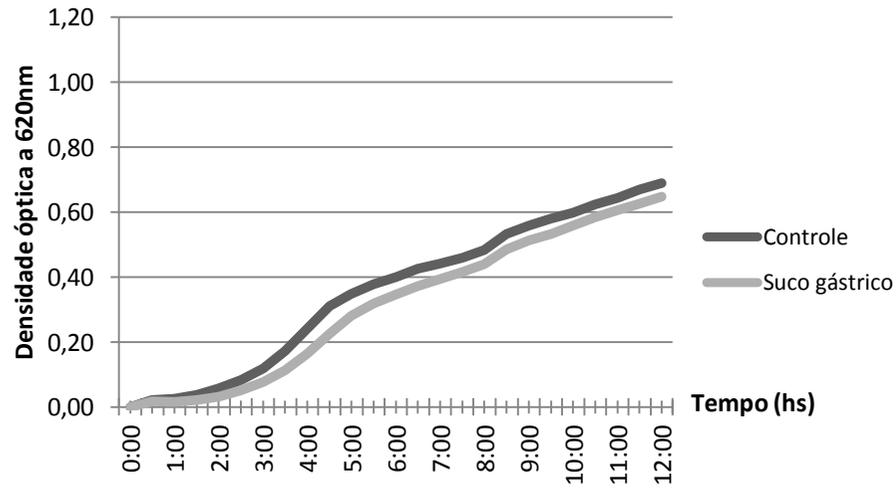
Perfil de inibição em suco gástrico artificial de *W. paramesenteroides* V3L-23



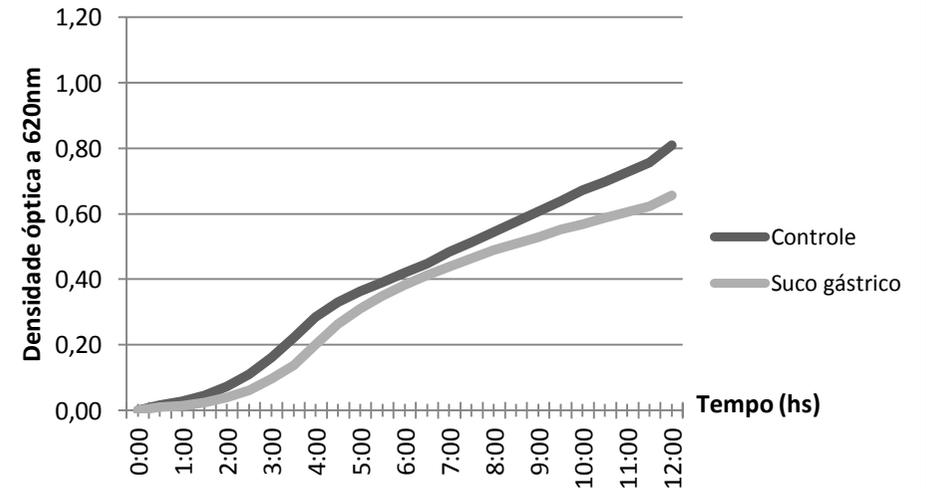
Perfil de inibição em suco gástrico artificial de *L. fermentum* V3L-24

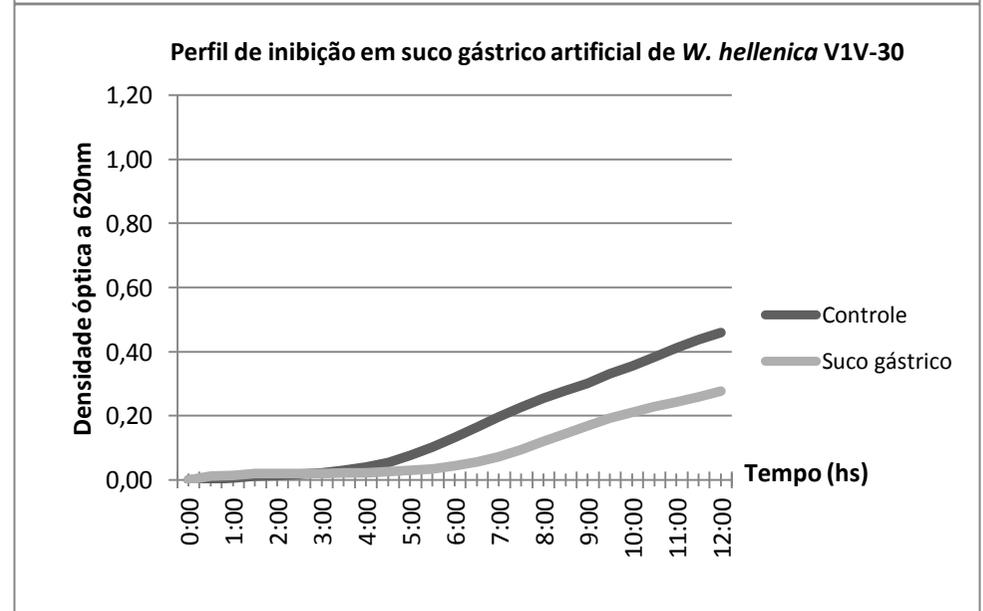
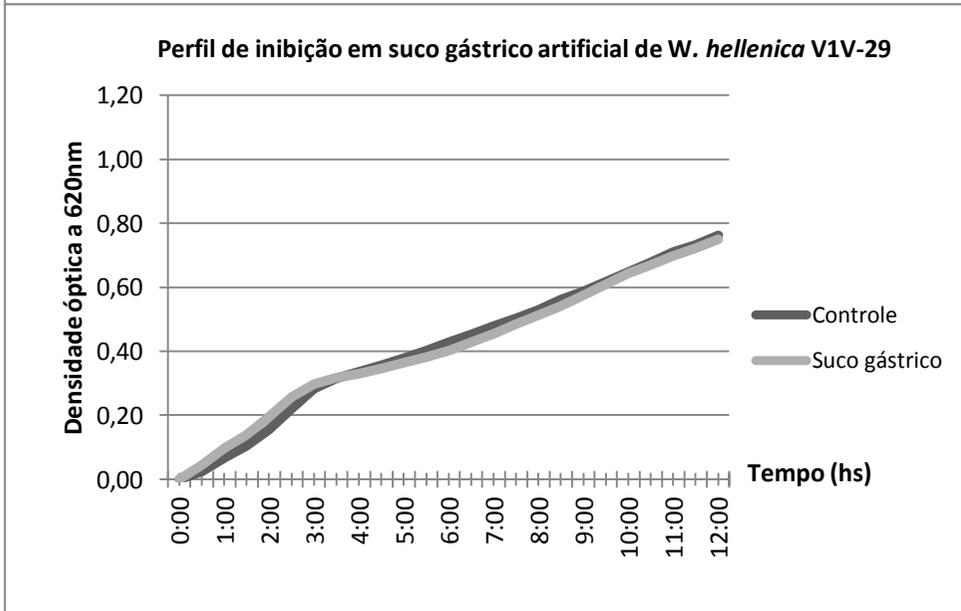
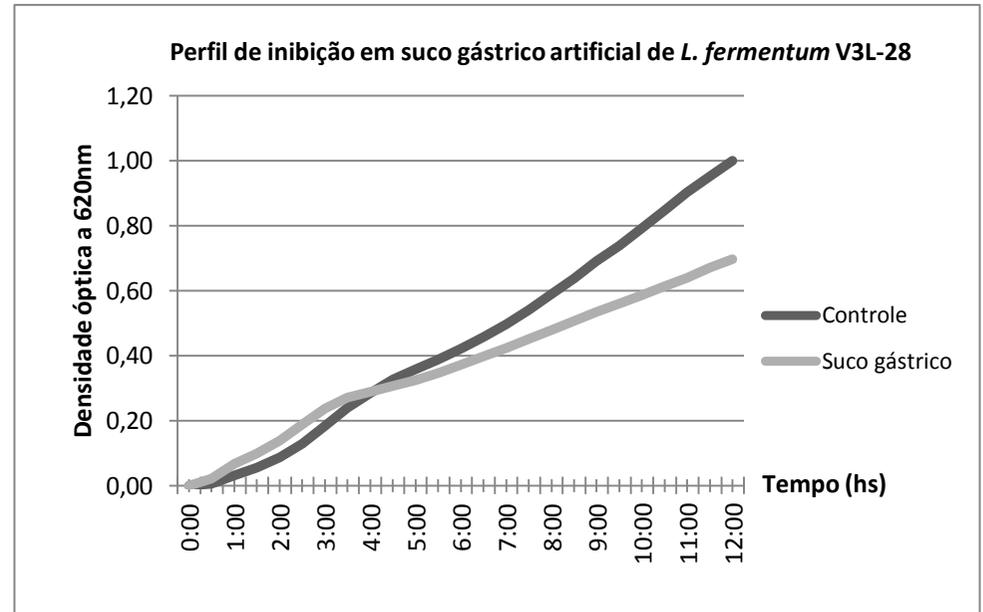
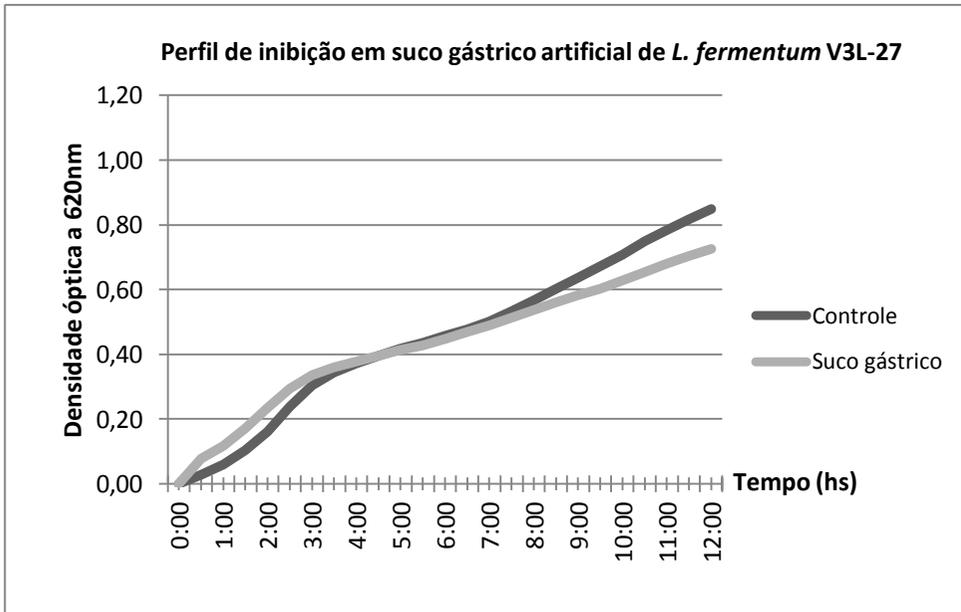


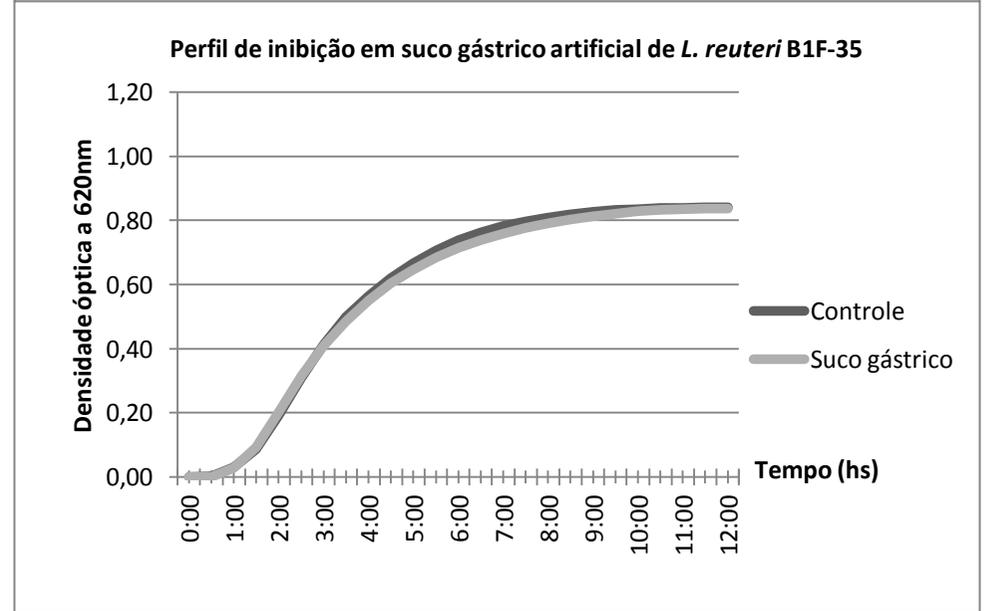
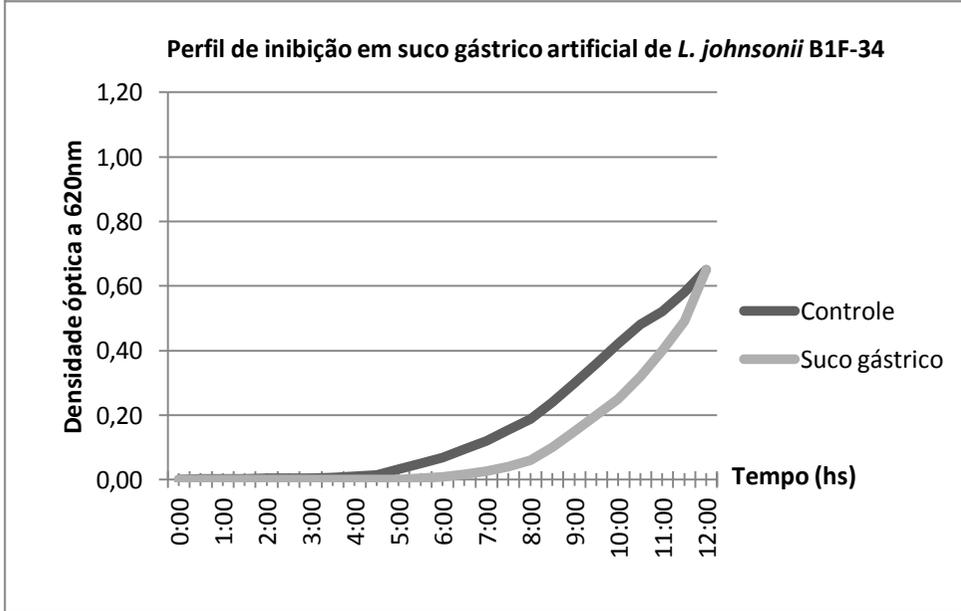
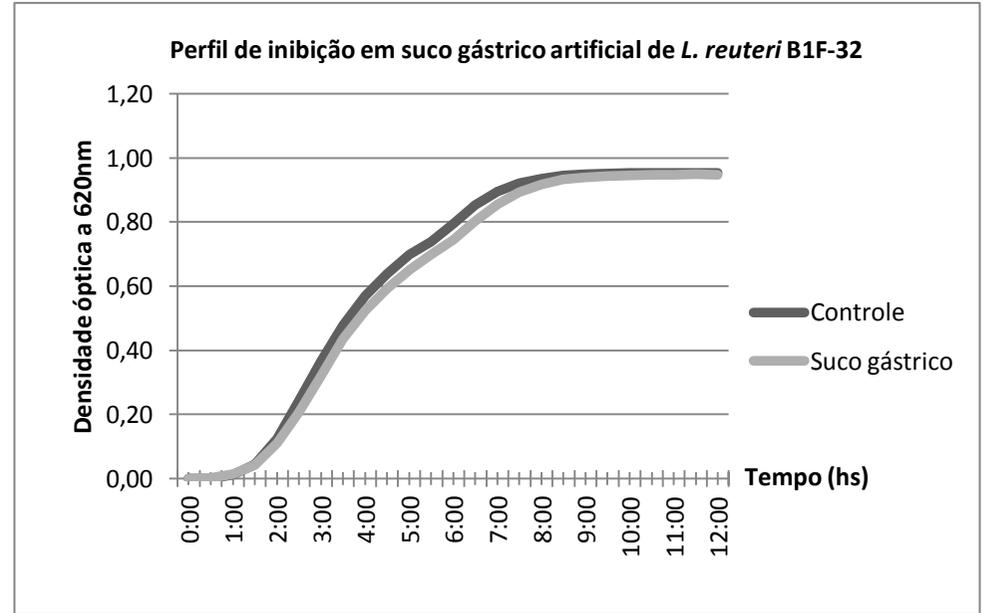
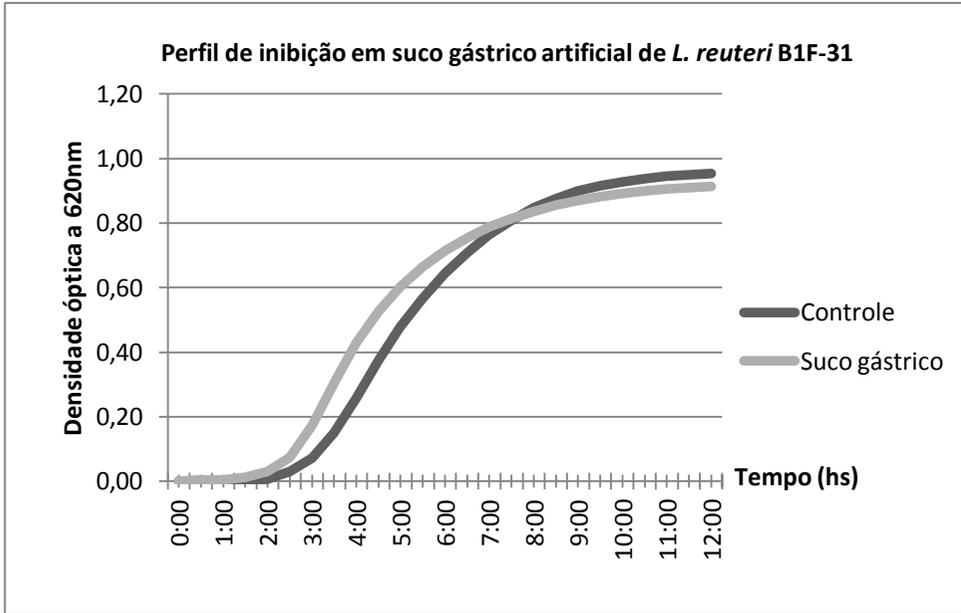
Perfil de inibição em suco gástrico artificial de *L. fermentum* V3L-25



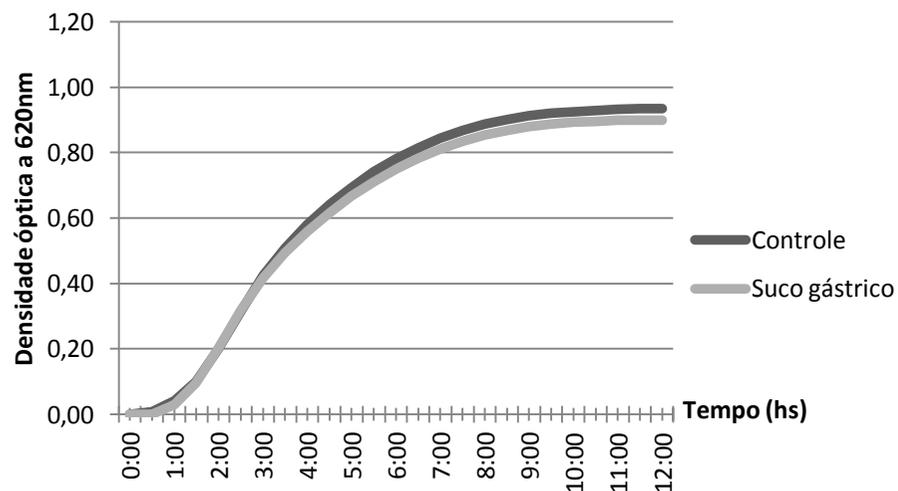
Perfil de inibição em suco gástrico artificial de *L. fermentum* V3L-26



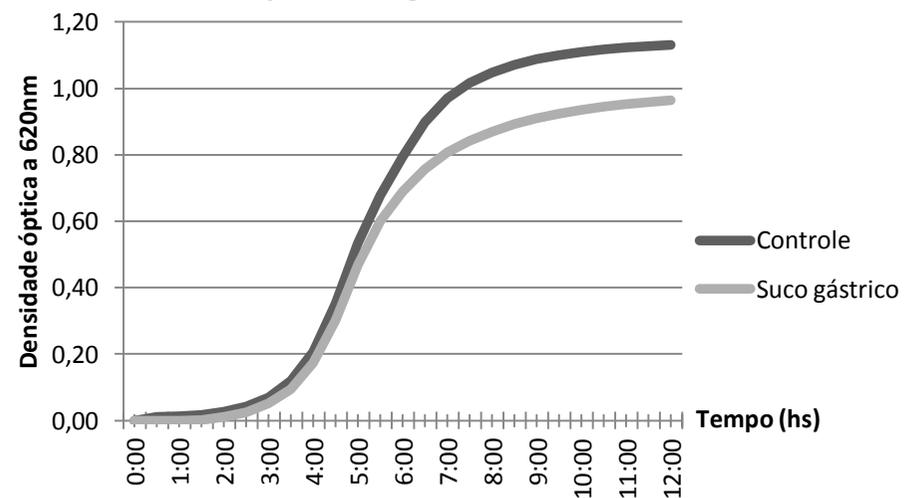




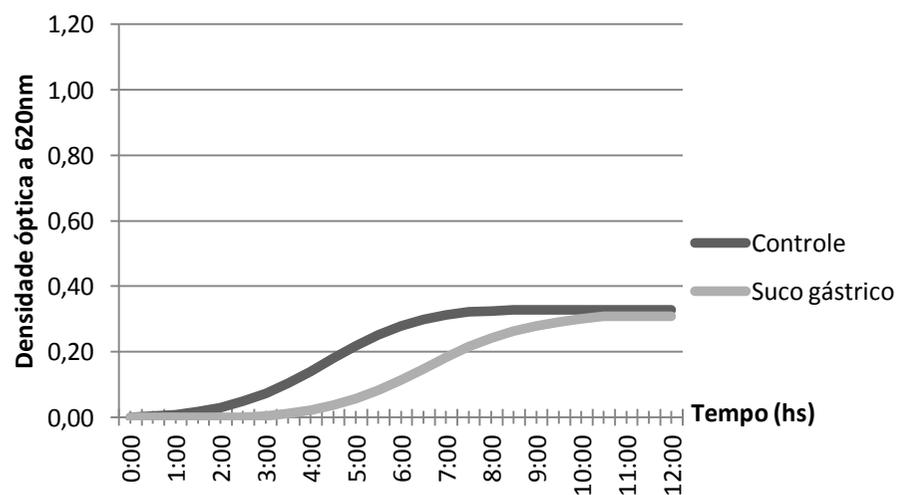
Perfil de inibição em suco gástrico artificial de *L. acidophilus* B1F-36



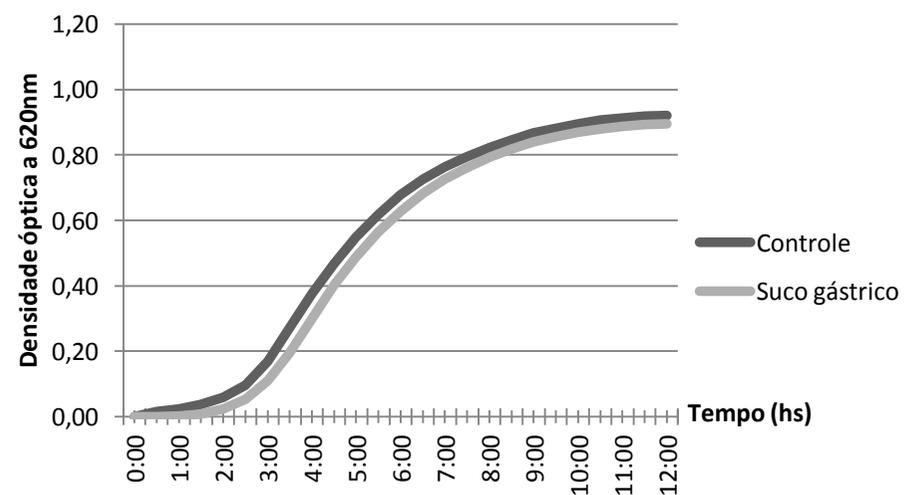
Perfil de inibição em suco gástrico artificial de *L. salivarius* B2F-38



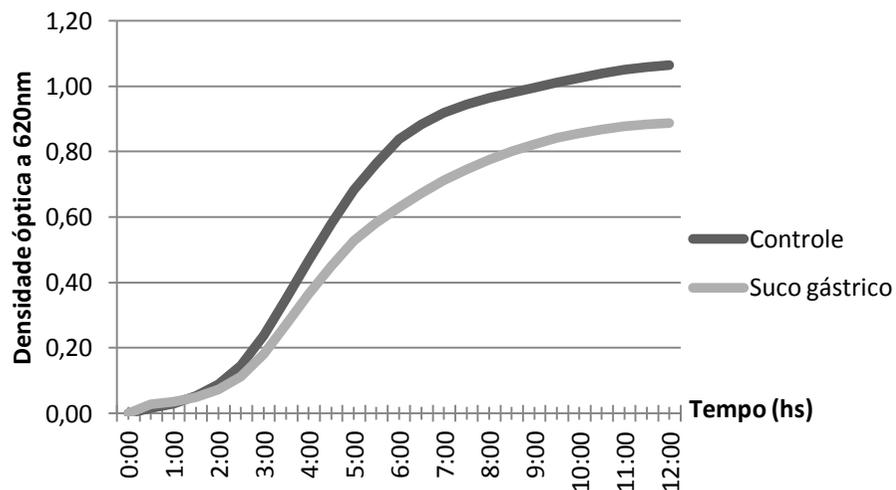
Perfil de inibição em suco gástrico artificial de *L. johnsonii* B2F-40



