

DANIELLE SOARES MALVEIRA

**BACTÉRIAS LÁTICAS COM POTENCIAL PROBIÓTICO PROVENIENTES
DE BEZERROS NELORE CRIADOS NO NORTE
DE MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciências Agrárias, concentração em Agroecologia, do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Agrárias.

Área de concentração: Agroecologia

Orientador: **Prof. Eduardo Robson Duarte**

Montes Claros

2012

Malveira, Danielle Soares.

M262b 2013 Bactérias lácticas com potencial probiótico provenientes de bezerros nelore criados no norte de Minas Gerais / Danielle Soares Malveira. Montes Claros, MG: ICA/UFMG, 2013.

52 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias, área de concentração em Agroecologia) Universidade Federal de Minas Gerais, 2013.

Orientador: Prof. Eduardo Robson Duarte.
Banca examinadora: Norberto Mário Rodrigues, Vera Lúcia dos Santos, Igor Viana Brandi, Eduardo Robson Duarte.

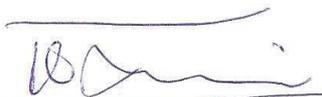
Inclui bibliografia: f. 41-51.

1. Microbiologia. 2. Bactérias lácticas. 3. Bovinocultura - Probióticos. I. Duarte, Eduardo Robson. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 579

DANIELLE SOARES MALVEIRA

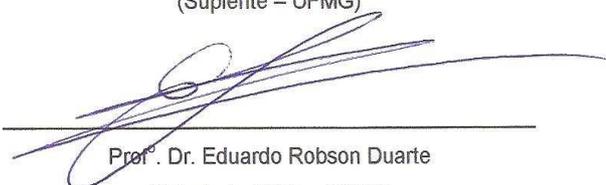
BACTÉRIAS LÁTICAS COM POTENCIAL PROBIÓTICO PROVENIENTES
DE BEZERROS NELORE
CRIADOS NO NORTE DE MINAS GERAIS



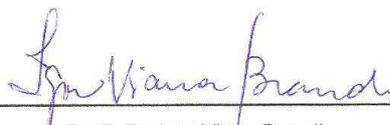
Prof.^o Dr. Norberto Mário Rodrigues
(Escola de Veterinária – UFMG)



Prof.^o Dr.^a Vera Lúcia dos Santos
(Suplente – UFMG)



Prof.^o Dr. Eduardo Robson Duarte
(Orientador/ ICA – UFMG)



Prof.^o Dr. Igor Viana Brandi
(Coorientador/ICA – UFMG)

Aprovada em 21 de dezembro de 2012.

Montes Claros

2012

Dedico aos meus avós, que sempre serão referência da base familiar, e que me ensinaram os princípios e a leveza da vida. Eles, juntamente com meu esposo, Almir, meu filho Túlio, minha mãe Iracema e meu pai Eumar me impulsionam para o desfecho dessa caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois, sem Ele nenhuma realização seria possível.

Ao meu esposo Almir pelo companheirismo e amor!

Ao meu filho Túlio, que foi o motivo maior da minha perseverança e coragem para seguir em frente.

Aos meus pais pela ajuda constante e o amor incondicional.

À minha família e à minha sogra Lina pelo apoio nas horas de maior necessidade.

Ao professor Eduardo Robson Duarte, pela confiança, incentivo e compreensão.

Às minhas amigas e parceiras de laboratório: Vanessa Veloso, Andréia Inácio. A colaboração de vocês foi determinante para a conclusão desta pesquisa. Em especial à Fernanda Guimarães que me ajudou sem medir esforços.

Às minhas amigas que conheci no mestrado e levarei para a vida inteira, Anne Karoene e Bruna Felício. À Emanuella Ribeiro pelo reencontro. À Thallyta pelas palavras de incentivo e alto astral.

Aos professores do mestrado, em especial Igor Viana Brandi e Maximiliano Pinto, pelo apoio.

Ao Janderson, pela prestatividade na realização das coletas.

À Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e à coordenação da Pós-graduação em Ciências Agrárias.

Aos funcionários do Instituto de Ciências Agrárias (ICA).

Às Pró-reitorias de graduação e pós-graduação, pela bolsa REUNI concedida durante esses dois anos de pesquisa.

E a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para que eu pudesse concluir mais esta etapa.

RESUMO

A colibacilose é uma das principais causas de diarreia neonatal em bezerros. A administração de probióticos tem representado alternativa promissora ao tratamento com antibacterianos, que podem comprometer a colonização do trato digestório dos bezerros. Nesta pesquisa, objetivou-se caracterizar e selecionar cepas de bactérias lácticas com potencial probiótico, provenientes de bezerros Nelore criados no norte de Minas Gerais. Foram coletadas amostras fecais de seis bezerros hígidos, com três a dez dias de vida e desses mesmos animais aos três meses de idade. Após isolamento e quantificação dessas bactérias, promoveu-se a caracterização morfológica e bioquímica com teste API 50 CH, resistência a pH ácido e a sais biliares e capacidade antagônica *in vitro* para três cepas de *Escherichia coli*. Verificou-se população significativamente superior ($p < 0,05$) de bactérias lácticas nas fezes dos bezerros na fase colostrar. Quanto à resistência ao ácido clorídrico 92,3% dos isolados de bezerros recém-nascidos resistiram ao pH 4,0, proporção significativamente superior àquela observada para os isolados de bezerros aos três meses de idade. Na concentração máxima de 1% de sal biliar, 92,3 e 84,6% dos isolados dos bezerros recém-nascidos e aos 90 dias, respectivamente, resistiram e apresentaram crescimento. No teste de antagonismo às cepas de *E. coli*, os isolados, Be4 1m, Be1 2b e Be6 2a, identificados, respectivamente, como *Lactobacillus salivarius*, *L. crispatus* e *L. pentosus*, produziram halo de inibição. Especificamente o isolado de *L. salivarius* apresentou halo de 20 mm de diâmetro de inibição sobre a *E. coli* proveniente do intestino delgado de um bezerro macho, com dois meses de idade, apresentando diarreia. Esses mesmos isolados de *Lactobacillus* spp. apresentaram melhores habilidades de resistência ao pH ácido e sais biliares, indicando potencial para serem avaliados como probióticos.

Palavras-chave: Pecuária de corte. *Lactobacillus* spp. Colibacilose. Antagonismo microbiano. Semiárido Mineiro. Caracterização bioquímica. Isolamento.

ABSTRACT

Colibacillosis is one of the main causes of neonatal diarrhea in calves. The administration of probiotics represents a promising alternative to the treatment with anti-bacterial medication that can compromise the calves' digestive tract. The objective of this research was to characterize and select strains of lactic bacteria with probiotic potential from Nelore calves in Northern Minas Gerais. Fecal samples were collected from six healthy suckling subjects, aged three to ten days and from those same subjects at three months. After isolation and quantification of the bacteria, a morphological and biochemical characterization was done using the API 50 CH test, resistance to acid pH and bile salts and in vitro antagonistic ability to three strains of *Escherichia coli*. A significantly higher ($p < 0,05$) population of lactic bacteria was verified in the calves' feces in the colostral phase. Regarding resistance to hydrochloric acid, 92.3% of neonatal calves isolates resisted to pH 4.0. That is a significantly higher rate than the one observed on three-month-old calves. In the maximum bile salts concentration of 1%, 92.3 and 84.6% of new-born and three-month-old calves respectively, resisted and presented growth. On the test for antagonism to *Escherichia coli* strains, the isolates Be4 1m, Be1 2b and Be6 2a respectively identified as *Lactobacillus salivarius*, *L. crispatus* and *L. pentosus* produced an inhibition halo. Specifically, the *L. salivarius* isolate presented an inhibition halo of 20mm in diameter against the *Escherichia coli* from the small intestine of a two-month male calf with diarrhea. The same *Lactobacillus* spp. isolates presented better resistance to acid pH and bile salts, indicating potential for being rated as probiotics.