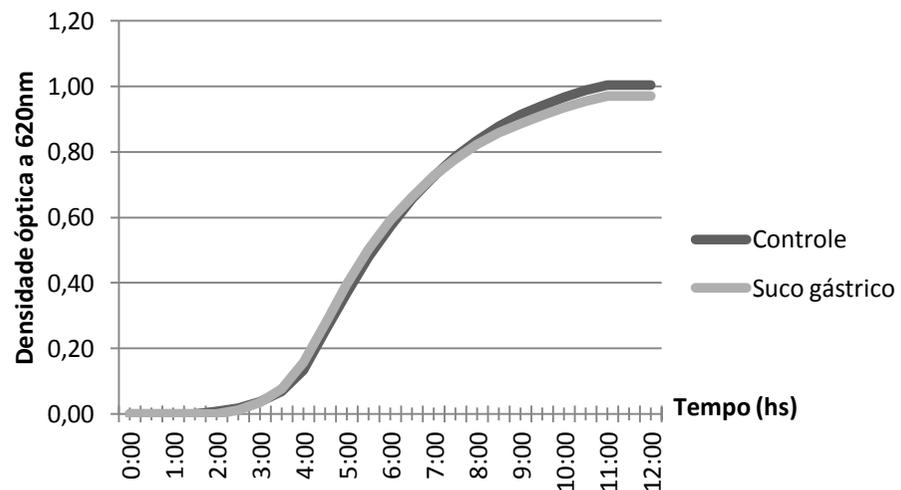
Perfil de inibição em suco gástrico artificial de *L. reuteri* B2F-41



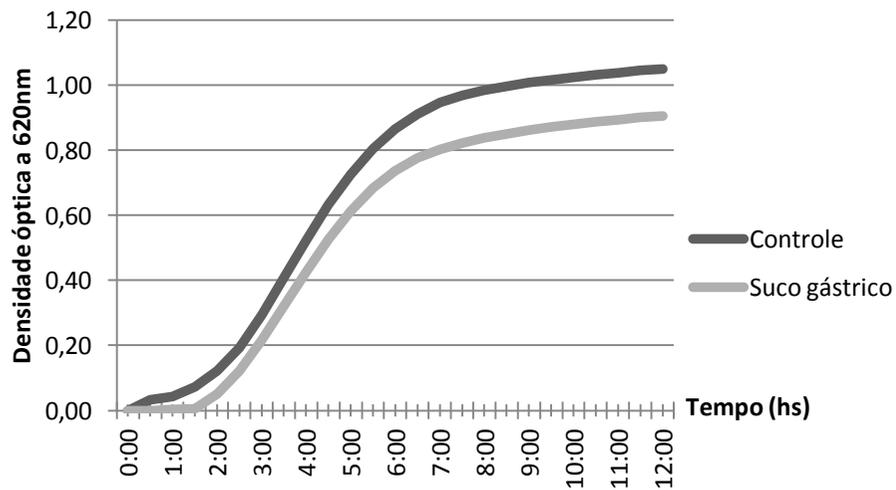
Perfil de inibição em suco gástrico artificial de *L. johnsonii* B3F-44



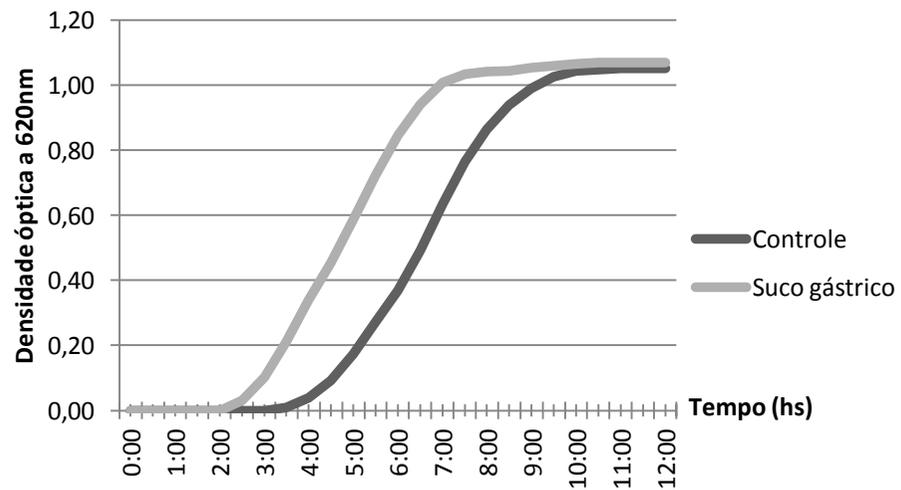
Perfil de inibição em suco gástrico artificial de *L. johnsonii* B3F-46



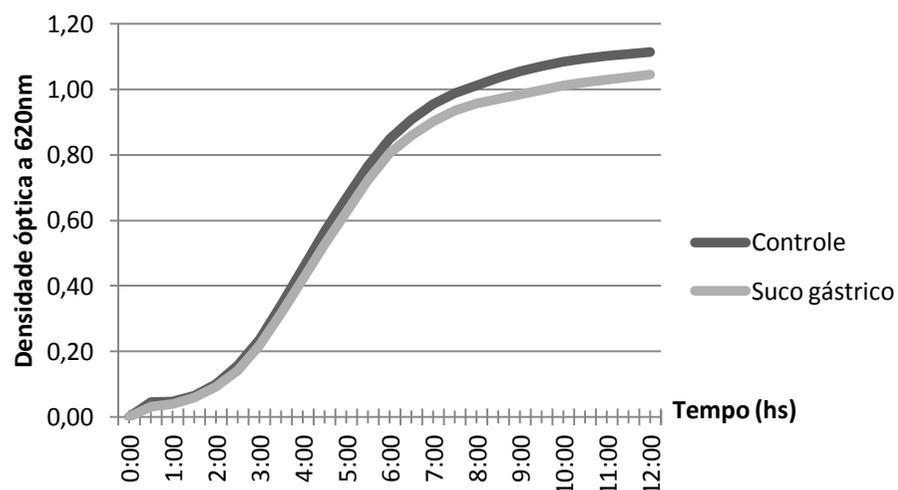
Perfil de inibição em suco gástrico artificial de *L. reuteri* B4F-01



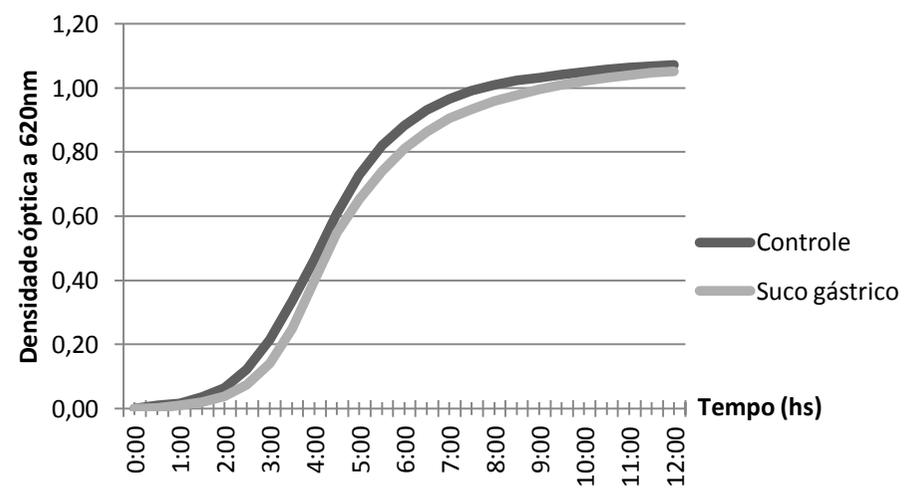
Perfil de inibição em suco gástrico artificial de *L. casei* B4F-02



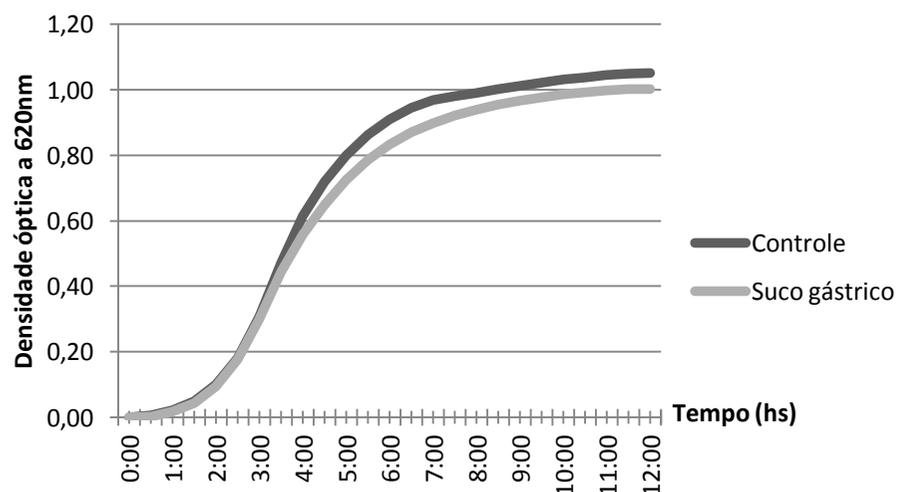
Perfil de inibição em suco gástrico artificial de *L. reuteri* B4F-03



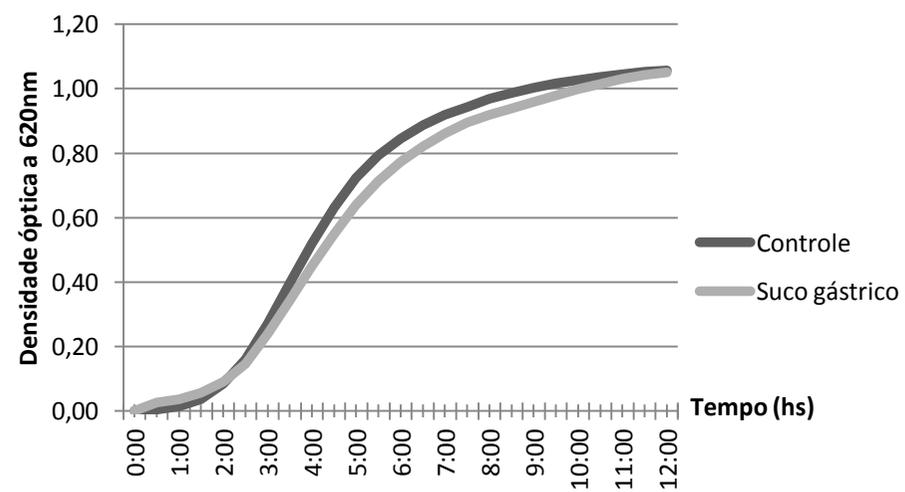
Perfil de inibição em suco gástrico artificial de *L. alimentarius* B4F-04



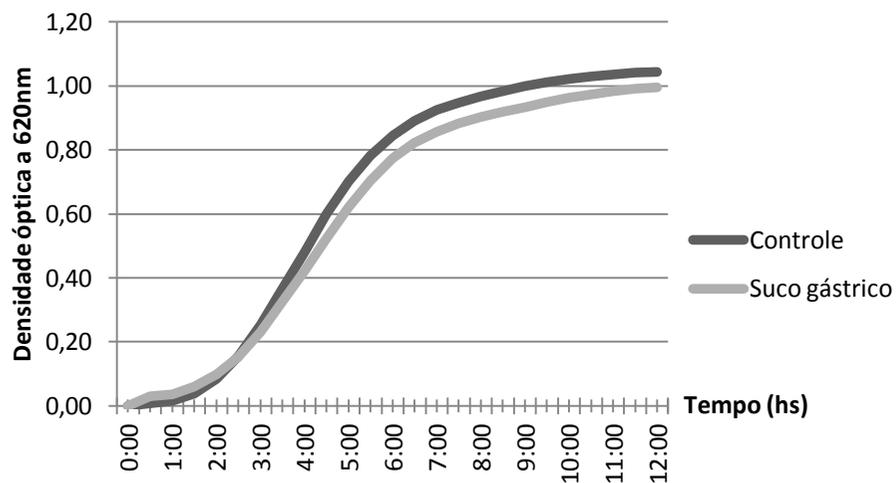
Perfil de inibição em suco gástrico artificial de *L. farciminis* B4F-06



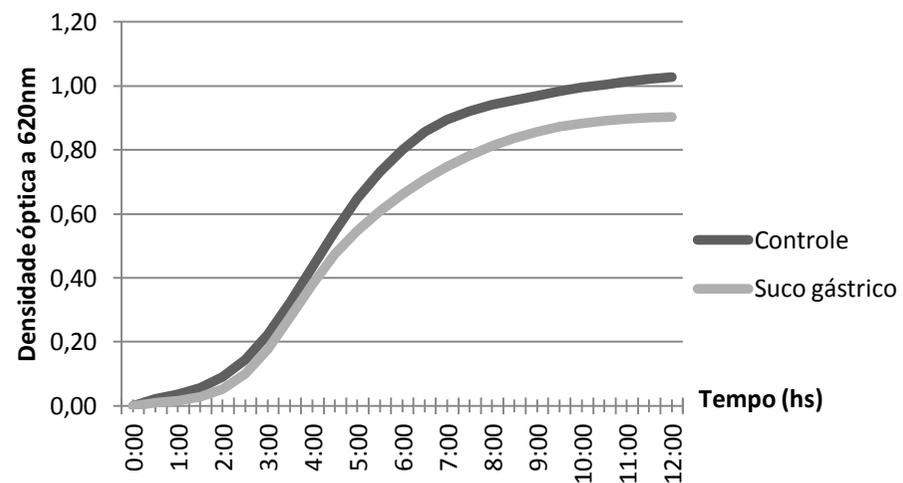
Perfil de inibição em suco gástrico artificial de *L. reuteri* B4F-07



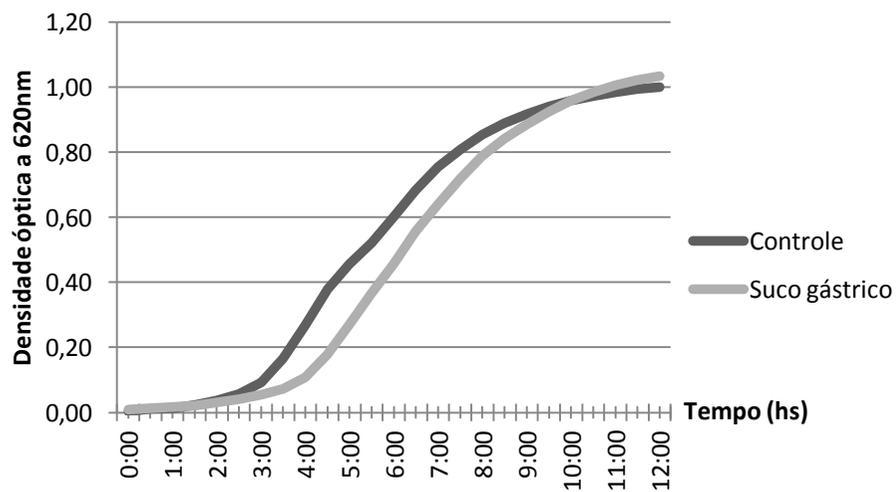
Perfil de inibição em suco gástrico artificial de *L. reuteri* B4F-08



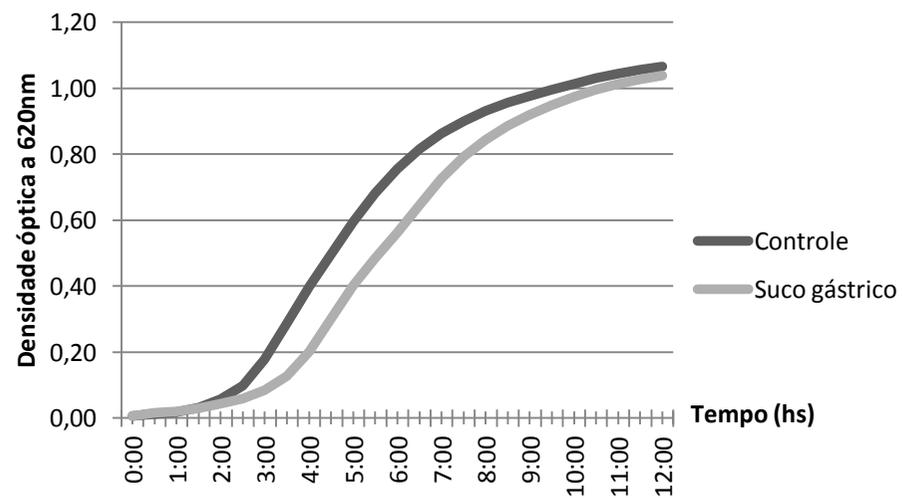
Perfil de inibição em suco gástrico artificial de *L. reuteri* B4F-09

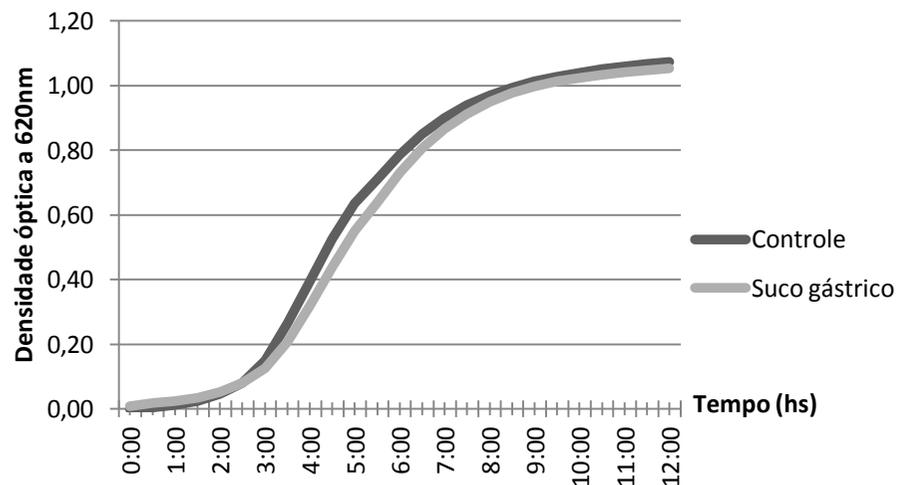
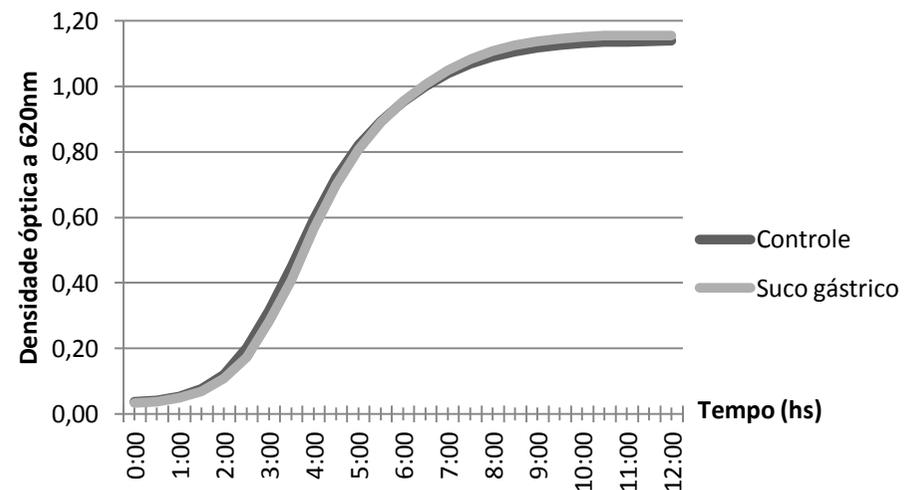
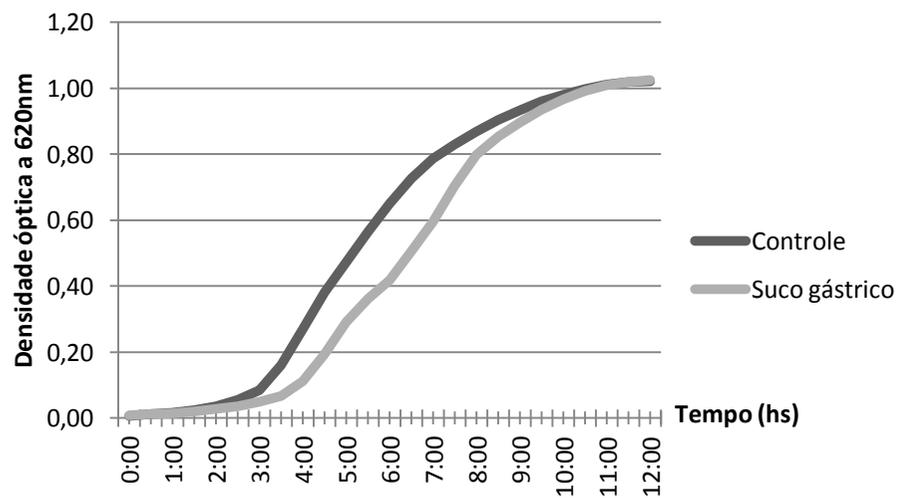
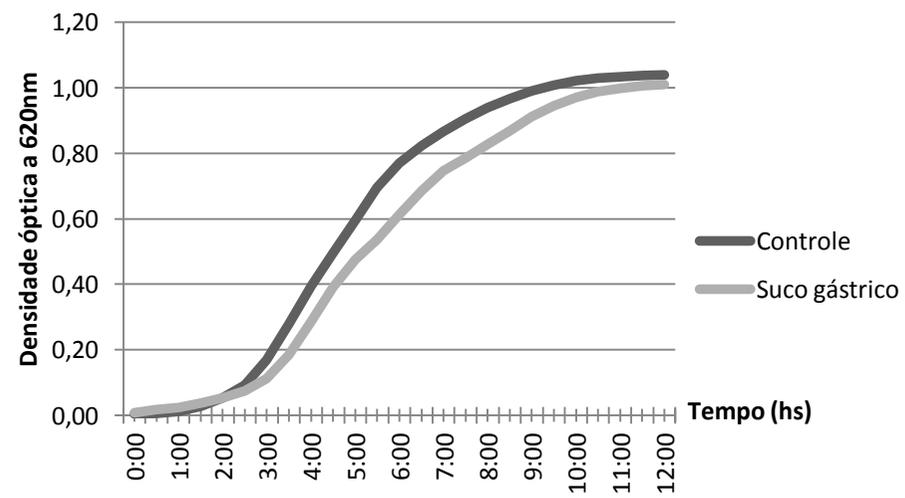


Perfil de inibição em suco gástrico artificial de *L. reuteri* B5F-01

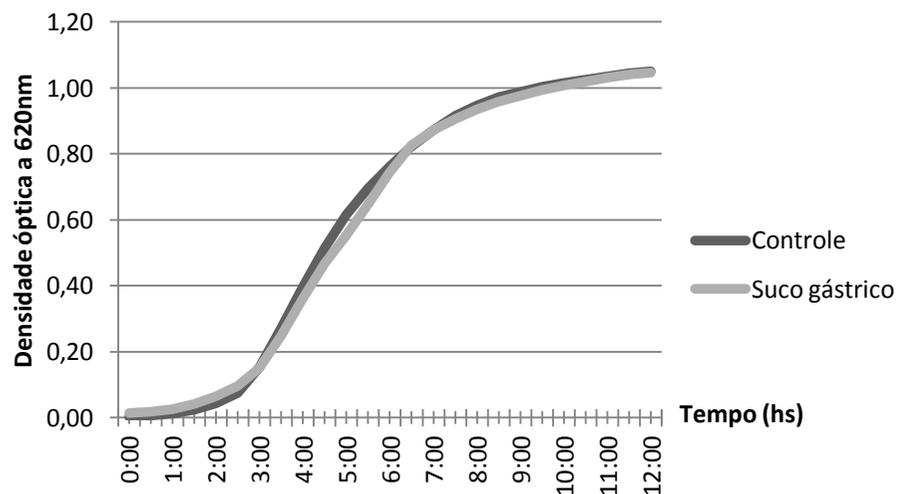


Perfil de inibição em suco gástrico artificial de *L. reuteri* B5F-02

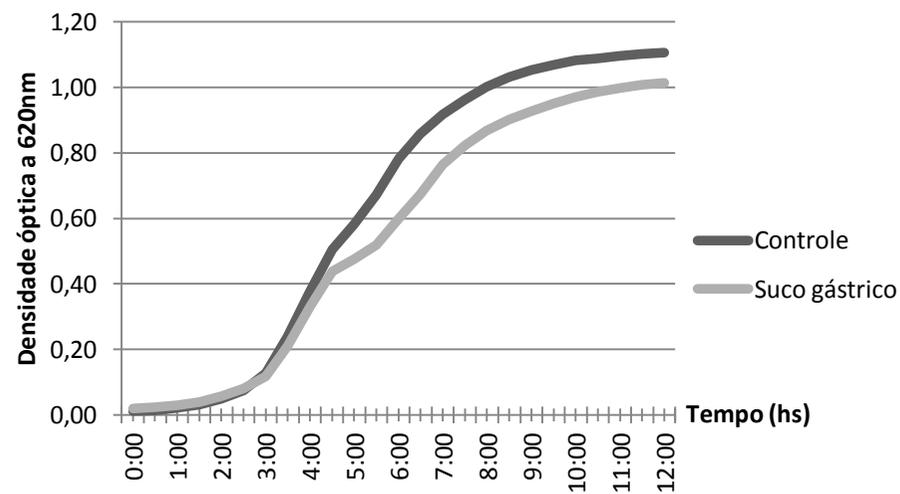


Perfil de inibição em suco gástrico artificial de *L. reuteri* B5F-03Perfil de inibição em suco gástrico artificial de *L. reuteri* B5F-04Perfil de inibição em suco gástrico artificial de *L. reuteri* B5F-05Perfil de inibição em suco gástrico artificial de *L. reuteri* B5F-06

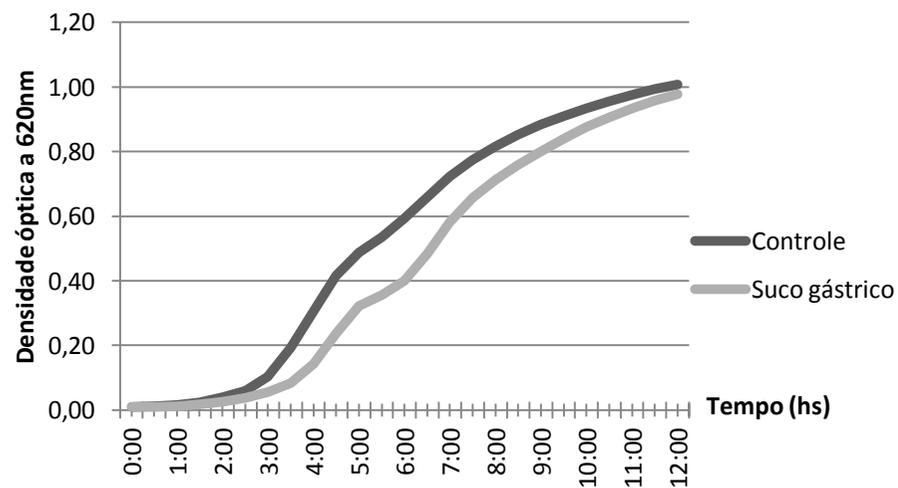
Perfil de inibição em suco gástrico artificial de *L. reuteri* B5F-07



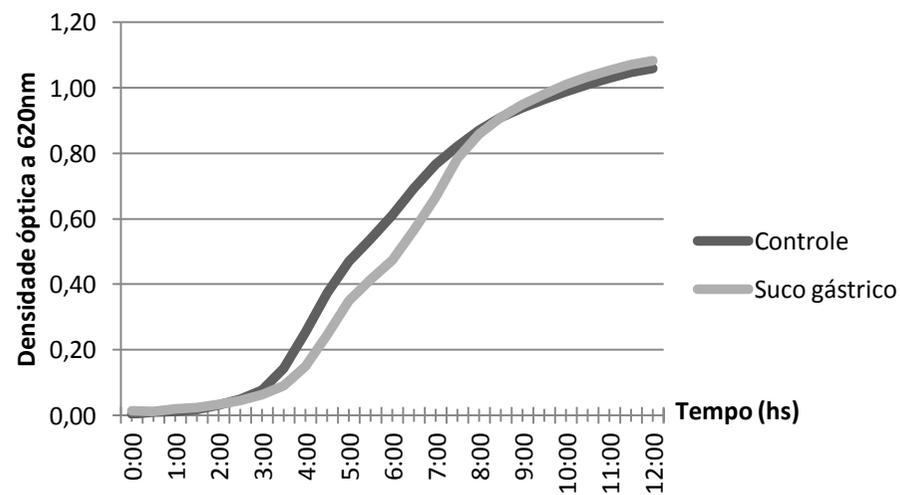
Perfil de inibição em suco gástrico artificial de *L. reuteri* B5F-08

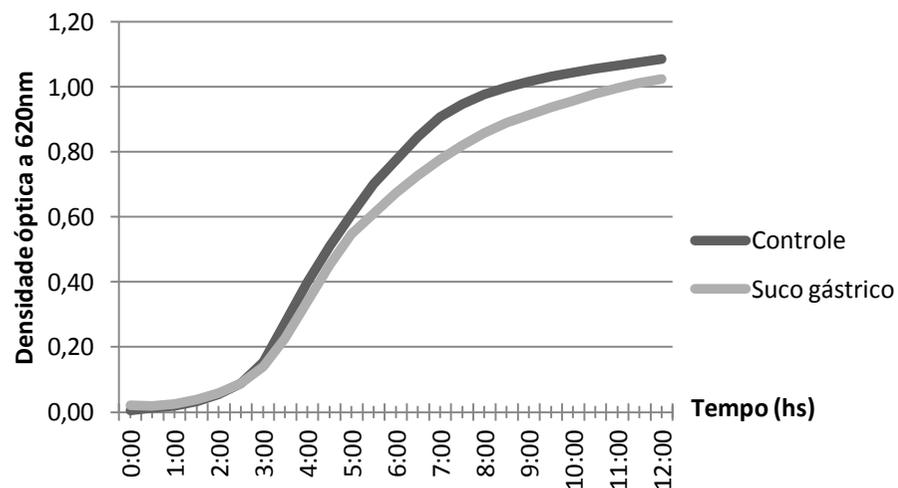
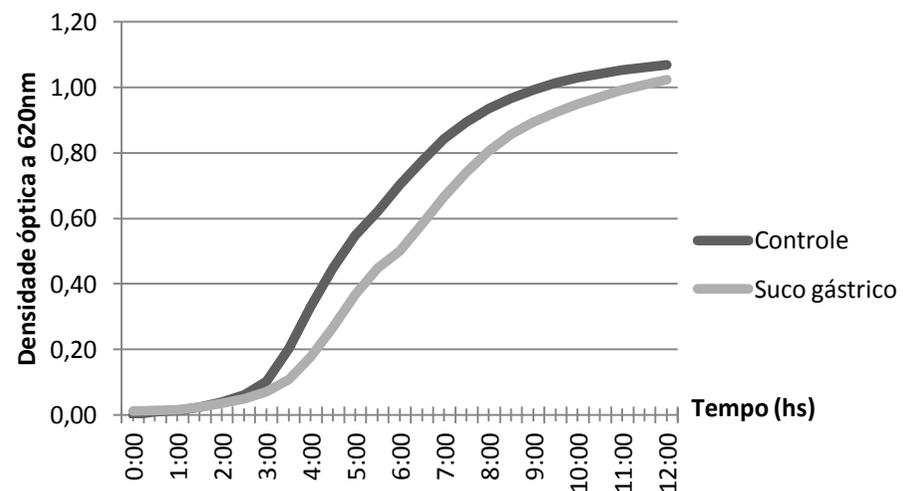
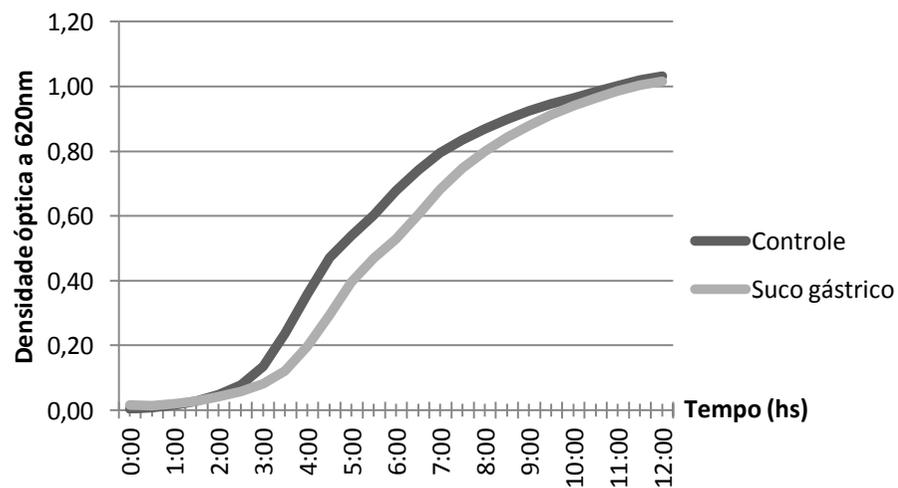
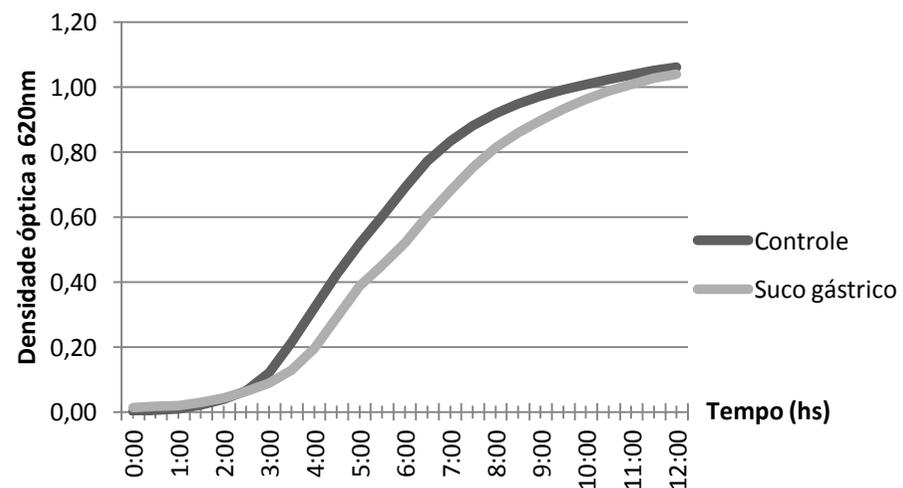


Perfil de inibição em suco gástrico artificial de *L. reuteri* B5F-09

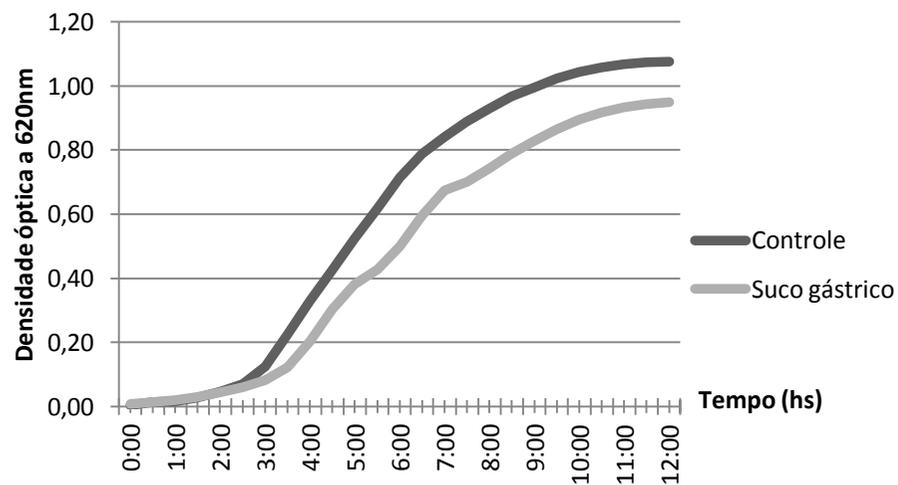


Perfil de inibição em suco gástrico artificial de *L. reuteri* B6F-01

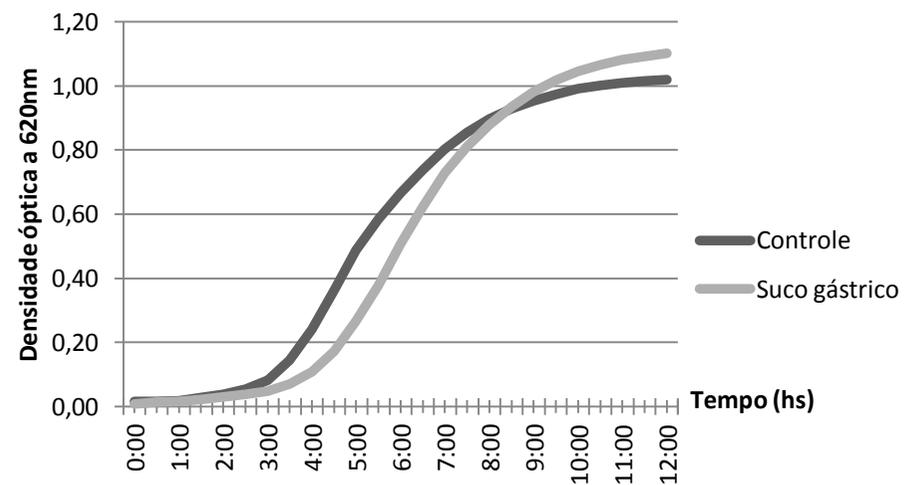


Perfil de inibição em suco gástrico artificial de *L. reuteri* B6F-02Perfil de inibição em suco gástrico artificial de *L. reuteri* B6F-03Perfil de inibição em suco gástrico artificial de *L. reuteri* B6F-04Perfil de inibição em suco gástrico artificial de *L. reuteri* B6F-05

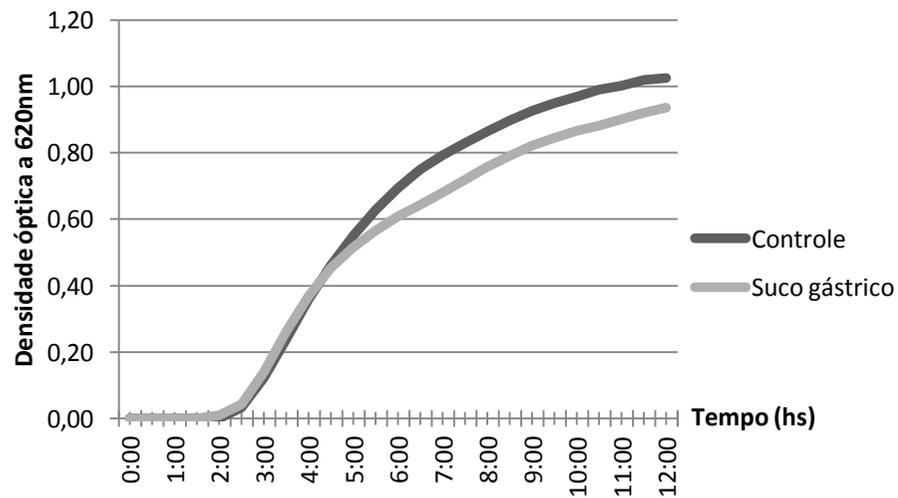
Perfil de inibição em suco gástrico artificial de *L. reuteri* B6F-06



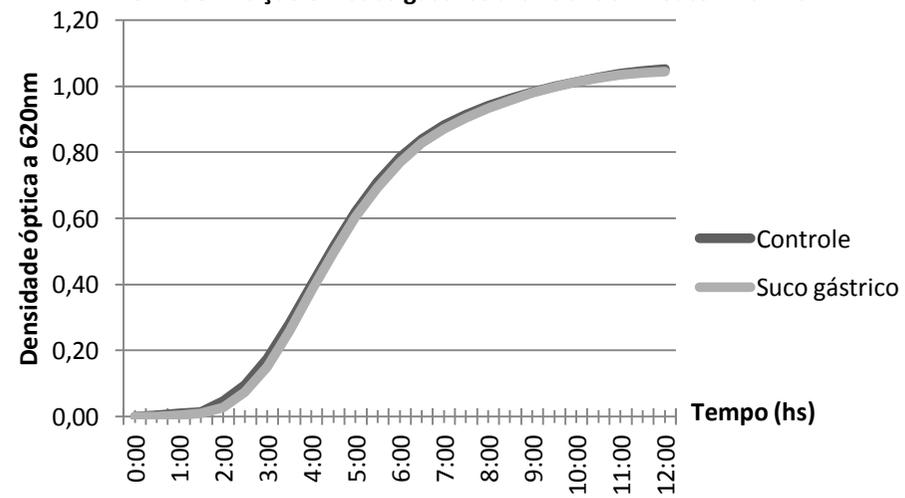
Perfil de inibição em suco gástrico artificial de *L. reuteri* B6F-07



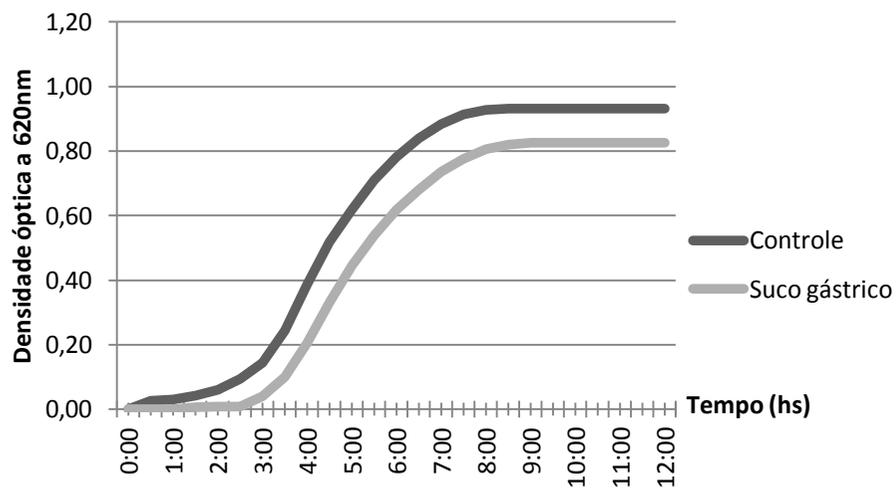
Perfil de inibição em suco gástrico artificial de *L. reuteri* B6F-08



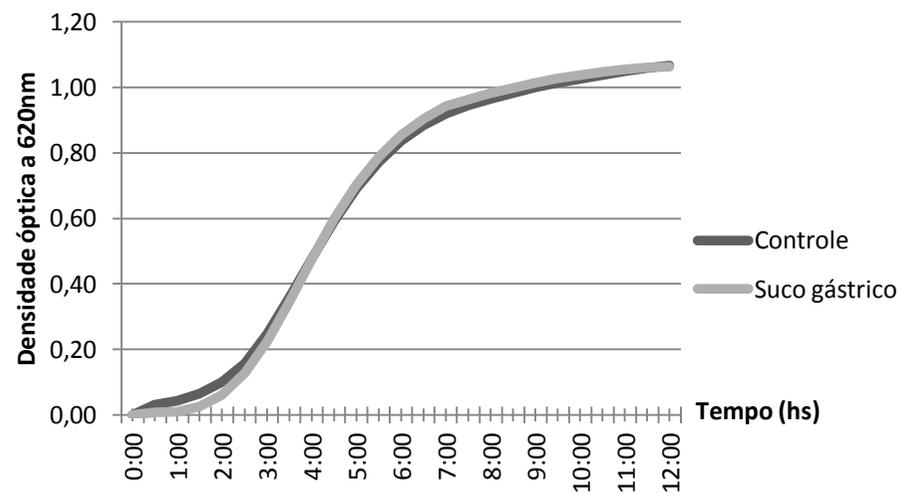
Perfil de inibição em suco gástrico artificial de *L. reuteri* B6F-10



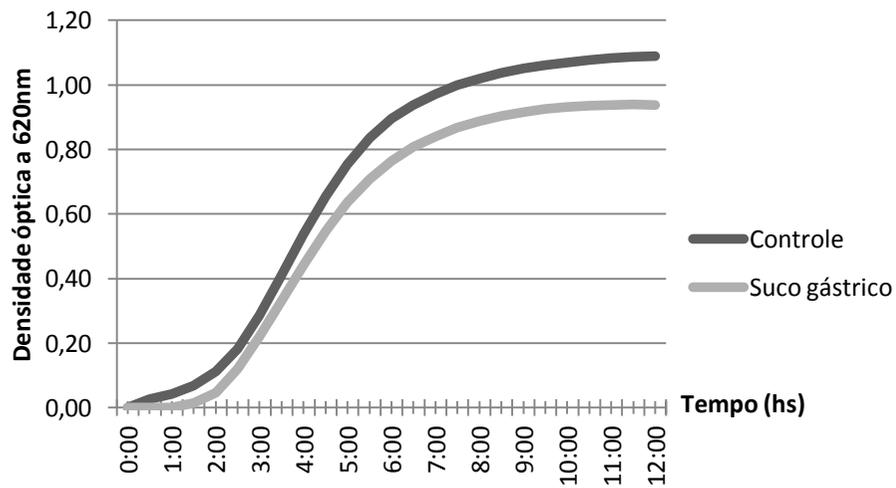
Perfil de inibição em suco gástrico artificial de *L. reuteri* B6F-11



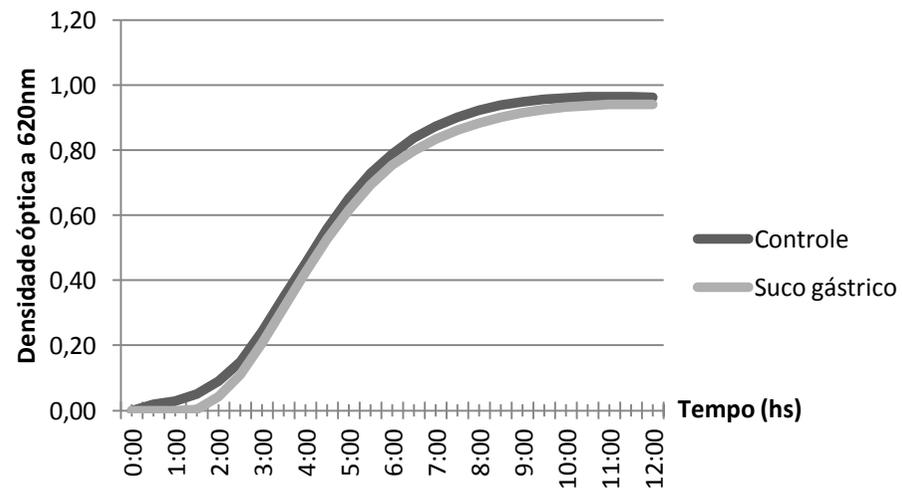
Perfil de inibição em suco gástrico artificial de *L. reuteri* B3F-A



Perfil de inibição em suco gástrico artificial de *L. reuteri* B3F-B

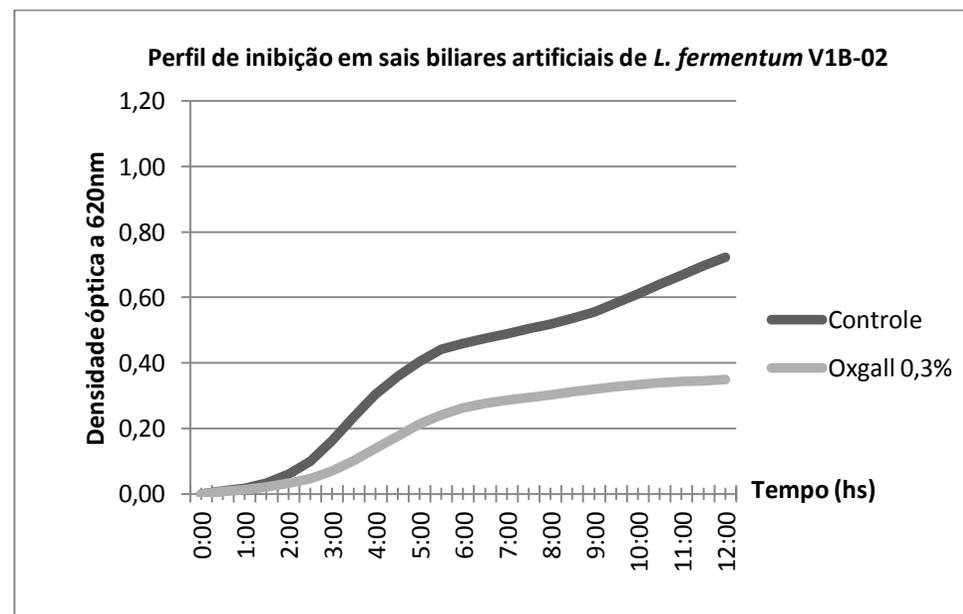
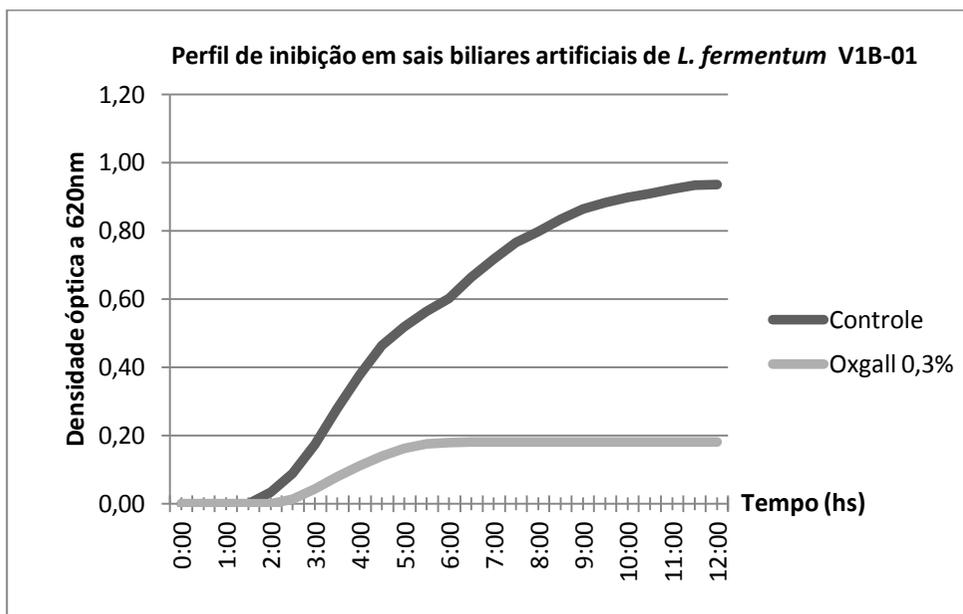