Keywords: Beef cattle. *Lactobacillus* spp. Colibacillosis, Microbial antagonism. Minas Gerais' semiarid region. Biochemical characterization. Isolation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 Patologias em bezerros	11
2.2 Colibacilose	12
2.3 Probióticos	13
2.4 Bactérias probióticas	16
2.5 Utilização dos probióticos	18
2.6 Probióticos para bovinos	18
3 MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Amostragem e procedimento de coleta	20
3.2 Cultivo, isolamento, quantificação de bactérias láticas	20
3.3 Armazenamento e reativação	21
3.4 Crescimento em aerobiose	22
3.5 Caracterização morfológica das bactérias láticas	22
3.6 Atividade de catalase	22
3.7 Caracterização probiótica	22
3.7.1 Resistência a sais biliares	22
3.7.2 Resistência ao ácido clorídrico	23
3.8 Caracterização bioquímica de bactérias láticas	23
3.9 Efeito antagonista dos isolados sobre cepas de <i>Escherichia coli</i> ...	25
3.10 Análise estatística	26
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1 Cultivo, isolamento, quantificação de bactérias láticas	27
4.2 Caracterização morfológica e atividade de catalase das bactérias láticas	28
4.3 Caracterização probiótica	29

4.3.1 Resistência aos sais biliares	29
4.3.2 Resistência ao ácido clorídrico	31
4.4 Crescimento em aerobiose	32
4.5 Caracterização bioquímica de bactérias lácticas	34
4.6 Efeito antagonista dos isolados sobre cepas de <i>Escherichia coli</i> ...	37
5 CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS	41
ANEXO – Certificado do CETEA/UFMG relativo ao projeto “Caracterização de <i>Lactobacillus</i> spp. isolados de bovinos nelore (<i>Bos indicus</i>) com potencial probiótico sobre <i>Escherichia Coli</i>.” ...	52

1 INTRODUÇÃO

Como resultado do melhoramento no manejo nutricional de ruminantes, tem-se observado aumento nos índices de produção de carne e leite nos últimos 30 anos (NOORAE *et al.*, 2010). Atualmente, a bovinocultura é responsável pelo abastecimento da maior parte da demanda mundial de proteína animal. A carne e o leite bovinos possuem participação significativa na economia nacional, representando 8,4% do Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro. O rebanho bovino do Brasil é constituído aproximadamente por 219 milhões de cabeças, com a produção anual de 7,15 milhões de toneladas de carne e 24,5 bilhões de litros de leite (IBGE, 2010).

A colibacilose é caracterizada como enfermidade bacteriana infecto-contagiosa ocasionada por cepas patogênicas de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) (WITTUM *et al.*, 1993). Essa bactéria causa diarreia em bezerros com menos de duas semanas de vida, pode provocar a morte e perdas financeiras consideráveis em sistemas de produção de bovinos. Os animais sobreviventes não apresentam o mesmo desenvolvimento quando comparados àqueles livres dessa infecção (MAGALHÃES *et al.*, 1991).

Os distúrbios entéricos promovem grandes prejuízos para a pecuária bovina de corte brasileira (OK *et al.*, 2009). Estudos indicam índice de 2% de mortalidade em bezerros, em diferentes Estados do Brasil e principalmente em bezerros da raça Nelore (MOTA *et al.*, 2000). Em propriedades leiteiras, estudos recentes também indicam prejuízos em decorrência da morte de animais com colibacilose em diferentes países (GULLIKSEN *et al.*, 2009; MORRELL *et al.* 2008; TORSEIN *et al.*, 2011).

Durante a fase de aleitamento, os bezerros são mais susceptíveis às doenças e às diarreias que representam as principais alterações intestinais durante as primeiras semanas de vida (BUZINARO *et al.*, 2003).