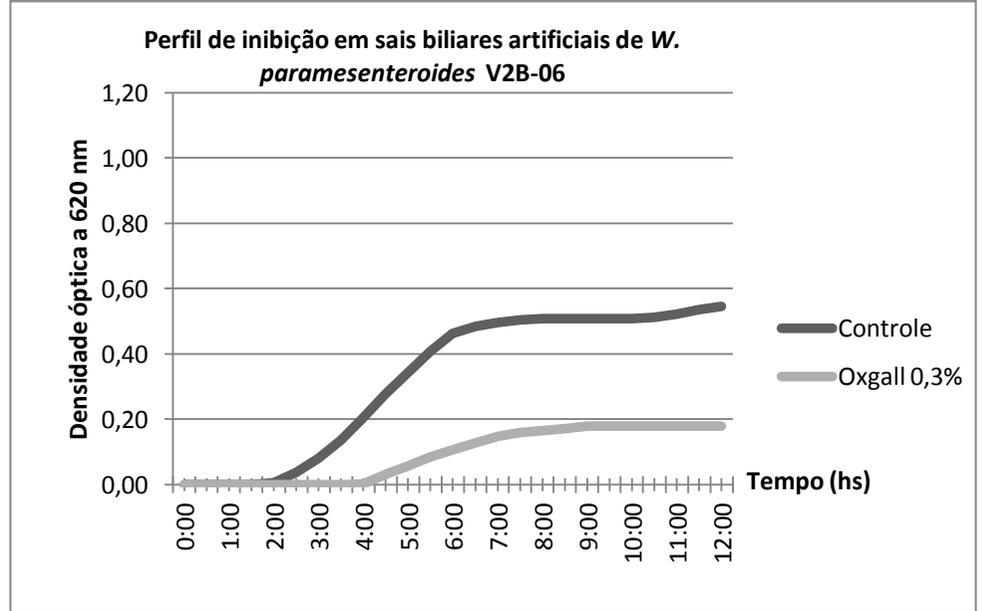
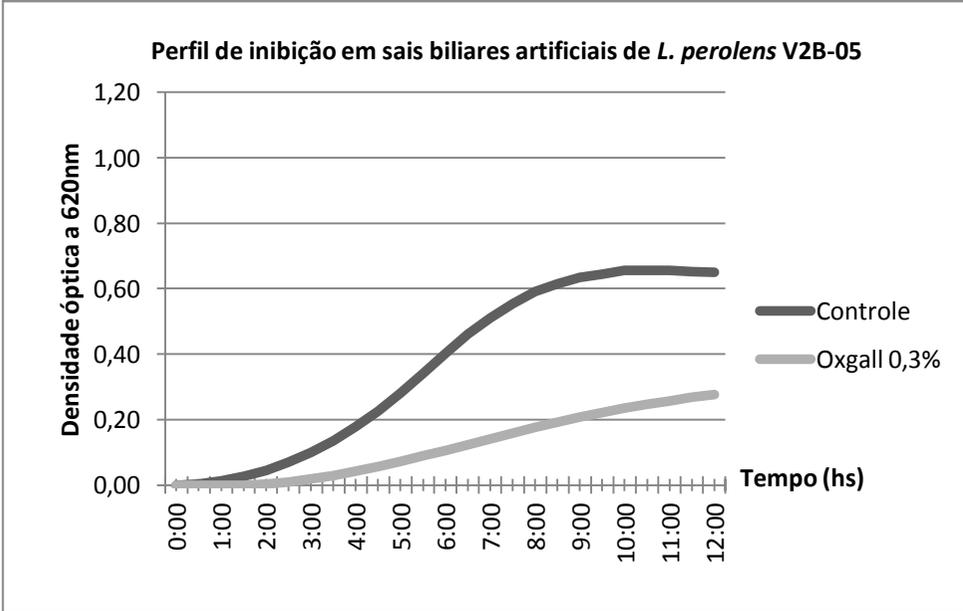
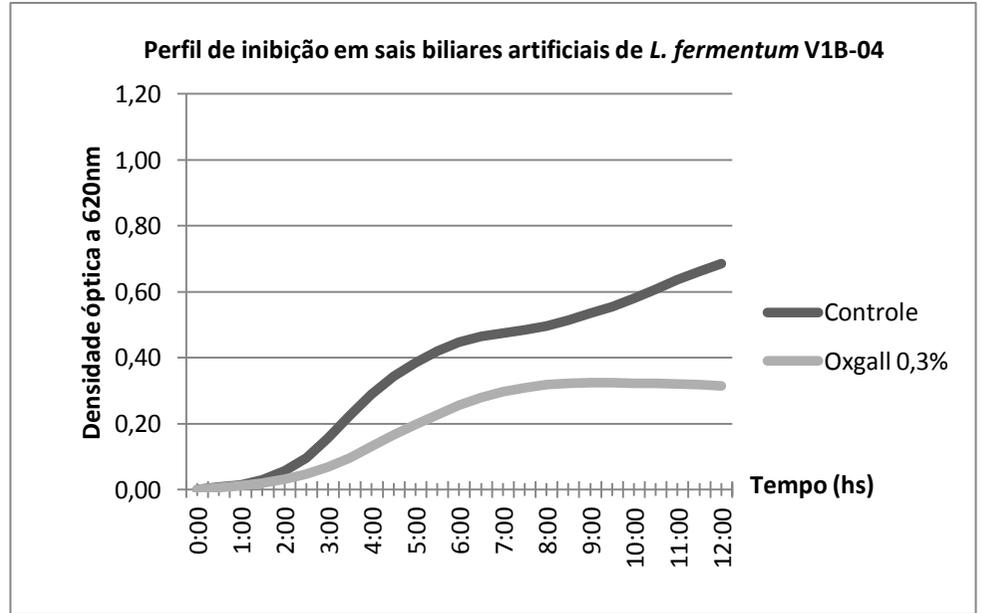
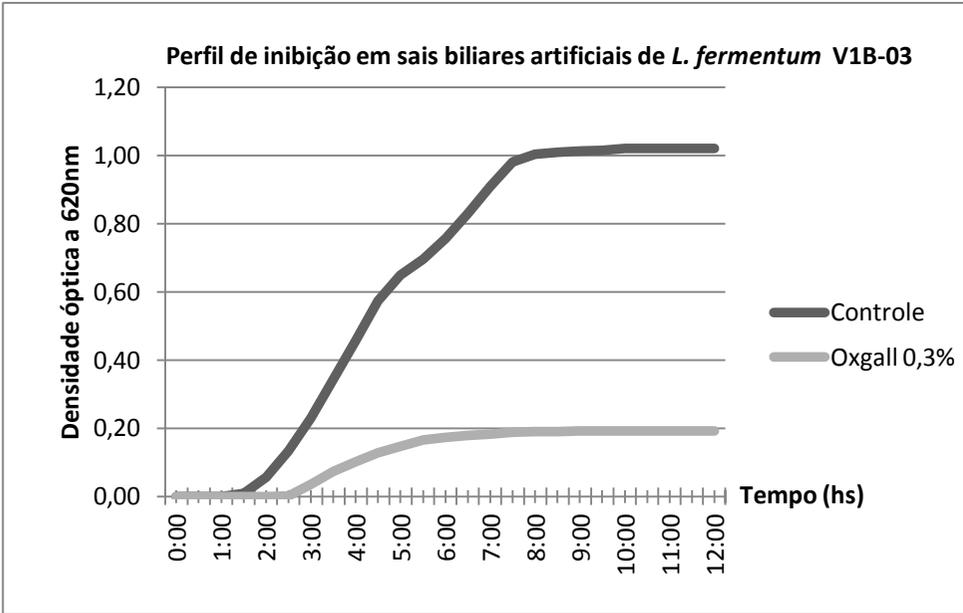
Perfil de inibição em suco gástrico artificial de *L. reuteri* B3F-C



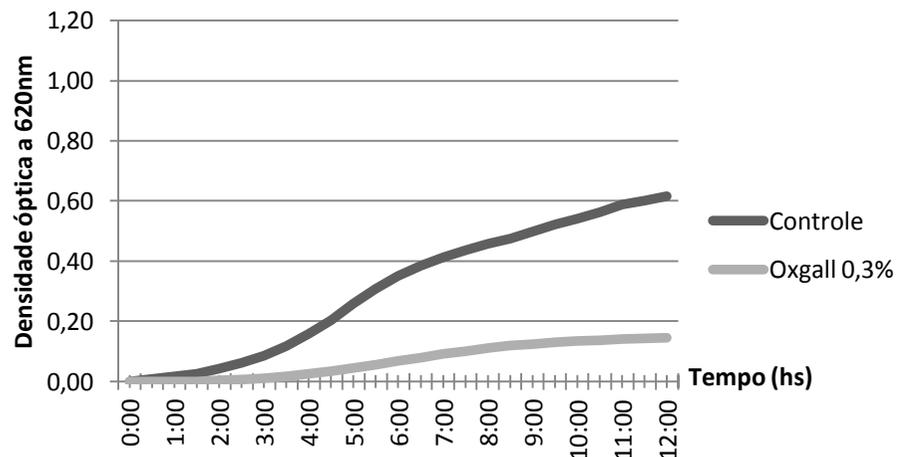
7.3- Apêndice C: Curvas de crescimento obtidas para os isolados de BAL's expostas aos sais biliares artificiais.

A linha preta e cinza equivale, respectivamente, ao crescimento bacteriano sem e com o desafio (sais biliares artificiais). A porcentagem de inibição é demonstrada nos Quadros 3 e 4.

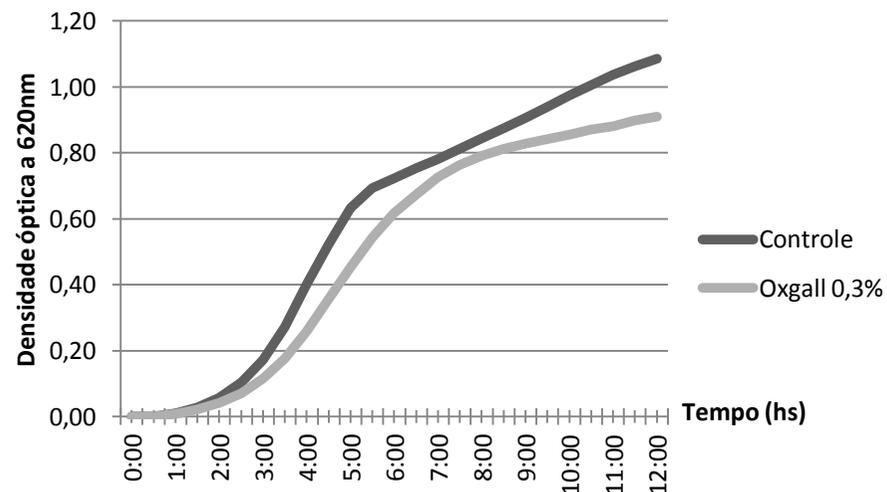




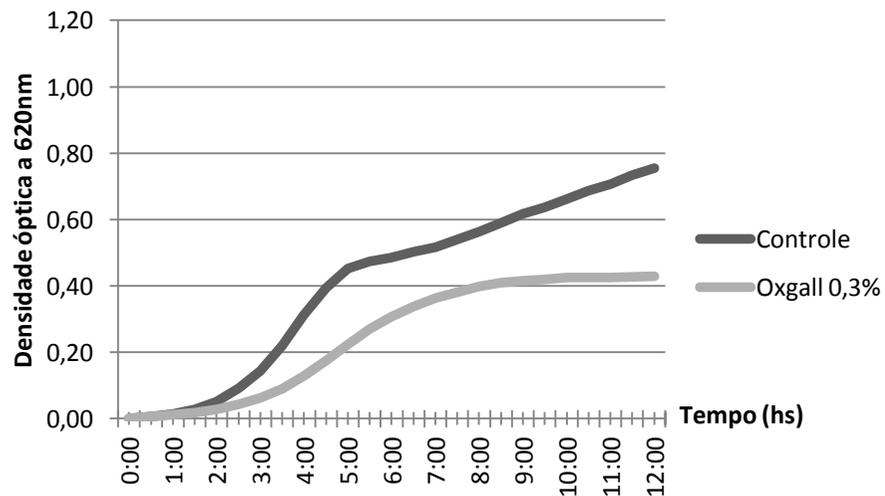
Perfil de inibição em sais biliares artificiais de *W. paramesenteroides* V3B-07



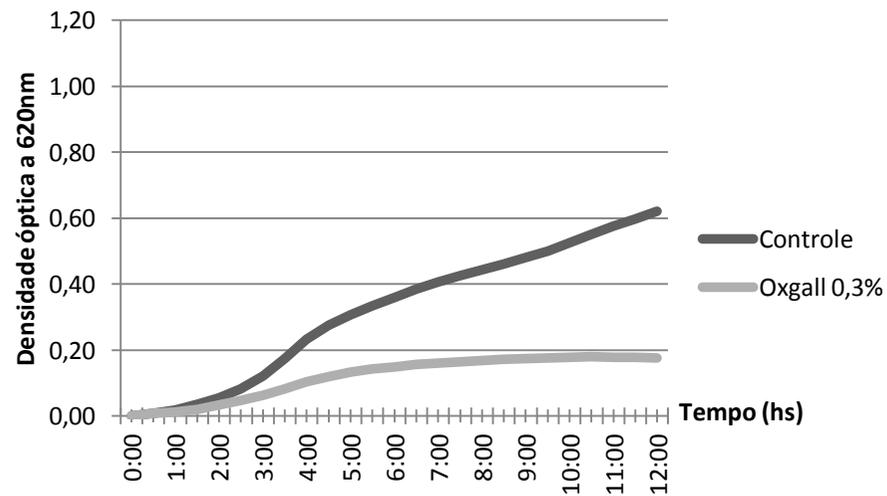
Perfil de inibição em sais biliares artificiais de *L. fermentum* V3B-08



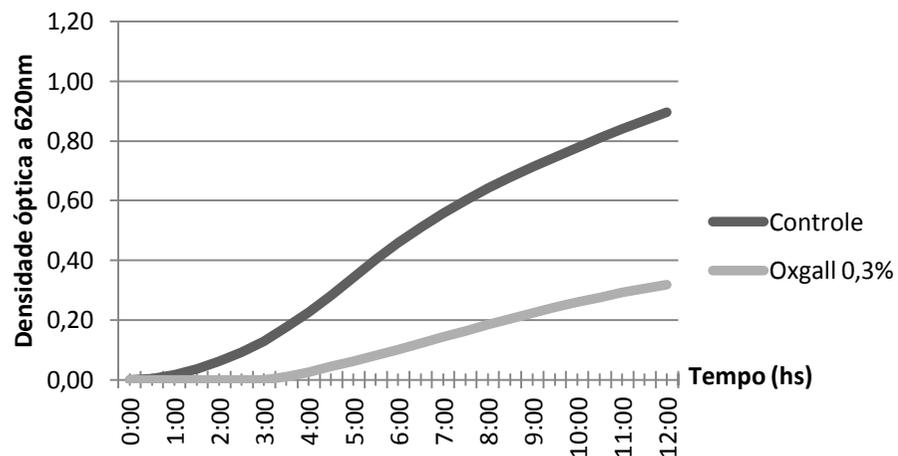
Perfil de inibição em sais biliares artificiais de *L. fermentum* V3B-09



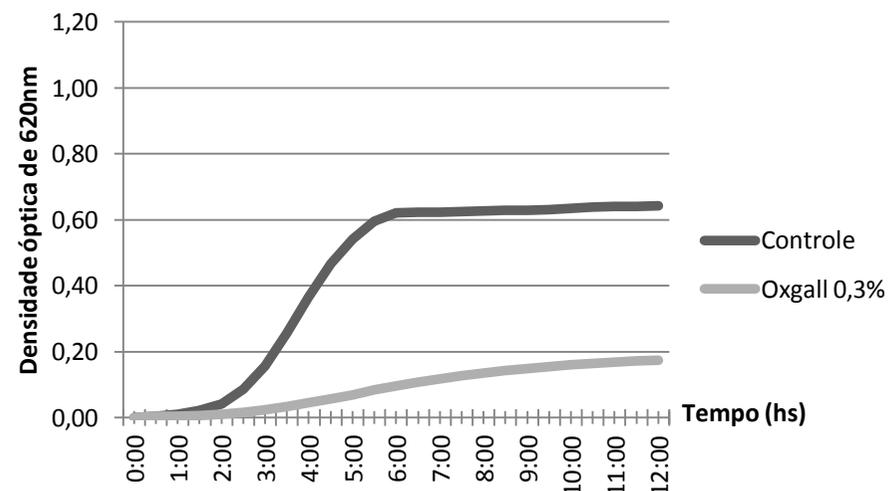
Perfil de inibição em sais biliares artificiais de *L. fermentum* V3B-10



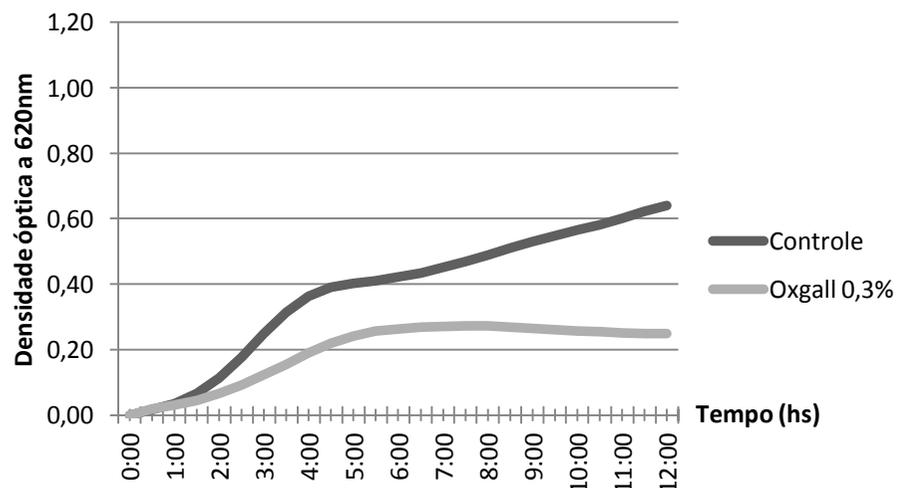
Perfil de inibição em sais biliares artificiais de *W. paramesenteroides* V3B-11



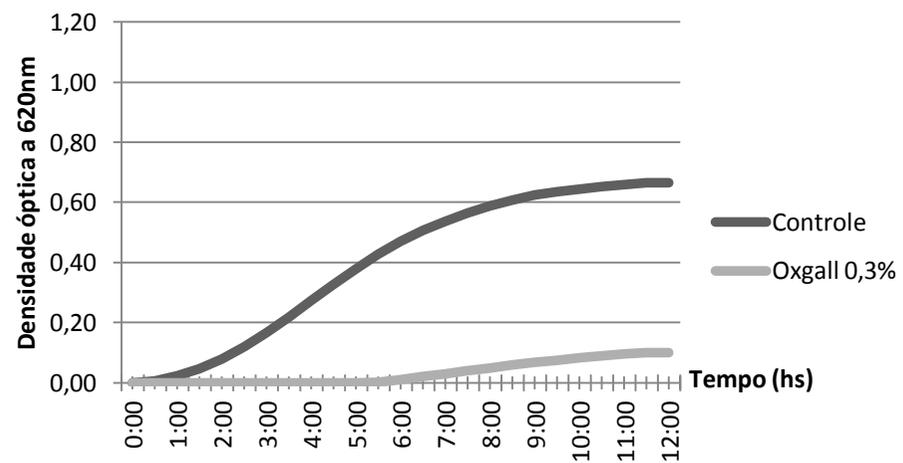
Perfil de inibição em sais biliares artificiais de *W. cibaria* V3B-12



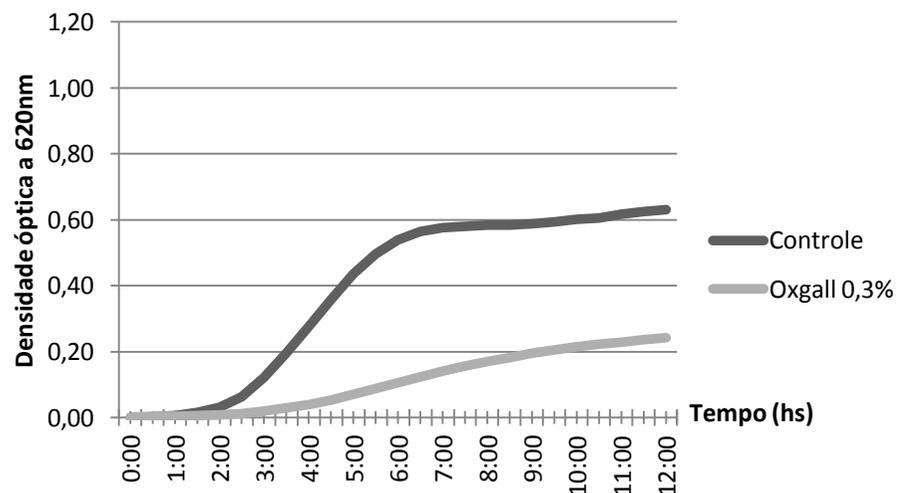
Perfil de inibição em sais biliares artificiais de *L. fermentum* V1L-13



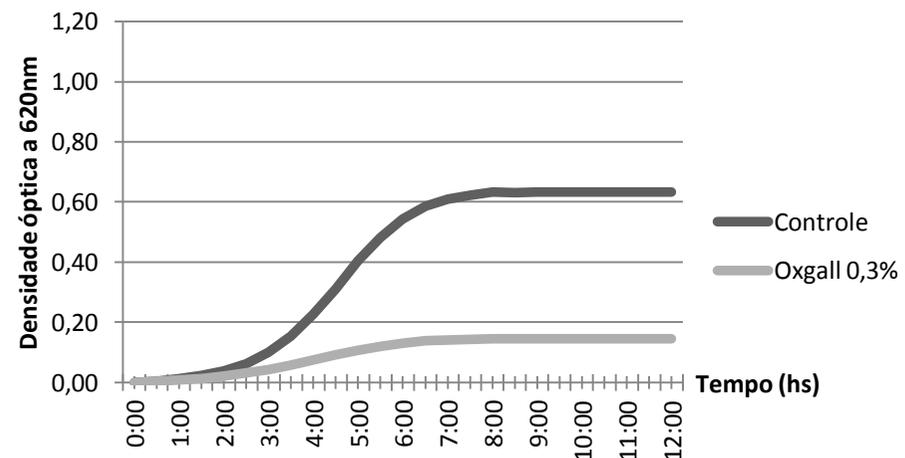
Perfil de inibição em sais biliares artificiais de *W. paramesenteroides* V1L-14



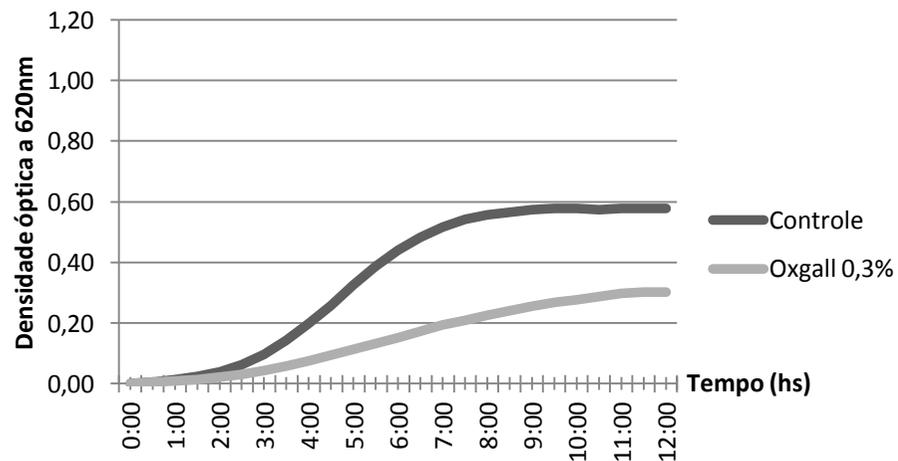
Perfil de inibição em sais biliares artificiais de *W. cibaria* VL1-15



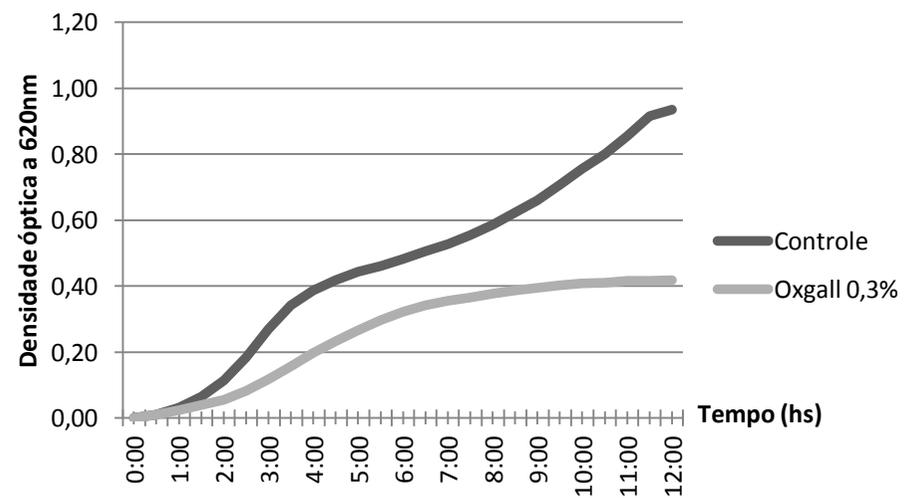
Perfil de inibição em sais biliares artificiais de *W. paramesenteroides* V1L-16



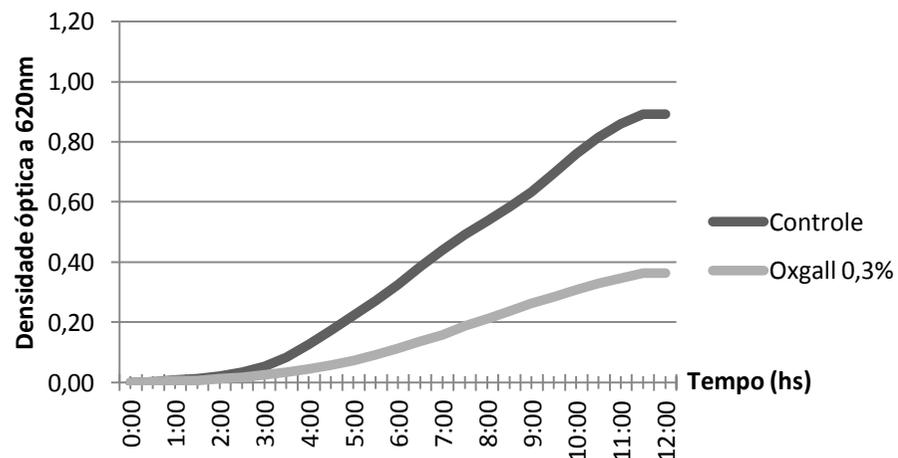
Perfil de inibição em sais biliares artificiais de *W. paramesenteroides* V1L-17