Para o tratamento e controle dessa doença, é frequentemente empregada a administração de antibacterianos. No entanto, as toxicidades, as alergias e o favorecimento à resistência têm fomentado o interesse clínico e científico por probióticos, prebióticos e simbióticos, como alternativas à

antibioticoterapia (ROSTAGNO *et al.*, 2012; VASCONCELLOS *et al.*, 2007).

Os microrganismos probióticos têm sido propostos como adjuvantes para promover a saúde de bezerros recém-nascidos (EWASCHUK *et al.*, 2004;. MAGALHÃES *et al.*, 2008). A utilização de probióticos na dieta depende em parte da cepa utilizada, pois, nem todas as cepas possuem a mesma capacidade de modular a microbiota local ou de aderir às células intestinais (BRIIZUELA, 2003). As bactérias ácido-láticas são utilizadas frequentemente como probióticos por possuírem capacidade de inibir o crescimento de bactérias patogênicas (FULLER, 1989).

Bactérias da microbiota intestinal e ou componentes dos probióticos podem produzir e liberar compostos como bacteriocinas, ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio, com ação antibacteriana sobre os patógenos. Microrganismos presentes na microbiota intestinal, especialmente *Lactobacillus* spp. inibem a colonização de diferentes bactérias, Gram positivas ou Gram negativas, consideradas patogênicas (BLACKBURN *et al.*, 1989; CHAVES *et al.*, 1999).

Poucos estudos no Brasil têm avaliado e caracterizado a população de bactérias lácticas em bezerros de corte, criados em condições tropicais, para a seleção de cepas adaptadas e efetivas contra bactérias patogênicas causadoras de diarreia. A utilização dessas cepas poderia prevenir a colibacilose nos bezerros, reduzindo a aplicação de antibacterianos e os prejuízos durante a etapa de cria dos animais. Nesta pesquisa, objetivou-se isolar, quantificar e caracterizar bactérias lácticas com potencial probiótico e provenientes de bezerros de corte criados no norte de Minas Gerais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Patologias em bezerros

O manejo adequado dos animais jovens merece destaque, porque a fase de cria representa expressiva importância econômica na bovinocultura. A fase de aleitamento é, provavelmente, a mais crítica, uma vez que parte do leite produzido é desviada para a alimentação dos bezerros. Essa, também é a fase em que os bezerros são mais susceptíveis às doenças. As diarreias são as principais alterações intestinais nas duas primeiras semanas de vida (BUZINARO *et al.*, 2003).

Considerando-se todas as categorias de animais em um sistema de produção de bovinos, as taxas mais elevadas de morbidade e mortalidade geralmente são observadas no grupo de bezerros até o desaleitamento. Nesses animais, os problemas sanitários mais frequentes são as infecções de umbigo, diarreias, pneumonias, tristeza parasitária, verminoses, doenças carenciais e de pele (COELHO; CARVALHO, 2006; COUTINHO, 2006; FONTES; CARVALHO, 2006). Enteropatógenos de origem bacteriana, parasitária e viral podem estar envolvidos, de forma isolada ou em associação, na etiologia de diarreia em bezerros, com destaque para *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Rotavírus*, *Coronavírus* e protozoários dos gêneros *Cryptosporidium* (ALVES 1997, FAGAN *et al.*, 1995, LANGONI *et al.*, 2004).

A diarreia neonatal bovina é reconhecida como síndrome, visto que decorre da interação entre fatores como a imunidade, o ambiente, a nutrição e a infecção por diferentes microrganismos com potencial patogênico (BENESI, 1999). Para Fuller (1997), o estabelecimento e a manutenção de microrganismos benéficos no intestino dos animais podem controlar patógenos entéricos, reduzindo ou eliminando as diarreias.

2.2 Colibacilose

O conhecimento sobre a colonização e desenvolvimento da microbiota intestinal saudável é necessário para prevenir e reduzir as diarreias. Seria benéfico para o desenvolvimento de alternativas racionais como probióticos e prebióticos, o conhecimento sobre a estrutura e função da microbiota do trato gastrointestinal, bem como a atividade de espécies microbianas dentro de um ecossistema (KONSTANTINOV *et al.*, 2004).

Escherichia coli é o microrganismo mais abundante da microbiota intestinal dos bezerros e, como anaeróbio facultativo, desempenha importante papel na manutenção das funções fisiológicas normais dos hospedeiros (ACRES,1985). Contudo pode ser patogênica, ocasionando diarreia em bezerros recém-nascidos ao produzir enterotoxina e colonizar o intestino delgado (HADAD; GYLES, 1982; RYCKE *et al.*, 1987; SMITH; HALLS, 1967). Pode ocasionar tanto infecções intestinais e extra-intestinais (GAY; BESSER, 1994; SMYTH *et al.*, 1994).

Cepas de *E. coli* causadoras de diarreia em bezerros são classificadas de acordo com os sinais clínicos produzidos relacionados aos fatores de virulência. São agrupadas em enterotoxigênicas (ETEC), “*attaching and effacing*” (AEEC), enteropatogênicas (EPEC) e produtoras de toxinas do tipo Shiga (STEC), que quando apresentam também atividade “*attaching and effacing*” são classificadas em enterohemorrágicas (EHEC). Em cepas comumente isoladas de bezerros, as fímbrias K99 e/ou F41 e a enterotoxina Sta são os fatores de virulência de ETEC, que participam da aderência ao íleo e promovem hipersecreção no lúmen do intestino, respectivamente. A proteína intimina participa da atividade de adesão ao enterócito e destruição das microvilosidades intestinais em AEEC. *E. coli* enterohemorrágica, como o sorotipo O157:H7, possui atividade AE e produz toxinas Shiga do tipo 1, 2 ou ambas (FRANCK *et al.*,1998).

As enterotoxinas produzidas causam saída de água e de eletrólitos para dentro do lúmen intestinal, provocando diarreia e desidratação (SMITH; HALLS, 1967; SMITH; HUGGINS, 1978). No intestino delgado, *E. coli* promove aderência, colonização e produção de toxina, que ocasionam

desequilíbrio hidroeletrólítico e diarreia. A bactéria produz *pili* de aderência, que a possibilita fixar em diferentes tecidos do hospedeiro, e por isso é considerado fator de colonização, principalmente quando propicia aderência às células epiteliais da mucosa intestinal (GAASTRA; GRAFF, 1982).

A diarreia desencadeia prejuízos na pecuária bovina de corte, e apesar disso são escassos os estudos no Brasil enfocando a identificação em conjunto dos principais enteropatógenos em bezerros de corte, criados extensivamente (SALVADORI *et al.* 2003).

Alguns estudos revelam que a *Escherichia coli* é a enterobactéria mais frequentemente isolada nas fezes dos bezerros com e sem diarreia, ratificando a necessidade da presença de fatores de virulência nas linhagens para a ocorrência de diarreia (ALVES 1997, MENDONÇA *et al.* 1996, LANGONI *et al.* 2004), seguido de *Cryptosporidium* spp., Coronavírus e Rotavírus (FILHO *et al.*, 2007).

2.3 Probióticos

O termo probiótico é derivado do grego e significa “para a vida”. Os primeiros a usarem o termo foram Lilly e Stillwel (1965) ao descrever “substâncias de certos microrganismos que estimulavam o crescimento” contrastando com o termo antibiótico. Fuller (1989) considerou que os probióticos são suplementos alimentares que contêm bactérias vivas que produzem efeitos benéficos no hospedeiro, favorecendo o equilíbrio da microbiota intestinal.

A definição atualmente aceita internacionalmente é que são microrganismos vivos, administrados em quantidades adequadas e que conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO, 2001; SANDERS, 2003). Os probióticos podem beneficiar a saúde dos animais e seres humanos (COPPOLA; TURNES, 2004; MOTA *et al.*, 2006) (TAB. 1).