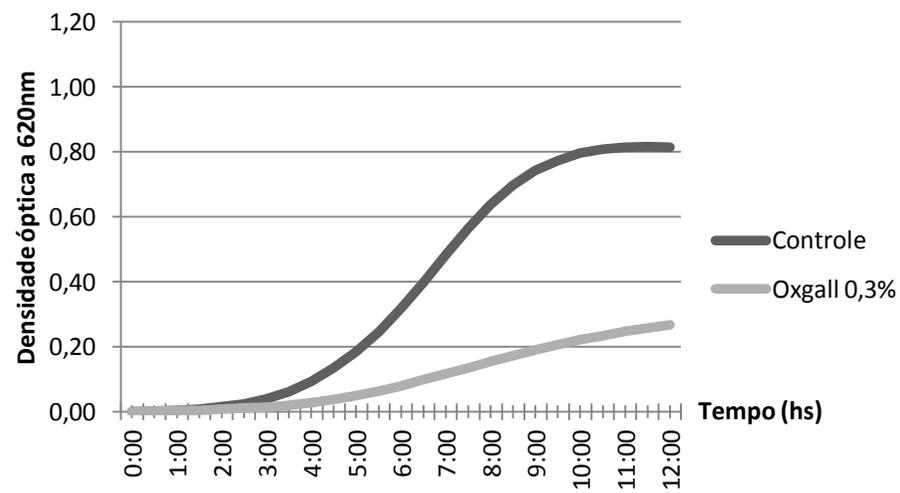
Perfil de inibição em sais biliares artificiais de *L. fermentum* V2L-18



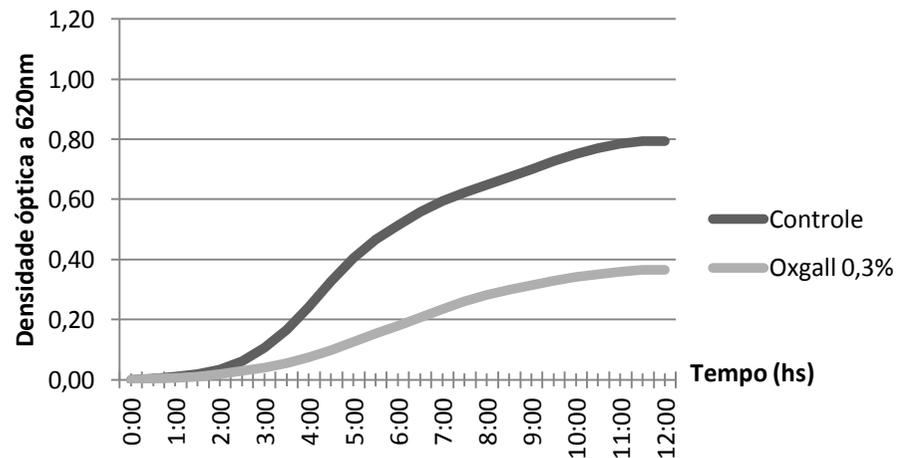
Perfil de inibição em sais biliares artificiais de *W. paramesenteroides* V2L-19



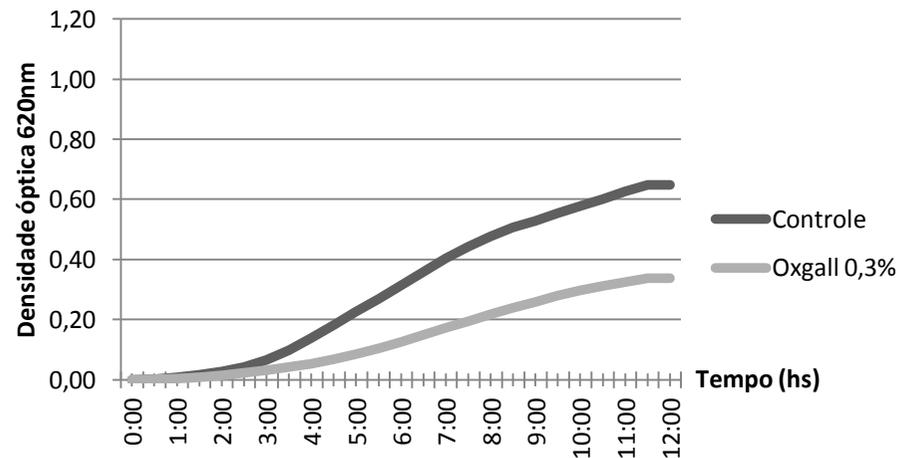
Perfil de inibição em sais biliares artificiais de *L. fermentum* V2L-20



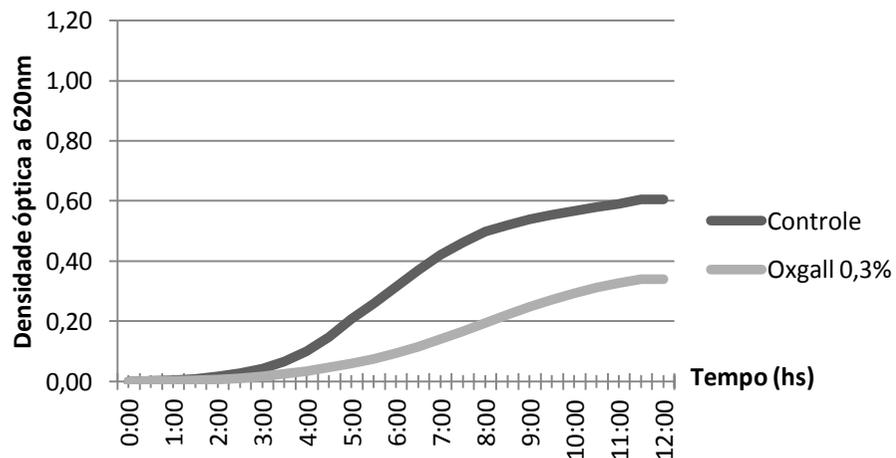
Perfil de inibição em sais biliares artificiais de *W. paramesenteroides* V2L-21



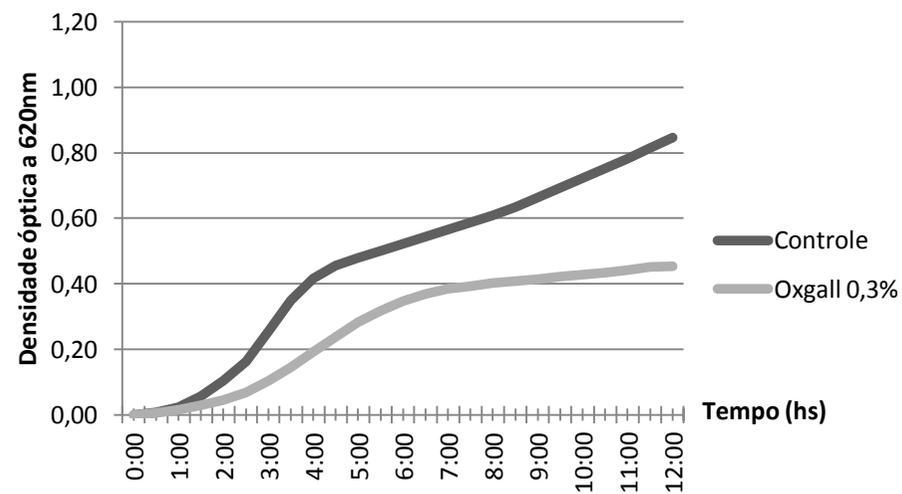
Perfil de inibição em sais biliares artificiais de *W. paramesenteroides* V2L-22



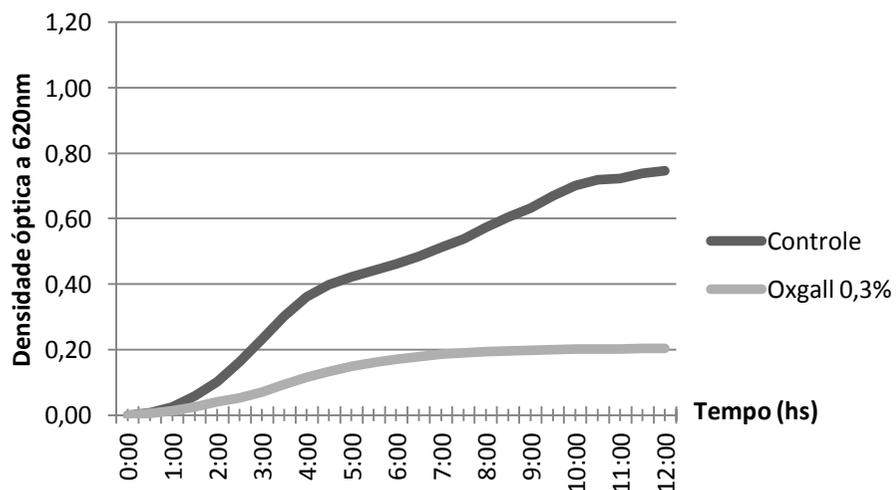
Perfil de inibição em sais biliares artificiais de *W. paramesenteroides* V3L-23



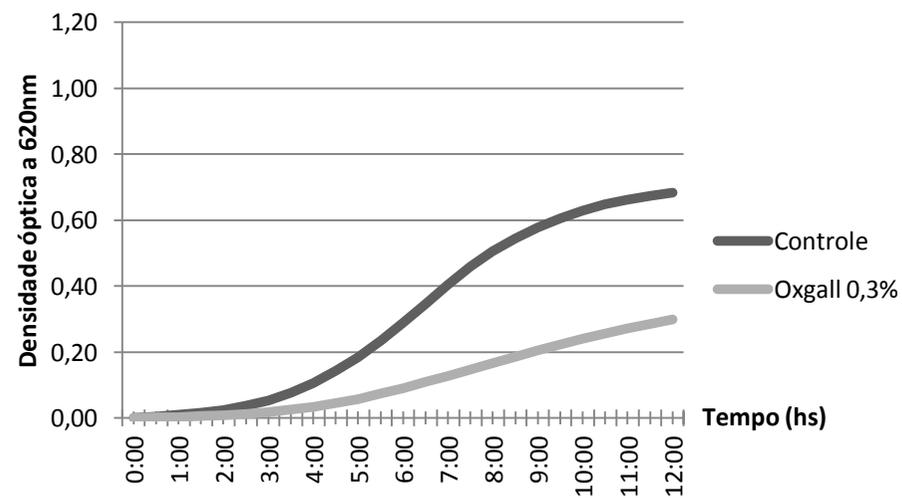
Perfil de inibição em sais biliares artificiais de *L. fermentum* V3L-24



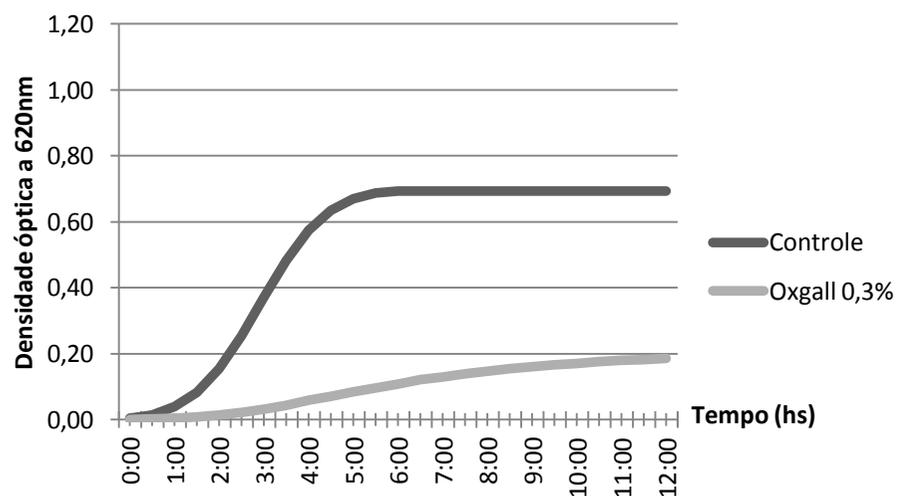
Perfil de inibição em sais biliares artificiais de *L. fermentum* V3L-25



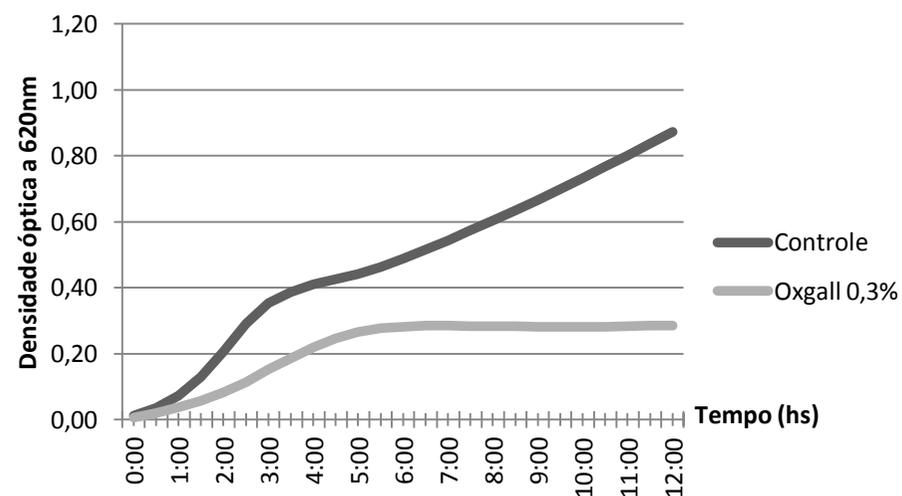
Perfil de inibição em sais biliares artificiais de *L. fermentum* V3L-26



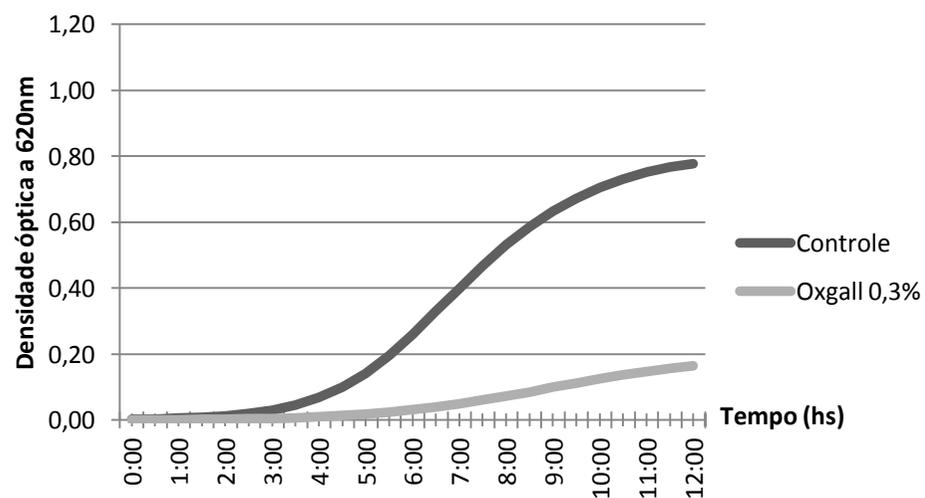
Perfil de inibição em sais biliares artificiais de *L. fermentum* V3L-27



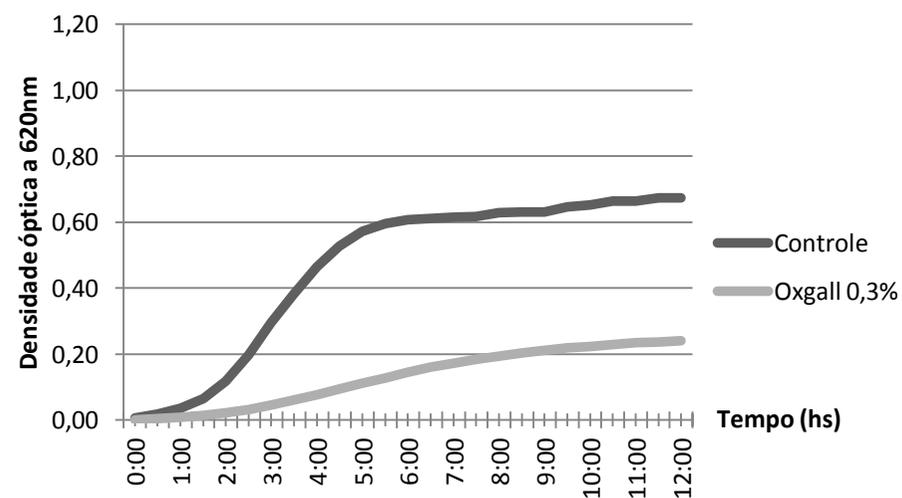
Perfil de inibição em sais biliares artificiais de *L. fermentum* V3L-28

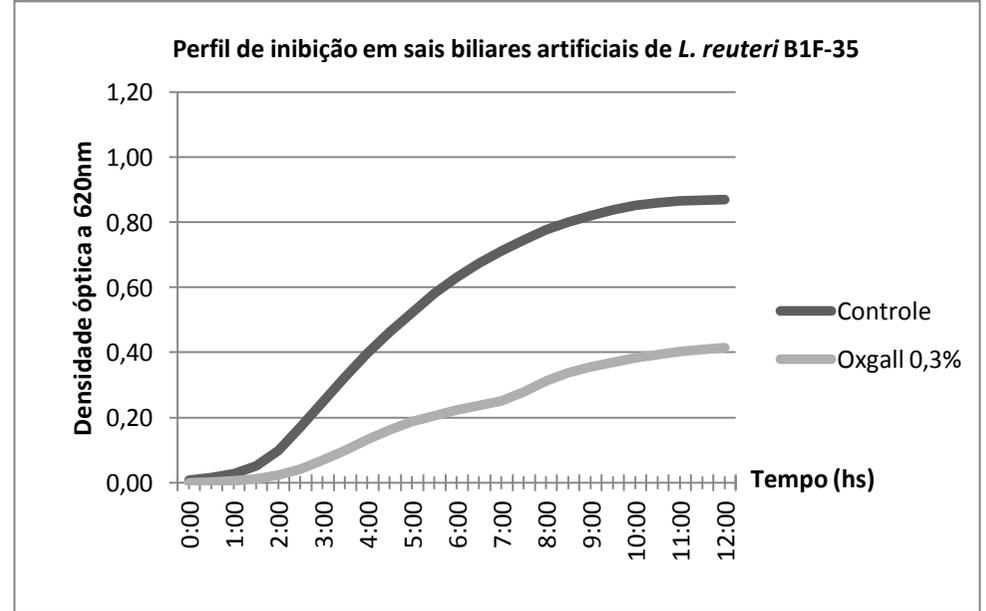
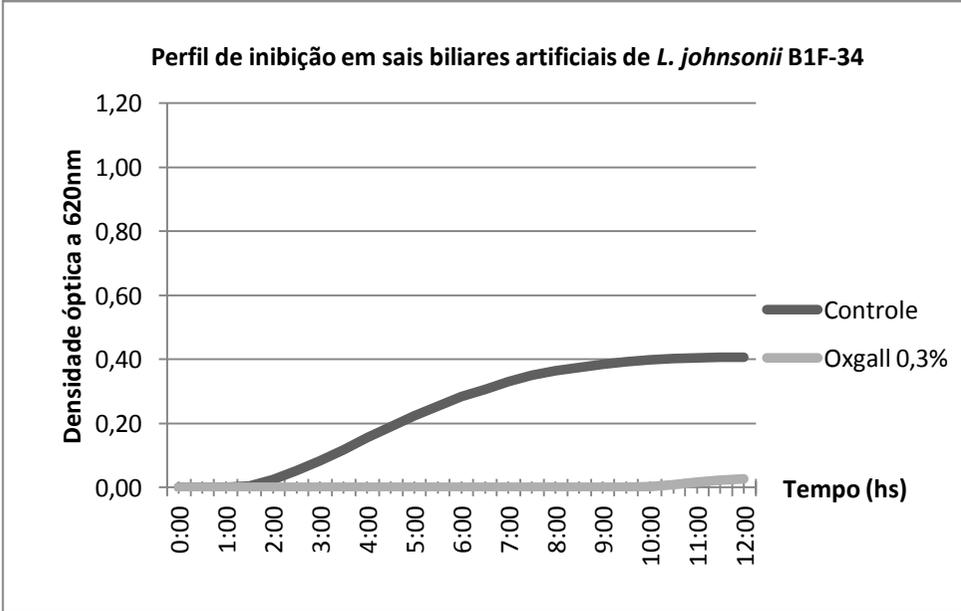
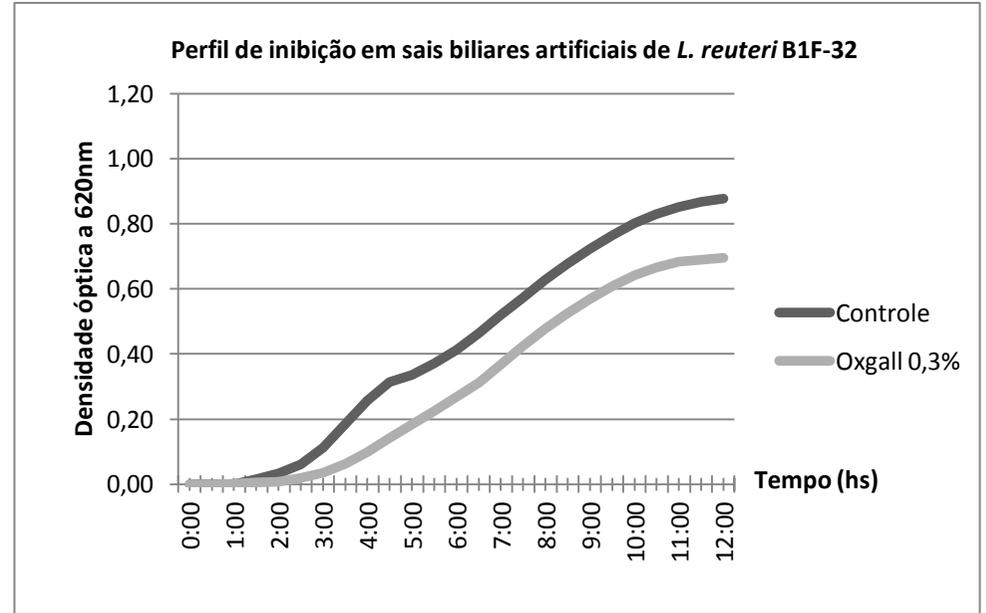
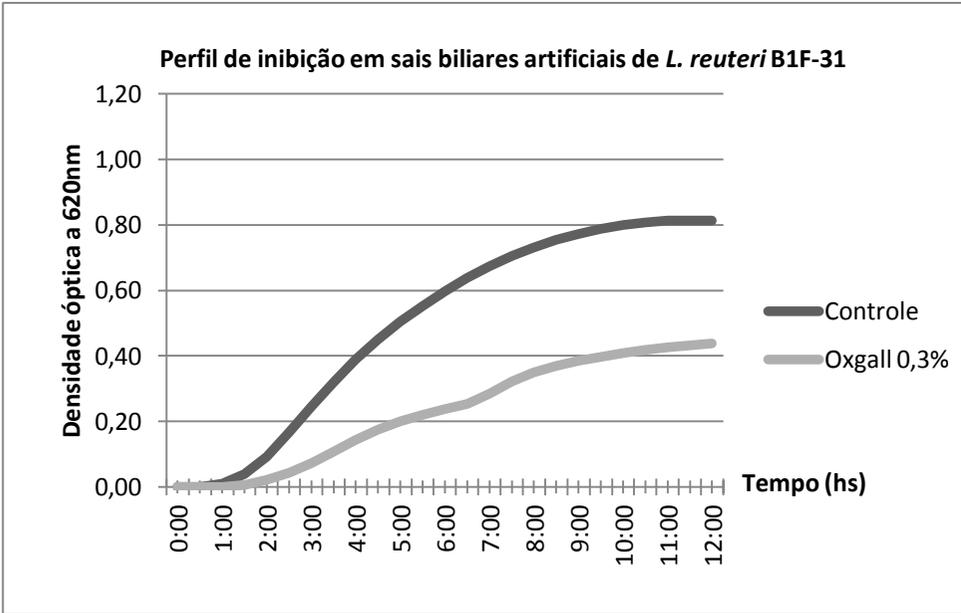


Perfil de inibição em sais biliares artificiais de *W. hellenica* V1V-29

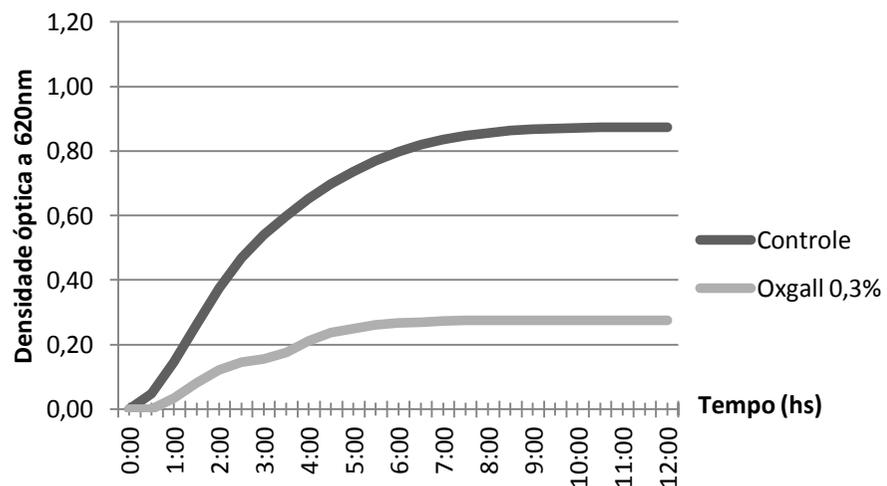


Perfil de inibição em sais biliares artificiais de *W. hellenica* V1V-30

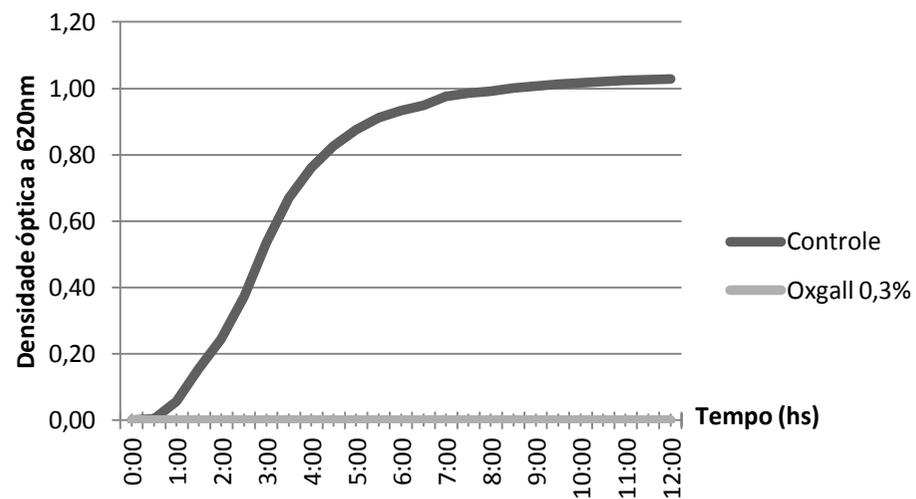




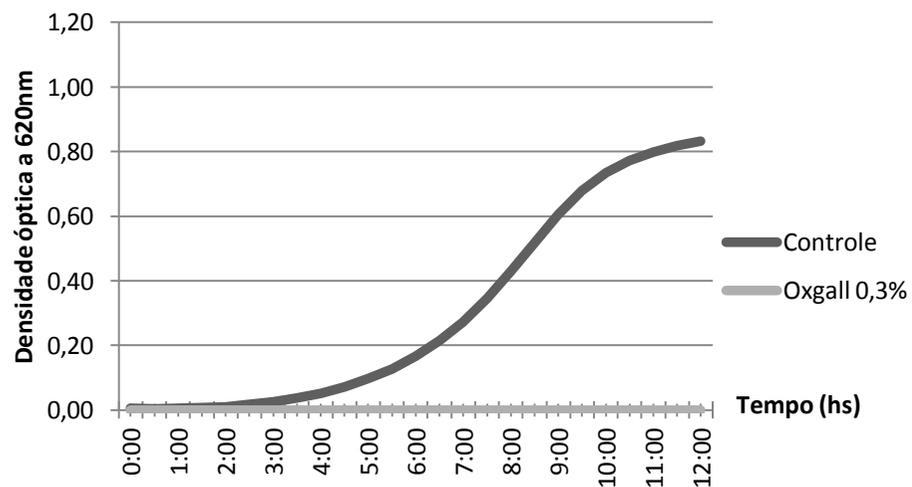
Perfil de inibição em sais biliare artificiais de *L. acidophilus* B1F-36