TABELA 1
Efeitos benéficos de probióticos

Efeitos Benéficos	Referências
Promove crescimento, aumentando o ganho de peso	(ARENAS <i>et al.</i> , 2005a ; KABIR <i>et al.</i> , 2004)
Reduz o pH intraluminal do tubo digestivo	(AGOSTONI <i>et al.</i> , 2004)
Minimiza o estresse	(KABIR <i>et al.</i> , 2004)
Impede a colonização da mucosa intestinal por bactérias patogênicas	(ÁVILA <i>et al.</i> , 2000; LOZADA, 2001)
Aumenta a resposta imune humoral	(ARENAS <i>et al.</i> , 2005b).
Produce metabólitos que inibem bactérias Gram negativas ou positivas patogênicas. Compete por sítios de adesão e produz vitaminas do grupo B.	(FULLER, 1989)
Estimula o sistema imune com a ativação de macrófagos. Ativa o sistema imune contra células cancerígenas e restaura a microbiota intestinal.	(CASTRO, 2003)
Realiza a produção de ácido láctico	(FULLER, 1977)

Fonte: Da autora.

Além dos benefícios, descritos anteriormente, os probióticos produzem benefícios na alimentação dos ruminantes. Aumentam a digestibilidade das fibras, reduzem níveis de amônia ruminal, promovem maior ingestão de matéria seca, melhora a estabilidade nos processos digestivos, com antecipação da fase ruminante e redução de diarreias nos bezerros (GOMES, 2002).

A adição de probióticos na alimentação animal também tem sido indicada por reduzir a mortalidade resultante da colonização intestinal por microrganismos patogênicos, melhorando o desempenho e as características de produção sem deixar resíduos prejudiciais na carne (FULLER; COLE, 1988). A manutenção da microbiota intestinal estável com o uso de probióticos induz formação de biofilme contra microrganismos potencialmente patogênicos e propicia a obtenção de bons resultados zootécnicos (MULDER, 1991).

Os microrganismos utilizados como probióticos são classificados em quatro grupos: aeróbios (*Bacillus* spp.); anaeróbios (*Clostridium* spp.); bactérias produtoras de ácido lático (*Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp.), leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) e fungos filamentosos (*Aspergillus oryzae* e *A. niger*). Alguns critérios de seleção são essenciais na escolha de microrganismos probióticos. Devem ser espécie-específicos, reconhecidos como seguros (*Generally Recognized as Safe*), resistentes ao suco gástrico e aos sais biliares, capazes de sobreviver aos processos tecnológicos, permanecerem viáveis durante a vida de prateleira e ainda terem benefícios à saúde comprovados. Além disso, bactérias selecionadas não devem apresentar fatores de virulência e transmissibilidade de plasmídeos resistentes a antibióticos (DELGADO *et al.*, 2008; MORAES; COLLA, 2006).

Existem outros aspectos importantes no processo de seleção das cepas de microrganismos com função probiótica como: ser totalmente seguro ao hospedeiro (não-patogênica e não-tóxica); ser resistente às secreções pancreáticas; aderir às células epiteliais; garantir proteção contra microrganismos patogênicos por meio do processo de exclusão competitiva; secretar substâncias inibidoras como ácidos; resistir aos antibióticos; tolerar aditivos alimentares; ser estável nos alimentos e contribuir para a nutrição do hospedeiro, como, por exemplo, produzir vitaminas (FIORAMONTI *et al.*, 2003; MACFARLANE *et al.*, 2002).

Os probióticos devem produzir metabólitos inibidores da multiplicação de microrganismos patogênicos como bacteriocinas, ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio (FULLER, 1992; JIN *et al.*, 2000; OGAWA *et al.*,

2001). As bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos de baixo peso molecular, produzidas por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, que apresentam amplo espectro de ação (RUSSEL; MANTOVANI, 2002). Atuam primariamente sobre a membrana plasmática bacteriana, formando poros que possibilitam o refluxo de componentes citoplasmáticos e causam perda da viabilidade celular (MOLL *et al.*, 1999).