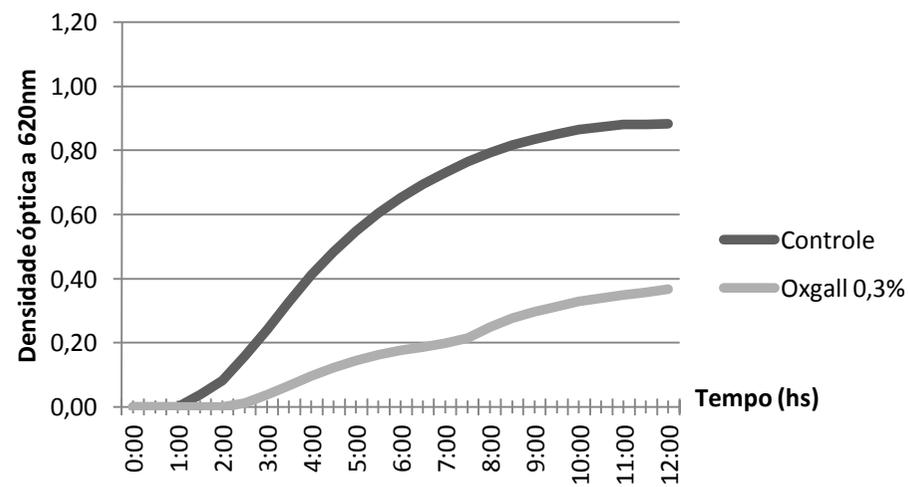
Perfil de inibição em sais biliare artificiais de *L. salivarius* B2F-38



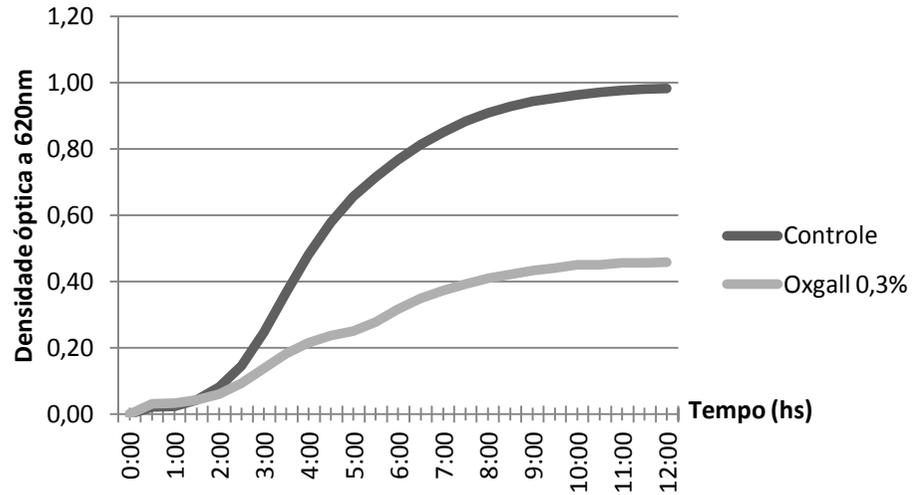
Perfil de inibição em sais biliare artificiais de *L. johnsonii* B2F-40



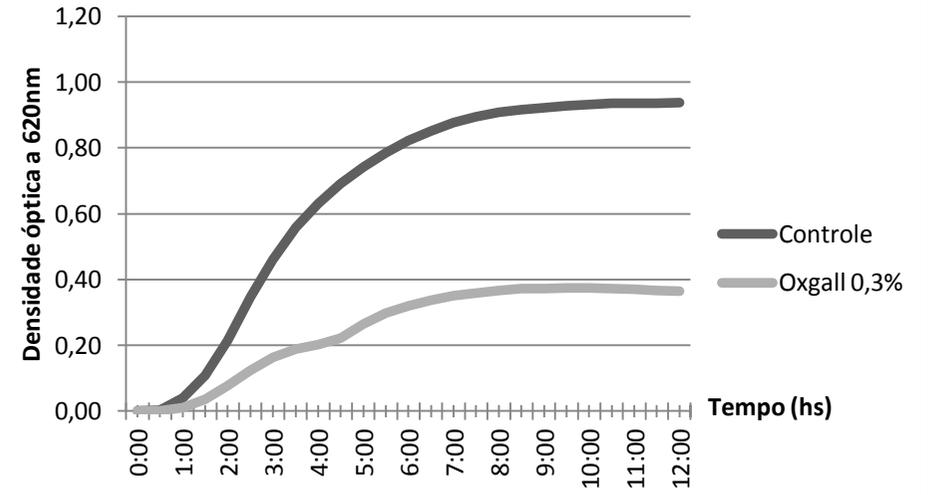
Perfil de inibição em sais biliare artificiais de *L. reuteri* B2F-41



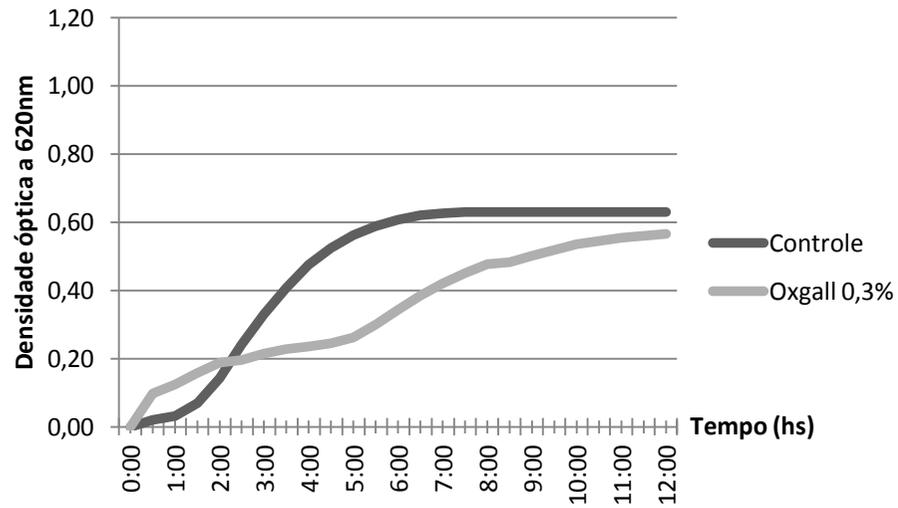
Perfil de inibição em sais biliares artificiais de *L. johnsonii* B3F-44



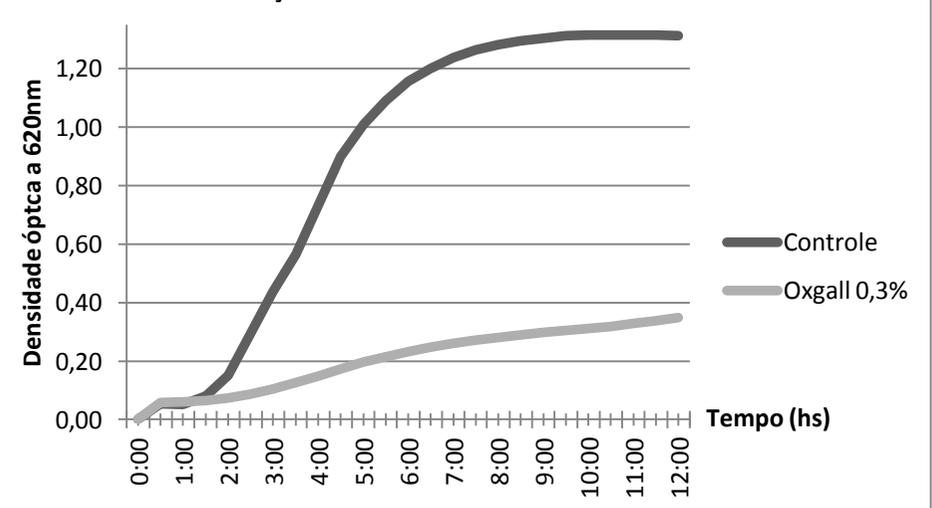
Perfil de inibição em sais biliares artificiais de *L. johnsonii* B3F-46



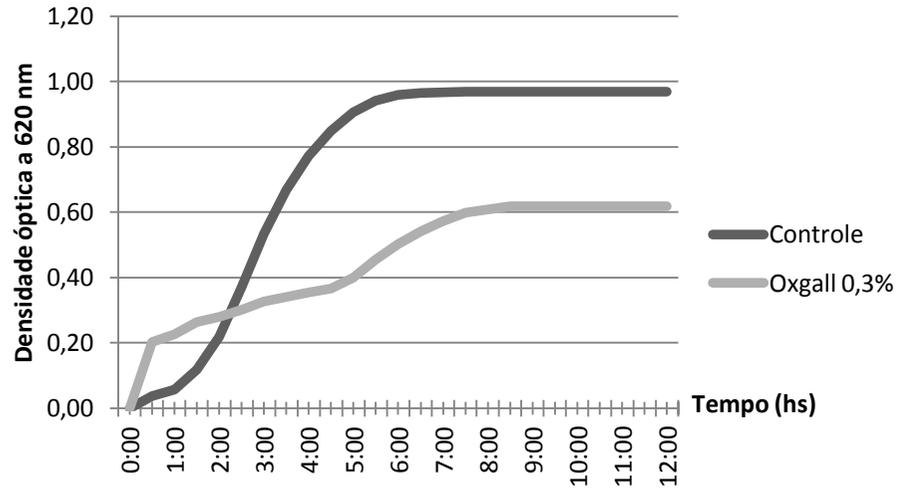
Perfil de inibição em sais biliares artificiais de *L. reuteri* B4F-01



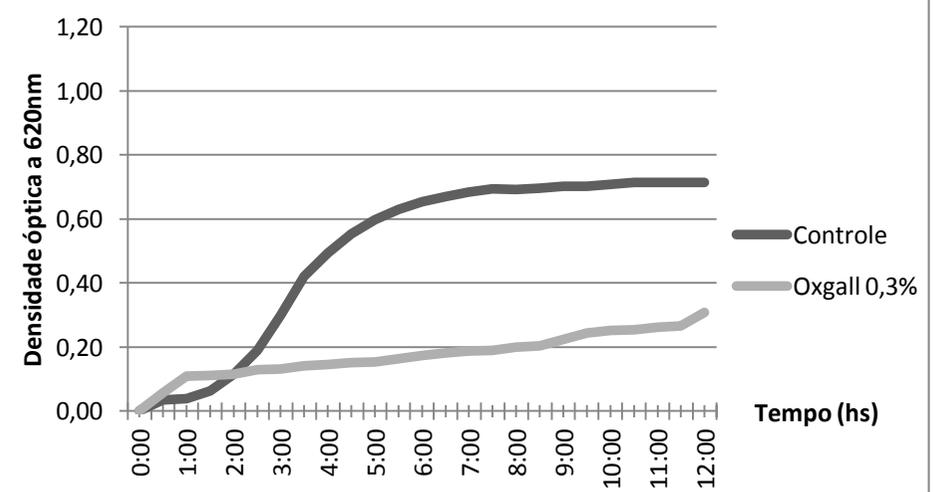
Perfil de inibição em sais biliares artificiais de *L. casei* B4F-02



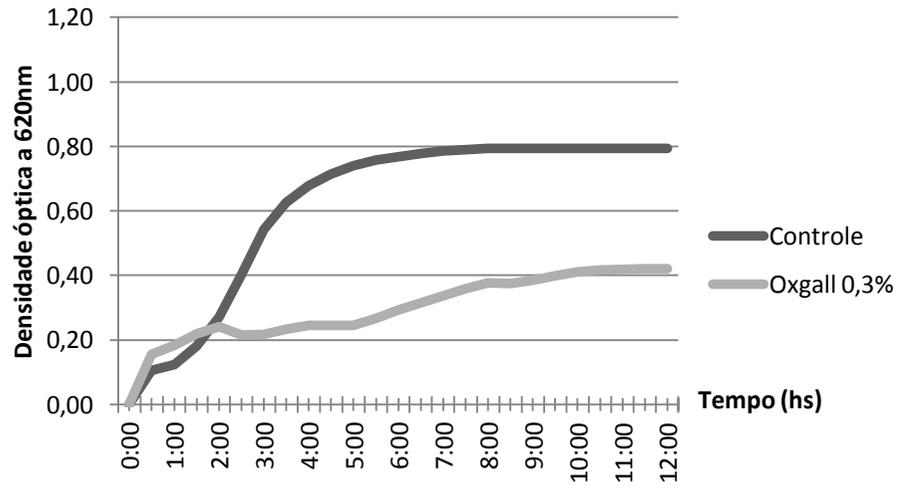
Perfil de inibição em sais biliares artificiais de *L. reuteri* B4F-03



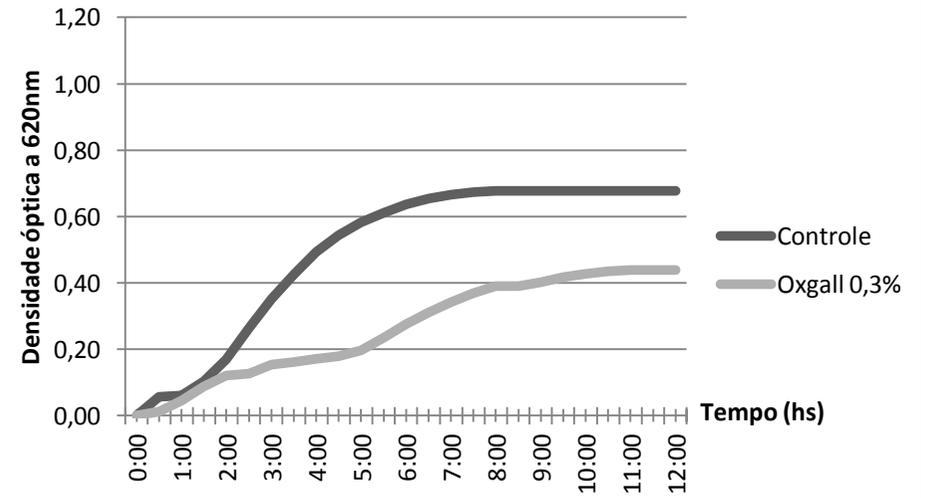
Perfil de inibição em sais biliares artificiais de *L. alimentarius* B4F-04

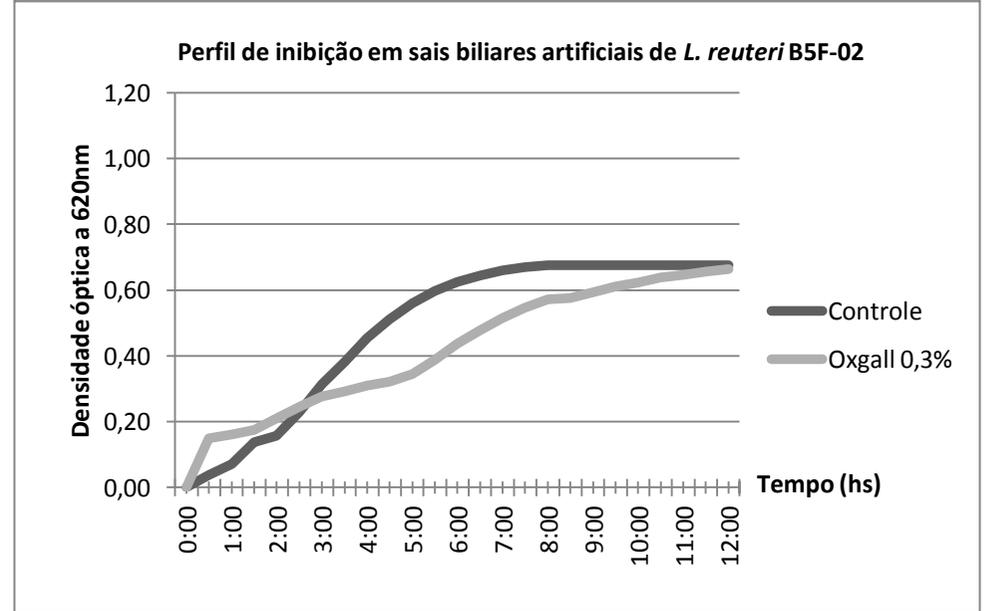
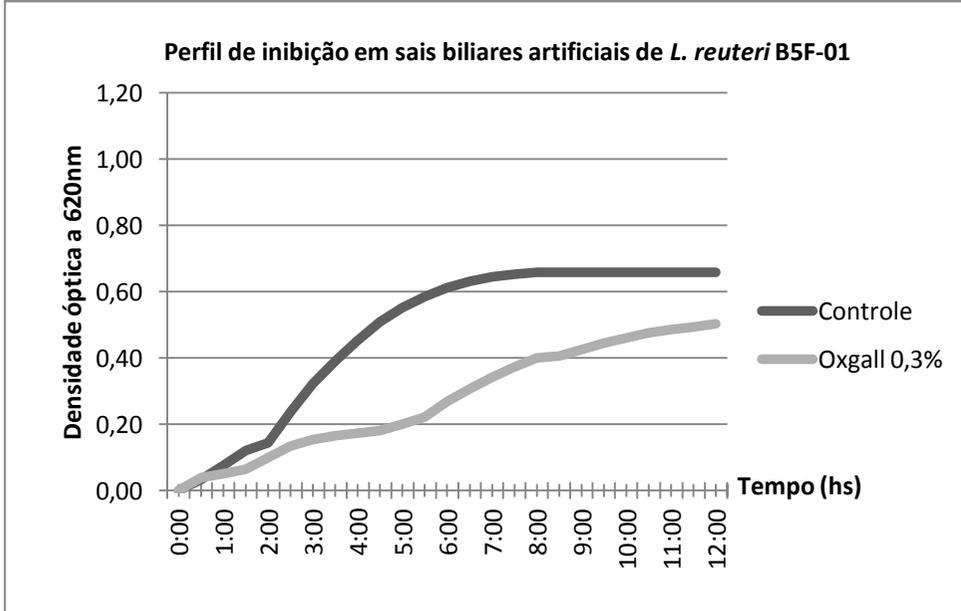
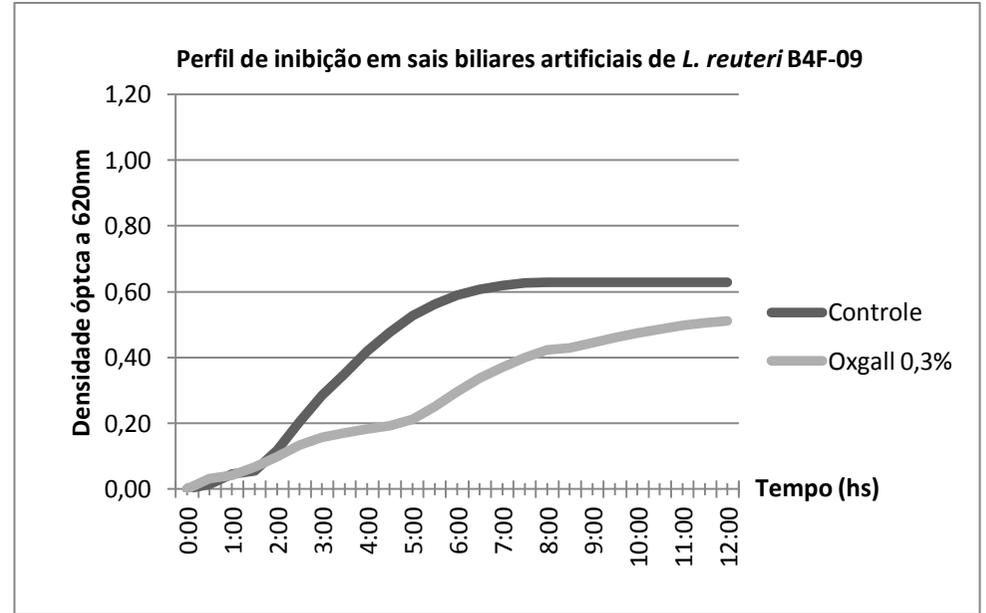
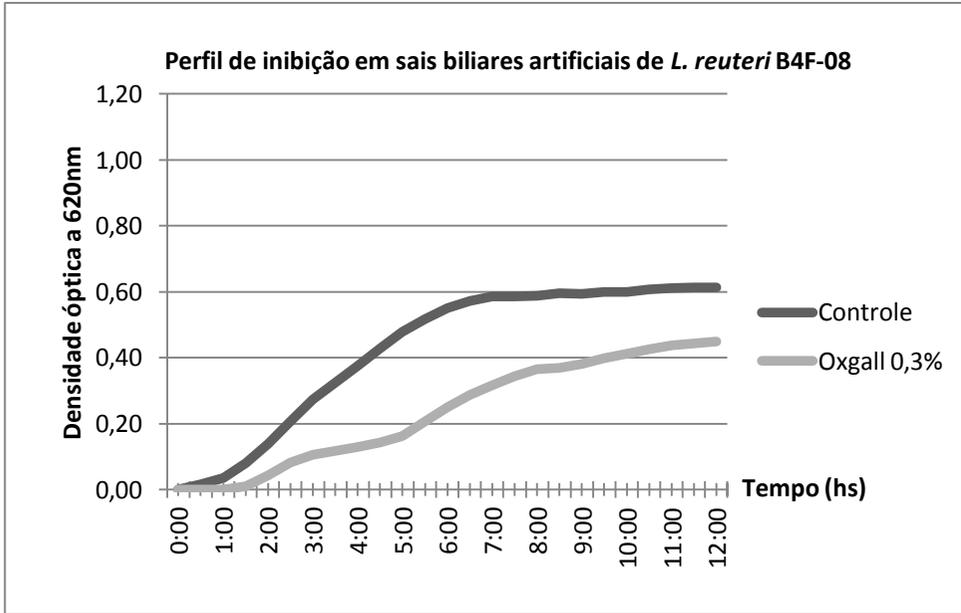


Perfil de inibição em sais biliares artificiais de *L. farciminis* B4F-06

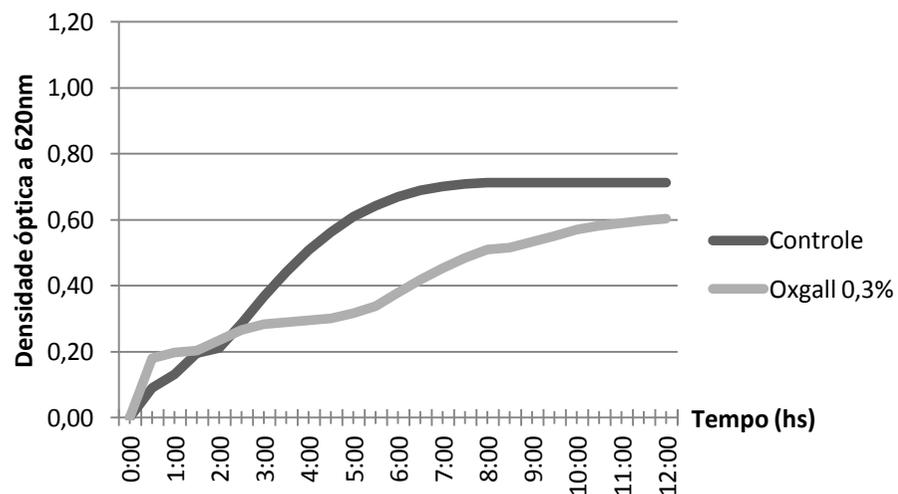


Perfil de inibição em sais biliares artificiais de *L. reuteri* B4F-07

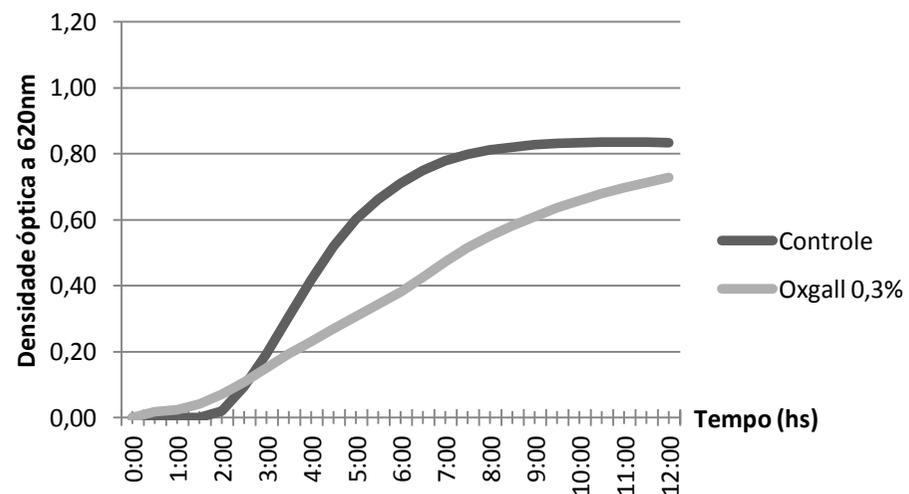




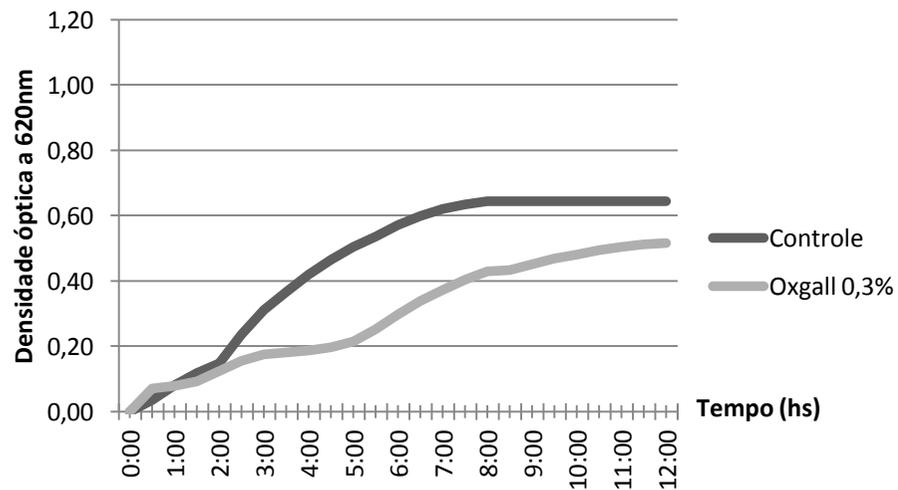
Perfil de inibição em sais biliares artificiais de *L. reuteri* B5F-03



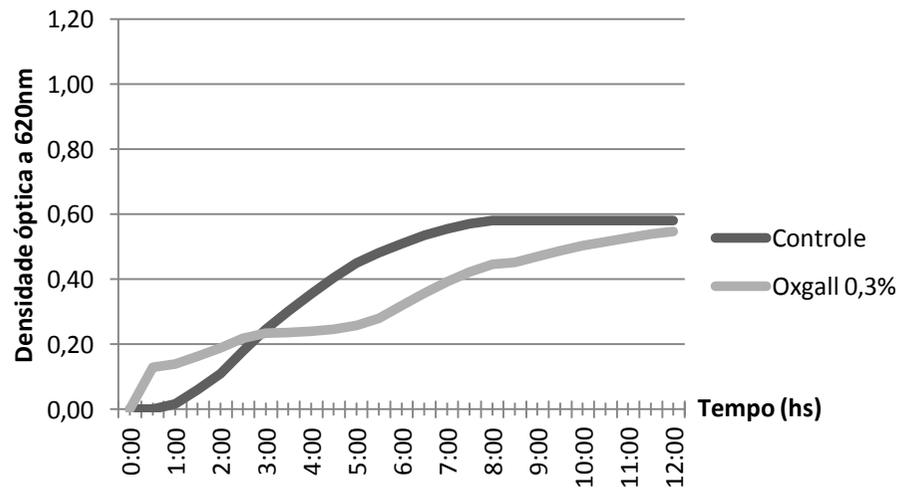
Perfil de inibição em sais biliares artificiais de *L. reuteri* B5F-04

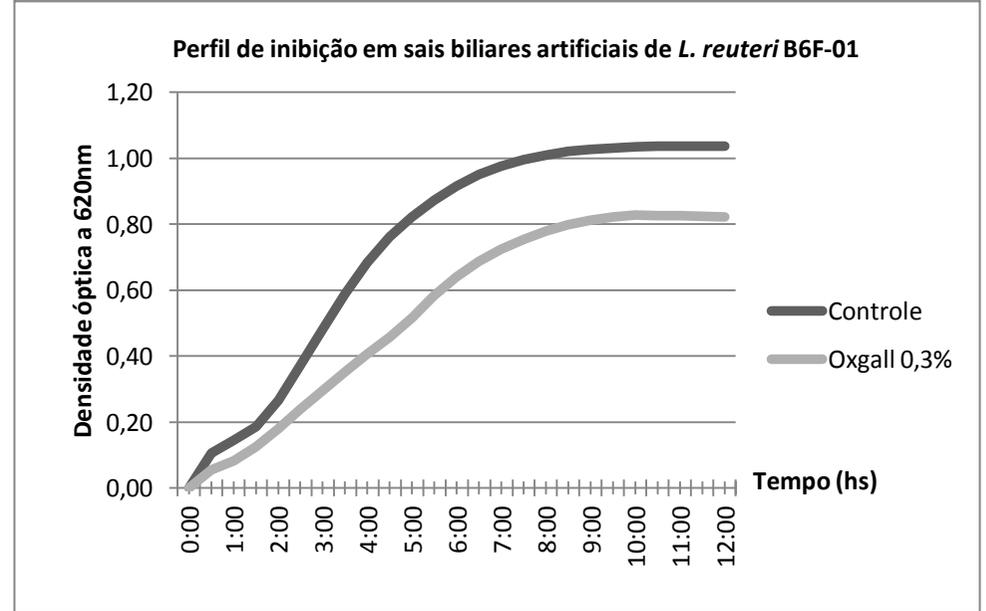
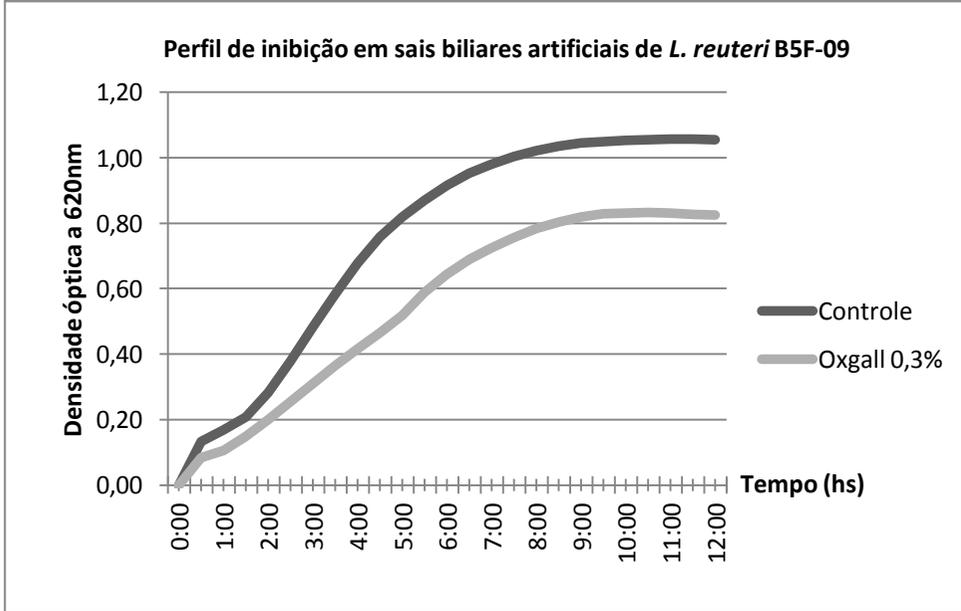
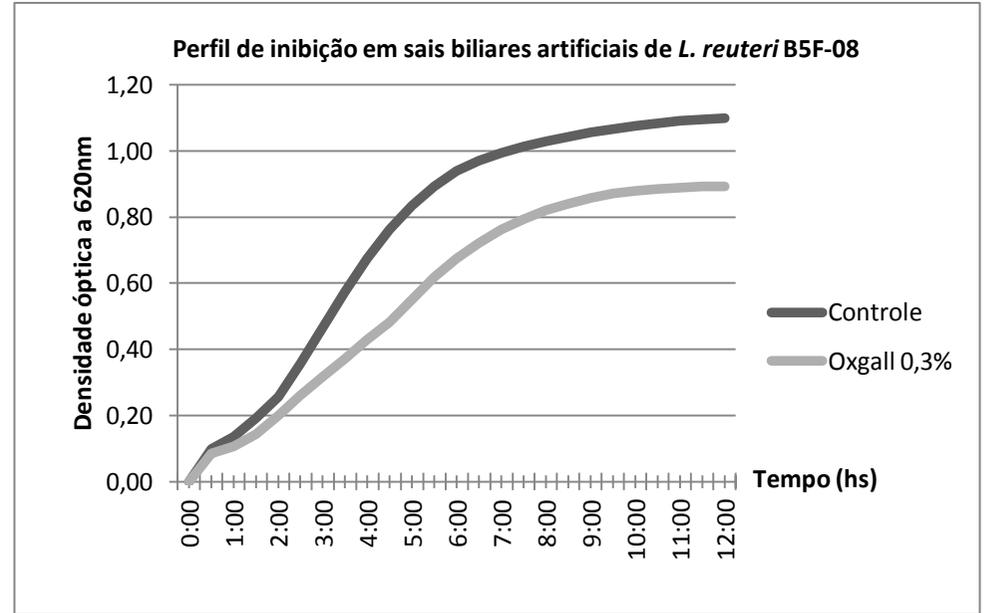
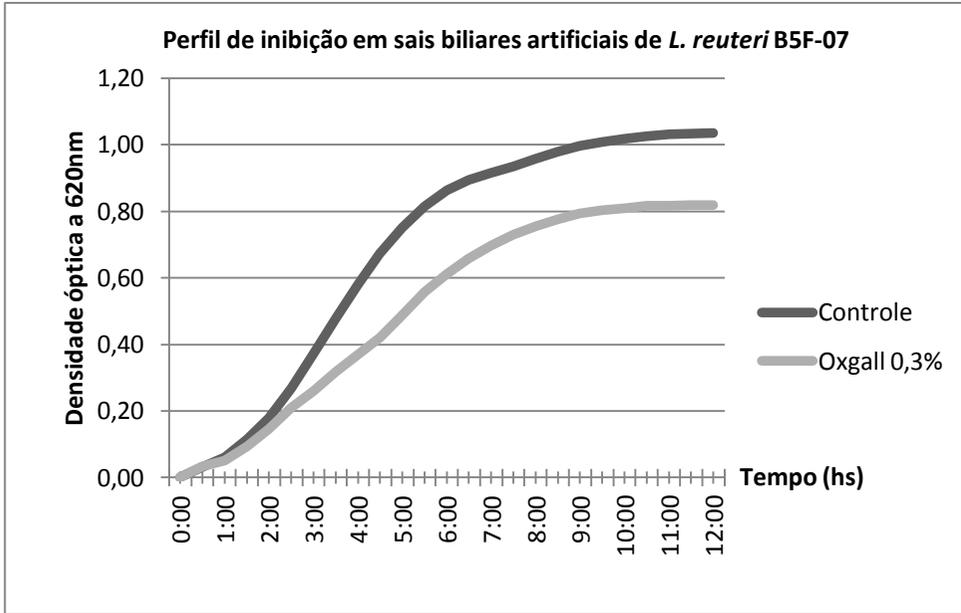


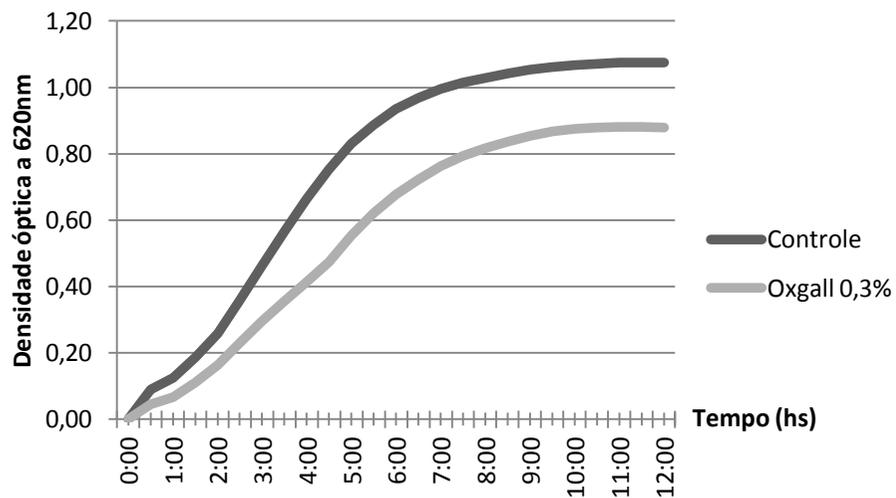
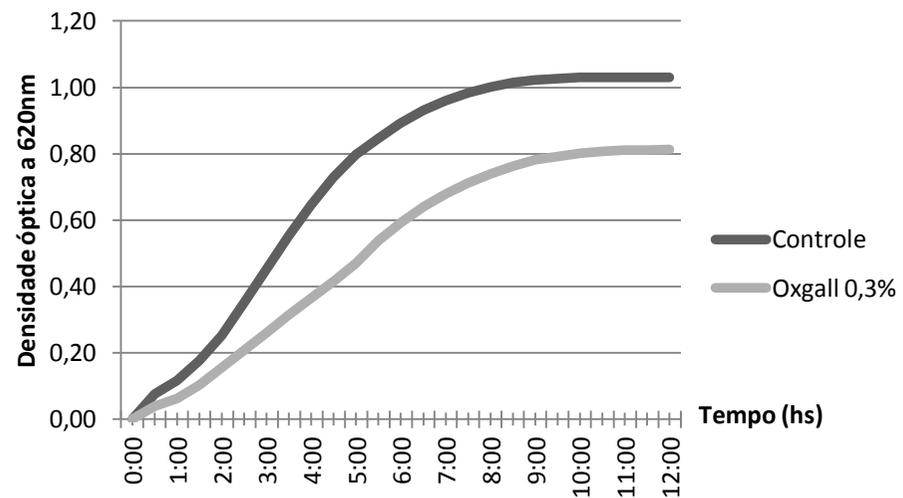
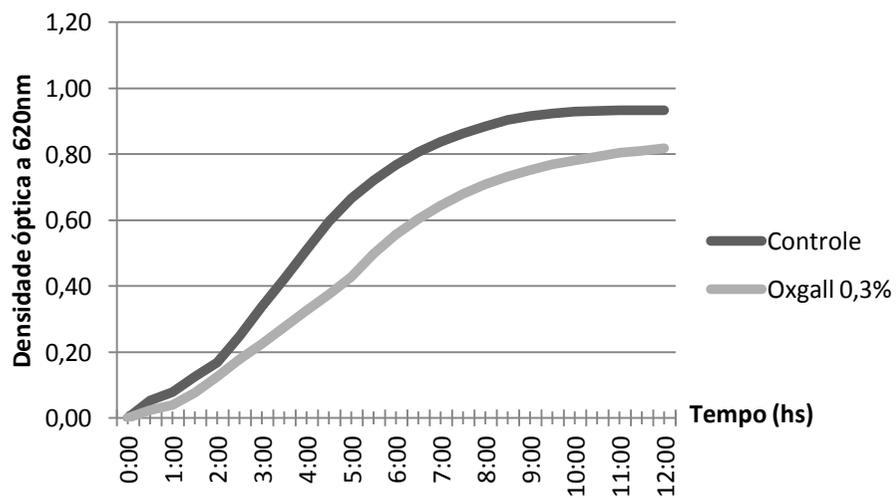
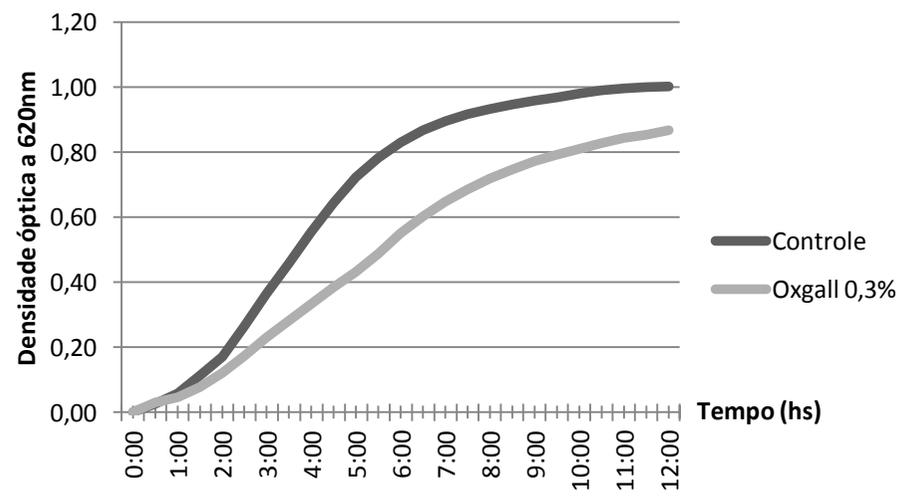
Perfil de inibição em sais biliares artificiais de *L. reuteri* B5F-05



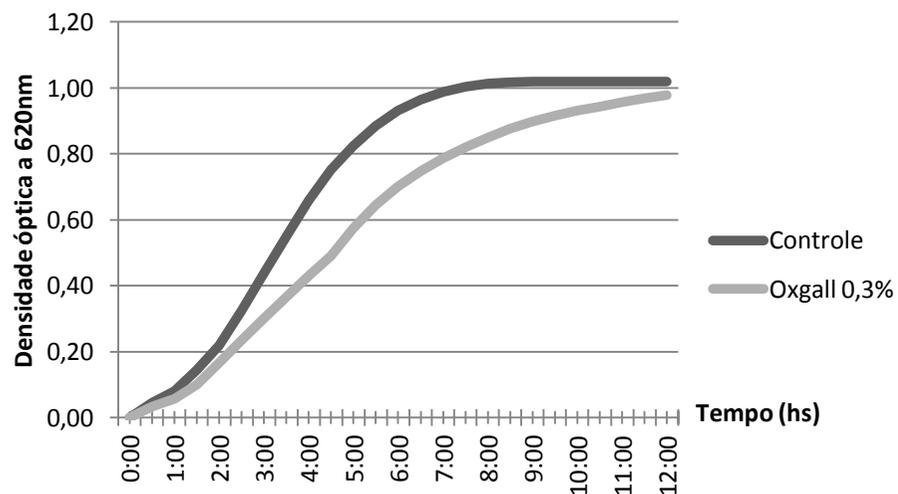
Perfil de inibição em sais biliares artificiais de *L. reuteri* B5F-06



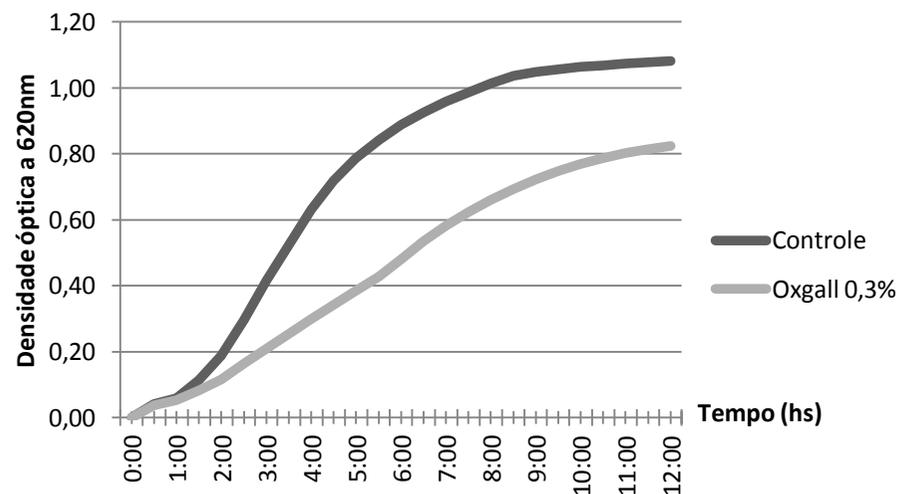


Perfil de inibição em sais biliares artificiais de *L. reuteri* B6F-02Perfil de inibição em sais biliares artificiais de *L. reuteri* B6F-03Perfil de inibição em sais biliares artificiais de *L. reuteri* B6F-04Perfil de inibição em sais biliares artificiais de *L. reuteri* B6F-05

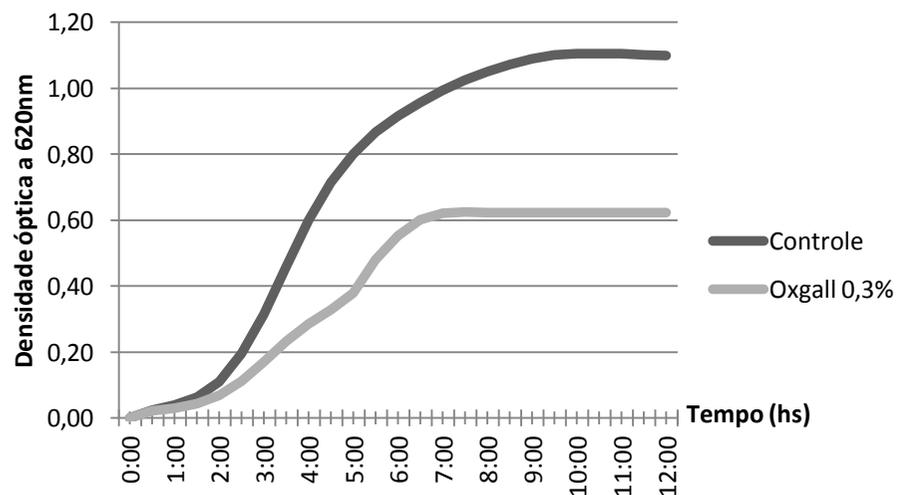
Perfil de inibição em sais biliares artificiais de *L. reuteri* B6F-06



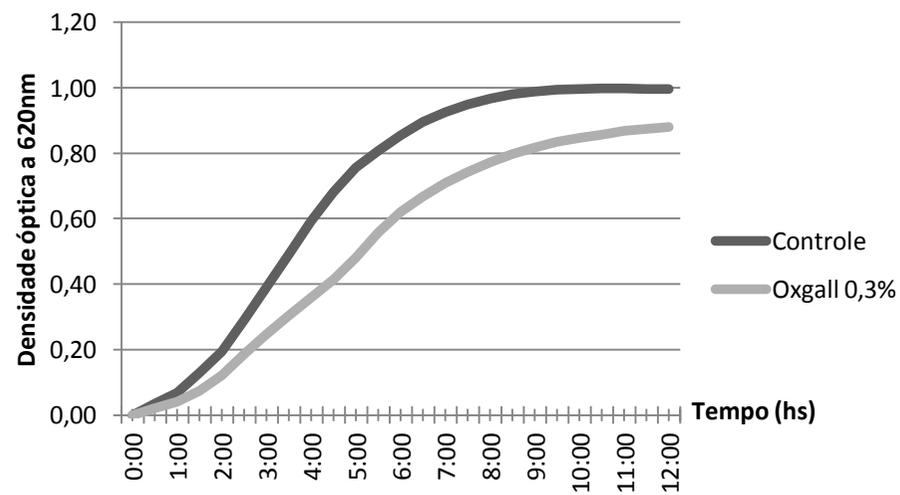
Perfil de inibição em sais biliares artificiais de *L. reuteri* B6F-07



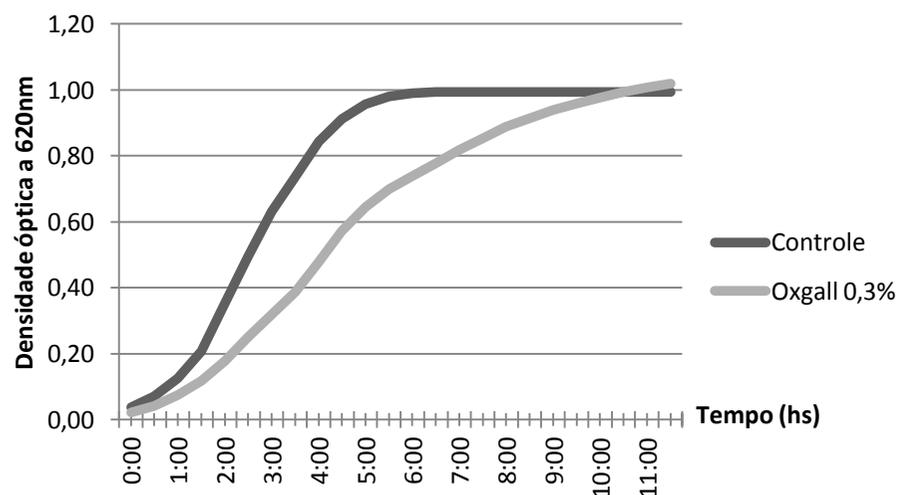
Perfil de inibição em sais biliares artificiais de *L. reuteri* B6F-08



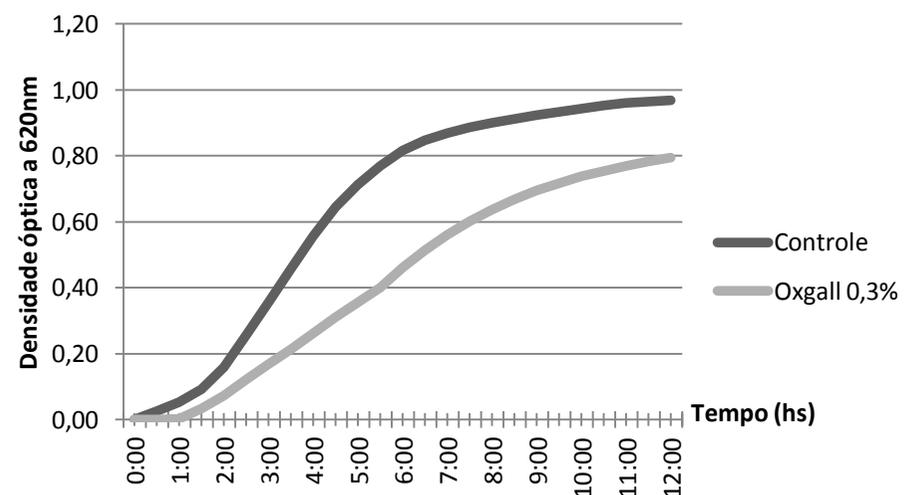
Perfil de inibição em sais biliares artificiais de *L. reuteri* B6F-10



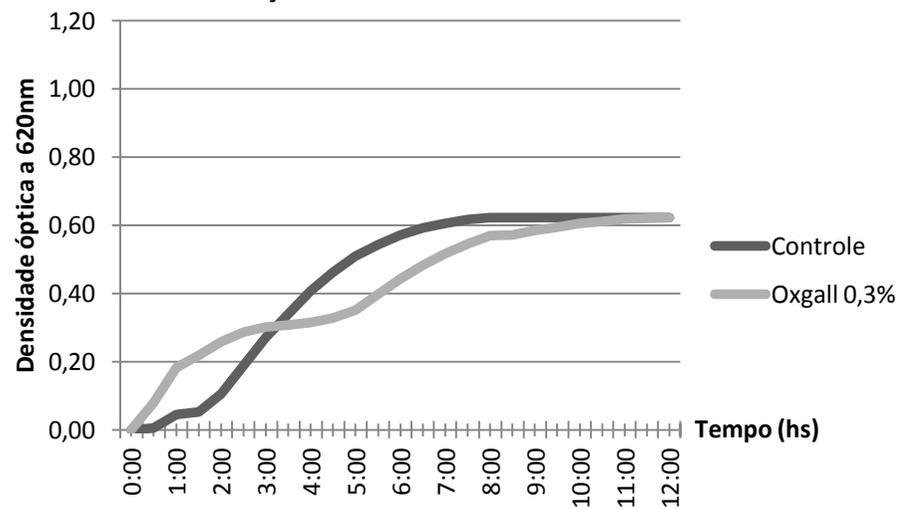
Perfil de inibição em sais biliares artificiais de *L. reuteri* B6F-11



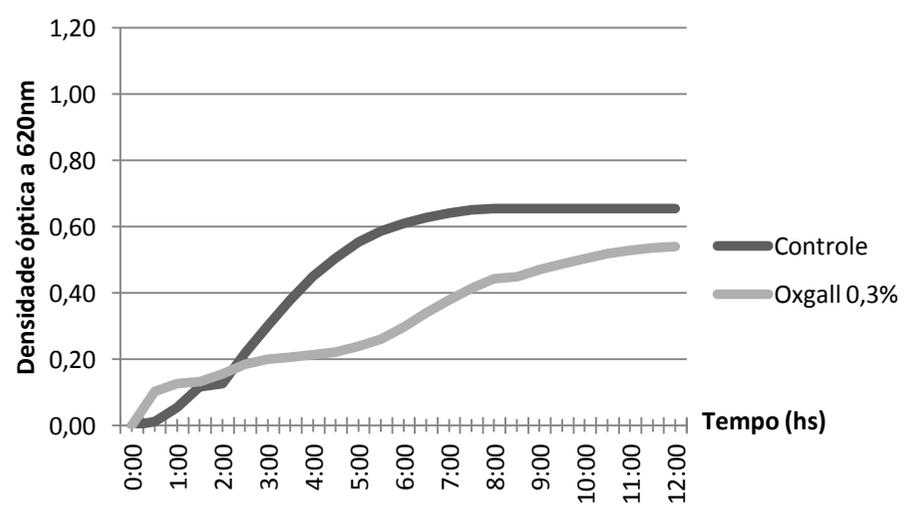
Perfil de inibição em sais biliares artificiais de *L. reuteri* B3F-A



Perfil de inibição em sais biliares artificiais de *L. reuteri* B3F-B

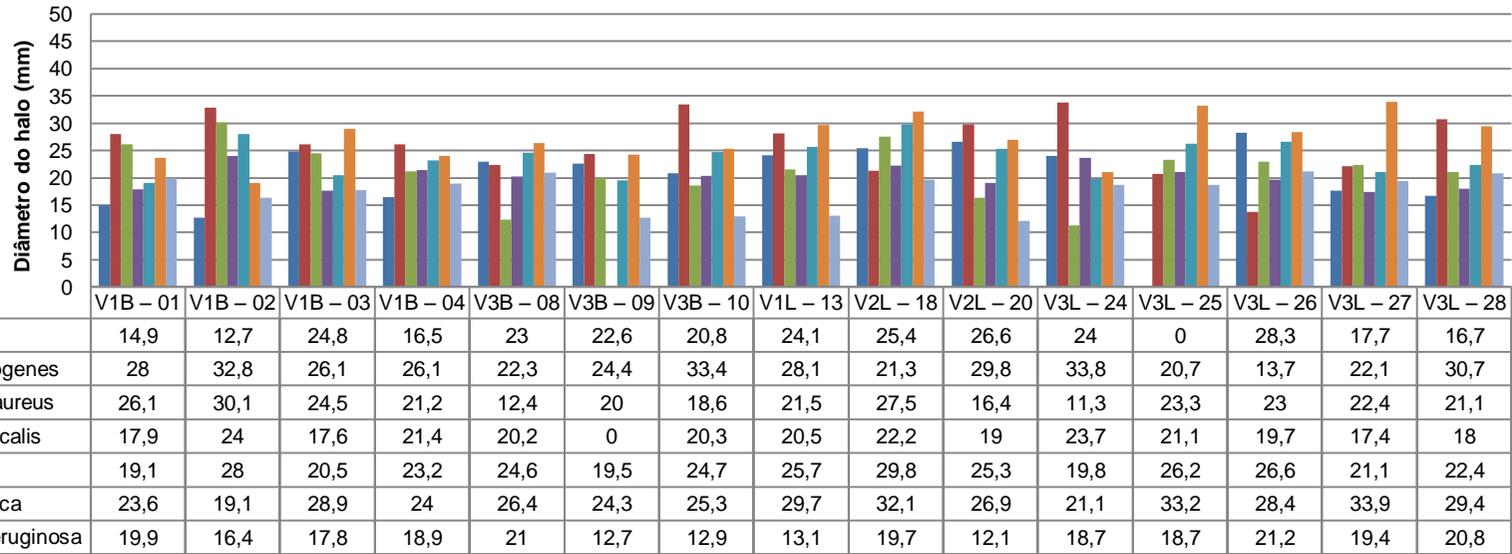


Perfil de inibição em sais biliares artificiais de *L. reuteri* B3F-C

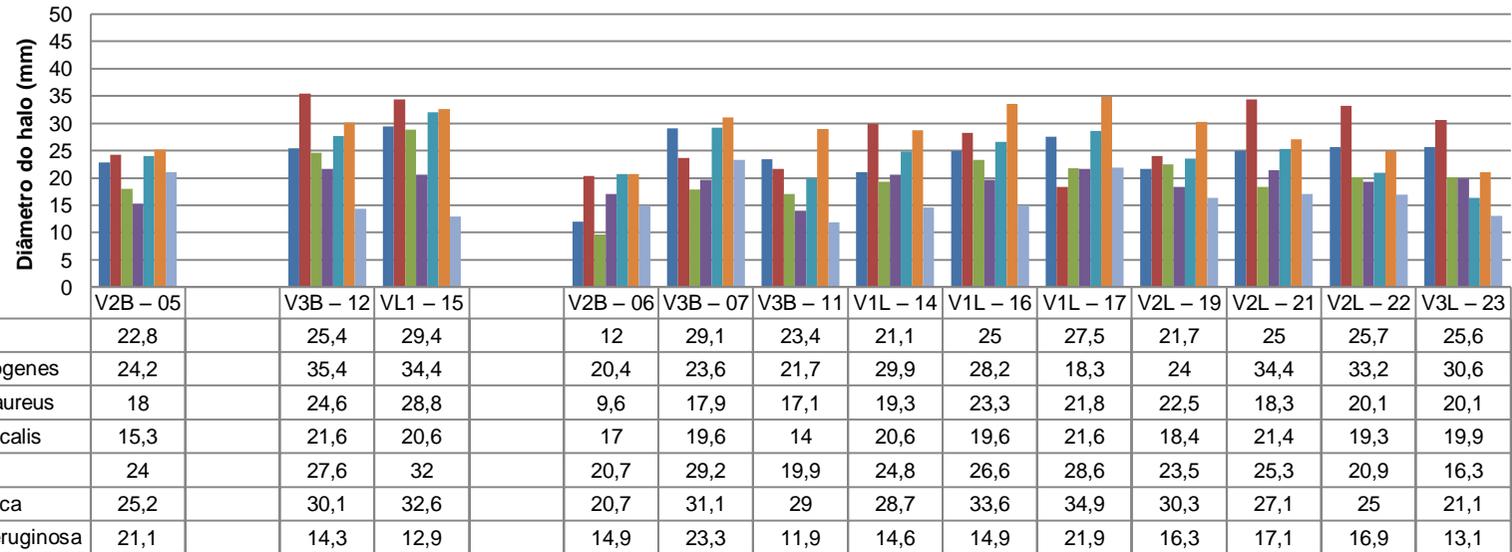


7.4- Apêndice D: Antagonismo: Diâmetros dos halos de inibição observados.

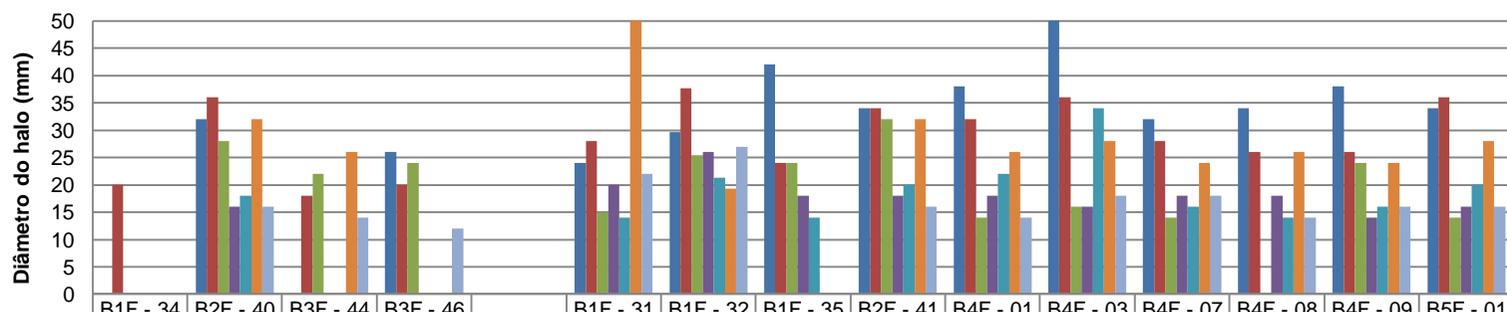
Atividade antagonista dos isolados de boca (*L. fermentum*)



Atividade antagonista dos isolados de boca (*L. perolens*, *W. cibaria* e *W. paramesenteroides*)

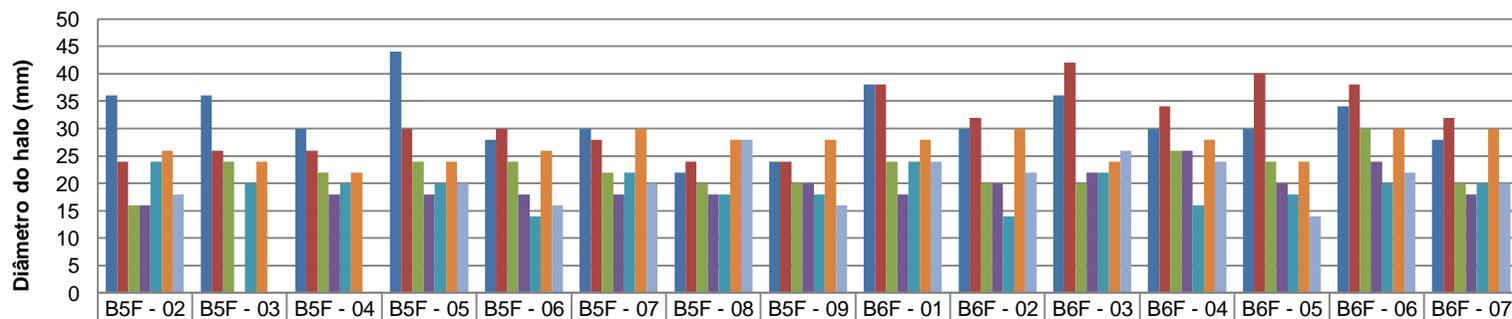


Atividade antagonista dos isolados intestinais (*L. johnsonii* e *L. reuteri*)



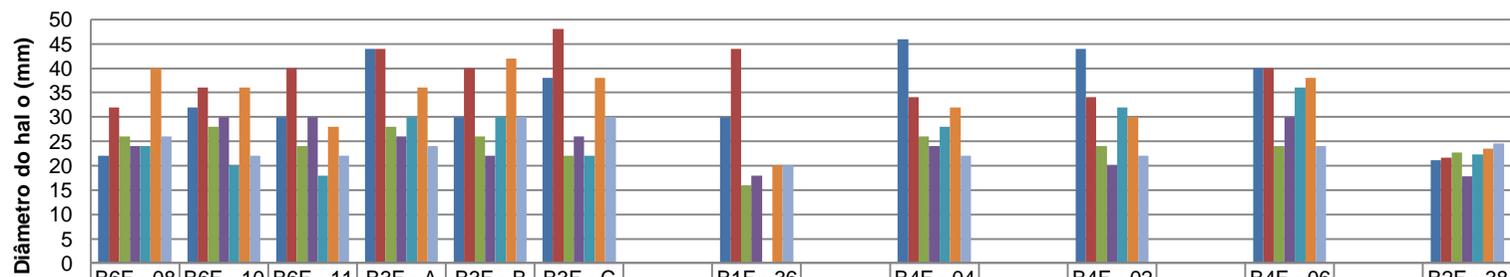
	B1F - 34	B2F - 40	B3F - 44	B3F - 46		B1F - 31	B1F - 32	B1F - 35	B2F - 41	B4F - 01	B4F - 03	B4F - 07	B4F - 08	B4F - 09	B5F - 01
■ <i>Bacillus cereus</i>	0	32	0	26		24	29,7	42	34	38	50	32	34	38	34
■ <i>Listeria monocytogenes</i>	20	36	18	20		28	37,7	24	34	32	36	28	26	26	36
■ <i>Staphylococcus aureus</i>	0	28	22	24		15	25,4	24	32	14	16	14	0	24	14
■ <i>Enterococcus faecalis</i>	0	16	0	0		20	26	18	18	18	16	18	18	14	16
■ <i>Escherichia coli</i>	0	18	0	0		14	21,3	14	20	22	34	16	14	16	20
■ <i>Salmonella enterica</i>	0	32	26	0		50	19,3	0	32	26	28	24	26	24	28
■ <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	16	14	12		22	27	0	16	14	18	18	14	16	16

Atividade antagonista dos isolados intestinais (*L. reuteri*)



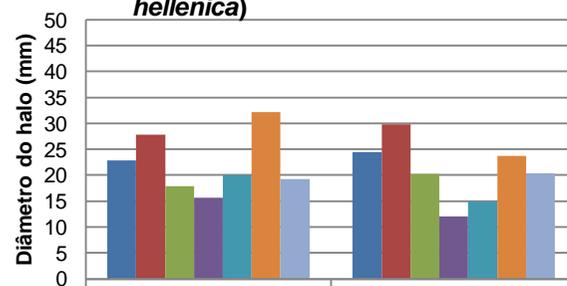
	B5F - 02	B5F - 03	B5F - 04	B5F - 05	B5F - 06	B5F - 07	B5F - 08	B5F - 09	B6F - 01	B6F - 02	B6F - 03	B6F - 04	B6F - 05	B6F - 06	B6F - 07
■ <i>Bacillus cereus</i>	36	36	30	44	28	30	22	24	38	30	36	30	30	34	28
■ <i>Listeria monocytogenes</i>	24	26	26	30	30	28	24	24	38	32	42	34	40	38	32
■ <i>Staphylococcus aureus</i>	16	24	22	24	24	22	20	20	24	20	20	26	24	30	20
■ <i>Enterococcus faecalis</i>	16	0	18	18	18	18	18	20	18	20	22	26	20	24	18
■ <i>Escherichia coli</i>	24	20	20	20	14	22	18	18	24	14	22	16	18	20	20
■ <i>Salmonella enterica</i>	26	24	22	24	26	30	28	28	28	30	24	28	24	30	30
■ <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18	0	0	20	16	20	28	16	24	22	26	24	14	22	20

Atividade antagonista dos isolados intestinais (*L. reuteri*, *L. acidophilus*, *L. animalis*, *L. casei*, *L. farciminis* e *L. salivarius*)



	B6F - 08	B6F - 10	B6F - 11	B3F - A	B3F - B	B3F - C	B1F - 36	B4F - 04	B4F - 02	B4F - 06	B2F - 38
■ <i>Bacillus cereus</i>	22	32	30	44	30	38	30	46	44	40	21,1
■ <i>Listeria monocytogenes</i>	32	36	40	44	40	48	44	34	34	40	21,7
■ <i>Staphylococcus aureus</i>	26	28	24	28	26	22	16	26	24	24	22,7
■ <i>Enterococcus faecalis</i>	24	30	30	26	22	26	18	24	20	30	17,8
■ <i>Escherichia coli</i>	24	20	18	30	30	22	0	28	32	36	22,3
■ <i>Salmonella enterica</i>	40	36	28	36	42	38	20	32	30	38	23,5
■ <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26	22	22	24	30	30	20	22	22	24	24,5

Atividade antagonista dos isolados vaginais (*W. hellenica*)



	V1V - 29	V1V - 30
■ <i>Bacillus cereus</i>	22,8	24,5
■ <i>Listeria monocytogenes</i>	27,8	29,8
■ <i>Staphylococcus aureus</i>	17,9	20,2
■ <i>Enterococcus faecalis</i>	15,6	12,1
■ <i>Escherichia coli</i>	20	14,9
■ <i>Salmonella enterica</i>	32,2	23,7
■ <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19,3	20,4

Apêndice E: Síntese dos resultados quanto às características funcionas e probiótica dos isolados bovinos. Quadros em verde equivalem à característica desejada a uma determinada linhagem. Quadros em vermelho característica indesejada.

Isolado	Antagonismo										
	SG(%)	SB(%)	MATS(%)	Bc	Lm	Sa	Ef	Ec	Se	Pa	H ₂ O ₂
<i>L. fermentum</i> V1B-01	0	76,65	63,7	+	+	+	+	+	+	+	S
<i>L. fermentum</i> V1B-02	6,59	45,97	56,47	+	+	+	+	+	+	+	S
<i>L. fermentum</i> V1B-03	0	80,31	56,31	+	+	+	+	+	+	+	S
<i>L. fermentum</i> V1B-04	8,72	44,79	53,61	+	+	+	+	+	+	+	S
<i>L. fermentum</i> V3B-08	17,23	14,75	60,57	+	+	+	+	+	+	+	S
<i>L. fermentum</i> V3B-09	0,29	38,76	44,44	+	+	+	+	+	+	+	S
<i>L. fermentum</i> V3B-10	30,77	62,42	48,59	+	+	+	+	+	+	+	S
<i>L. fermentum</i> V1L-13	4,03	48,09	47,89	+	+	+	+	+	+	+	S
<i>L. fermentum</i> V2L-18	7,42	43,76	52,41	+	+	+	+	+	+	+	N
<i>L. fermentum</i> V2L-20	5,24	72,51	47,12	+	+	+	+	+	+	+	S
<i>L. fermentum</i> V3L-24	0	41,01	52,45	+	+	+	+	+	+	+	S
<i>L. fermentum</i> V3L-25	12,12	67,99	59,7	+	+	+	+	+	+	+	S
<i>L. fermentum</i> V3L-26	15,97	63,89	54,66	+	+	+	+	+	+	+	S
<i>L. fermentum</i> V3L-27	3,27	81,39	46,33	+	+	+	+	+	+	+	S
<i>L. fermentum</i> V3L-28	16,79	54,92	47,47	+	+	+	+	+	+	+	S
<i>L. perolens</i> V2B-05	0	68,29	54,92	+	+	+	+	+	+	+	S
<i>W. cibaria</i> V3B-12	2,72	79,62	61,85	+	+	+	+	+	+	+	S
<i>W. cibaria</i> VL1-15	2,71	71,97	47,58	+	+	+	+	+	+	+	S
<i>W. paramesenteroides</i> V2B - 06	0	71,65	51,37	+	+	+	+	+	+	+	S
<i>W. paramesenteroides</i> V3B - 07	41,79	77,79	58,55	+	+	+	+	+	+	+	S
<i>W. paramesenteroides</i> V3B - 11	0	72,2	80,64	+	+	+	+	+	+	+	S
<i>W. paramesenteroides</i> V1L - 14	21,88	91,84	47,6	+	+	+	+	+	+	+	S
<i>W. paramesenteroides</i> V1L - 16	17,07	75,35	48,05	+	+	+	+	+	+	+	S
<i>W. paramesenteroides</i> V1L - 17	15,19	56,84	48,55	+	+	+	+	+	+	+	S
<i>W. paramesenteroides</i> V2L - 19	13,29	60,63	46,61	+	+	+	+	+	+	+	S
<i>W. paramesenteroides</i> V2L - 21	7,63	58,26	49,38	+	+	+	+	+	+	+	N
<i>W. paramesenteroides</i> V2L - 22	11,37	52,68	45,97	+	+	+	+	+	+	+	S
<i>W. paramesenteroides</i> V3L - 23	0	55,89	50,65	+	+	+	+	+	+	+	S
<i>W. hellenica</i> V1V-29	0,57	83,80	65,48	+	+	+	+	+	+	+	S
<i>W. hellenica</i> V1V-30	45,86	72,27	98,94	+	+	+	+	+	+	+	S

Isolado	SG(%)	SB(%)	MATS(%)	Antagonismo							H ₂ O ₂
				Bc	Lm	Sa	Ef	Ec	Se	Pa	
<i>L. acidophilus</i> B1F-36	3,64	68,12	70,28	+	+	+	+	-	+	+	N
<i>L. animalis</i> B4F-04	1,50	65,43	67,87	+	+	+	+	+	+	+	S
<i>L. casei</i> B4F-02	0,00	76,73	64,12	+	+	+	+	+	+	+	S
<i>L. farciminis</i> B4F-06	6,10	52,20	56,07	+	+	+	+	+	+	+	N
<i>L. johnsonii</i> B1F-34	39,98	98,85	71,45	-	+	-	-	-	-	-	N
<i>L. johnsonii</i> B2F-40	34,42	100,00	60,30	+	+	+	+	+	+	+	S
<i>L. johnsonii</i> B3F-44	19,49	54,44	66,94	-	+	+	-	-	+	+	N
<i>L. johnsonii</i> B3F-46	1,08	61,61	51,07	+	+	+	-	-	-	+	N
<i>L. reuteri</i> B1F-31	0,00	54,45	90,43	+	+	+	+	+	+	+	N
<i>L. reuteri</i> B1F-32	3,64	28,09	27,93	+	+	+	+	+	+	+	S
<i>L. reuteri</i> B1F-35	1,68	60,13	78,00	+	+	+	+	+	-	-	N
<i>L. reuteri</i> B2F-41	7,06	68,25	74,89	+	+	+	+	+	+	+	S
<i>L. reuteri</i> B4F-01	16,51	26,11	83,40	+	+	+	+	+	+	+	S
<i>L. reuteri</i> B4F-03	6,41	37,51	67,05	+	+	+	+	+	+	+	S
<i>L. reuteri</i> B4F-07	5,33	47,36	54,08	+	+	+	+	+	+	+	S
<i>L. reuteri</i> B4F-08	6,68	45,04	63,04	+	+	-	+	+	+	+	S
<i>L. reuteri</i> B4F-09	14,24	36,24	59,68	+	+	+	+	+	+	+	S
<i>L. reuteri</i> B5F-01	10,89	42,85	47,95	+	+	+	+	+	+	+	S
<i>L. reuteri</i> B5F-02	14,24	14,35	52,46	+	+	+	+	+	+	+	S
<i>L. reuteri</i> B5F-03	4,44	27,01	72,68	+	+	+	+	+	+	-	S
<i>L. reuteri</i> B5F-04	0,03	29,95	61,24	+	+	+	+	+	+	-	S
<i>L. reuteri</i> B5F-05	14,07	35,50	49,61	+	+	+	+	+	+	+	S
<i>L. reuteri</i> B5F-06	11,44	17,27	60,99	+	+	+	+	+	+	+	S
<i>L. reuteri</i> B5F-07	1,51	24,54	66,61	+	+	+	+	+	+	+	S
<i>L. reuteri</i> B5F-08	13,00	23,81	60,32	+	+	+	+	+	+	+	S
<i>L. reuteri</i> B5F-09	16,22	26,91	48,54	+	+	+	+	+	+	+	S
<i>L. reuteri</i> B6F-01	6,10	27,15	55,47	+	+	+	+	+	+	+	S
<i>L. reuteri</i> B6F-02	10,08	24,79	56,40	+	+	+	+	+	+	+	S
<i>L. reuteri</i> B6F-03	15,89	29,71	48,58	+	+	+	+	+	+	+	S
<i>L. reuteri</i> B6F-04	11,45	22,65	46,54	+	+	+	+	+	+	+	S
<i>L. reuteri</i> B6F-05	12,21	25,46	50,59	+	+	+	+	+	+	+	S
<i>L. reuteri</i> B6F-06	19,53	18,23	42,14	+	+	+	+	+	+	+	S
<i>L. reuteri</i> B6F-07	6,87	36,62	48,54	+	+	+	+	+	+	+	S
<i>L. reuteri</i> B6F-08	9,74	43,28	46,22	+	+	+	+	+	+	+	S
<i>L. reuteri</i> B6F-10	1,74	23,18	61,02	+	+	+	+	+	+	+	S
<i>L. reuteri</i> B6F-11	19,08	20,34	55,75	+	+	+	+	+	+	+	S
<i>L. reuteri</i> B3F-A	0,03	33,86	67,92	+	+	+	+	+	+	+	S
<i>L. reuteri</i> B3F-B	15,23	4,72	56,22	+	+	+	+	+	+	+	S
<i>L. reuteri</i> B3F-C	5,33	32,62	61,32	+	+	+	+	+	+	+	S
<i>L. salivarius</i> B2F-38	15,91	100,00	99,85	+	+	+	+	+	+	+	S