Algumas bacteriocinas já foram identificadas e caracterizadas em bactérias do rúmen, sugerindo que o antagonismo microbiano seja importante nas relações do ecossistema ruminal (MANTOVANI *et al.*, 2001). Sendo substâncias mais efetivas contra bactérias Gram-positivas, a ação antimicrobiana desses peptídeos se assemelha à dos antibióticos ionóforos (RUSSEL; MANTOVANI, 2002). Esse tipo de antibiótico baseia-se na desorganização do transporte de cátions nas membranas das bactérias promovendo maior gasto energético para manter o balanço osmótico entre o meio interno e o externo da célula (BERGEN; BATES, 1984).

2.4 Bactérias probióticas

Os alimentos probióticos são aqueles que carregam ou são produzidos por bactérias probióticas originadas do trato intestinal humano, quando o produto se destina ao consumo humano. Devem ser provenientes do trato intestinal de uma determinada espécie animal quando se destina à alimentação dessa espécie. Esses alimentos fazem parte do mercado de alimentos funcionais e estão disponíveis em diferentes formatos, principalmente como formulações para animais, produtos farmacêuticos, produtos de confeitaria e produtos lácteos fermentados ou não (FERREIRA, 2003). As bactérias lácticas são os microrganismos probióticos mais importantes e tipicamente associados com o trato gastrointestinal dos humanos e animais (RAMÍREZ, 2005).

Morfologicamente, as bactérias lácticas podem ser cocos ou, bastonetes regulares e irregulares. Os cocos são de forma esférica mais ou menos alargada entre 0,5 e 2 μm , apresentam-se em pares, tétrades ou cadeias de número variado. Os gêneros *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus* e

Enterococcus estão dispostos em pares ou cadeias, o gênero *Leuconostoc* forma células lenticulares dispostas em pares ou cadeias e os gêneros *Pediococcus* e *Tetragenococcus* formam células dispostas em tétrades (ALEXON, 1998; DE ROISSART; LUQUET, 1994; WOOD; HOLZAPFEL 1995).

Os bastonetes regulares podem ter diâmetro variável entre 0,5 e 2 µm e comprimento maior que 10 µm, apresentado-se isolados, em pares ou cadeias longas. Os *Lactobacillus* spp. pertencem a esse grupo (HAMES; VOGEL, 1995). Já os bastonetes irregulares são característicos das bactérias lácticas do gênero *Bifidobacterium* e são típicos por apresentarem aspectos extremamente variáveis de uma espécie a outra (DE ROISSART; LUQUET, 1994).

As bactérias lácticas podem sobreviver em presença de pH relativamente baixo (3,5) de maneira diferente de outros grupos microbianos com metabolismo respiratório. Possuem sistema de transporte simultâneo de ácido láctico e de prótons ao exterior celular, que além de contribuir para homeostase do pH interno, produz energia (TSENG; MONTVILLE, 1993).

Outras características comuns apresentadas por bactérias lácticas são a presença de parede celular Gram positiva, são imóveis, não esporuladas, catalase negativa, possuem carência de citocromos, não liquidificam a gelatina e nem produzem sulfeto de hidrogênio (FERREIRA, 2003; GOMES *et al.*, 1999; RAMÍREZ, 2005).

Os representantes do gênero *Lactobacillus* possuem características morfológicas, metabólicas e fisiológicas em comum. São bastonetes Gram-positivo, catalase negativa, imóveis, não formadoras de esporos, sem citocromo, microaerófilos, nutricionalmente exigentes. São ainda tolerantes à acidez, com metabolismo estritamente fermentativo, sendo o ácido láctico o principal produto do metabolismo de carboidratos (JAY, 1996; ROBINSON, 1991).

Lactobacillus spp. são naturalmente encontrados em *habitats* ricos em nutrientes, como na superfície de vegetais e no trato gastrointestinal, de diferentes espécies animais (KANDLER; WEISS, 1986; SALMINEM, 1998). Esse gênero é reconhecido como grupo de microrganismos seguro para

serem utilizados em alimentos, GRAS (LEE; SALMINEN, 1995).

2.5 Utilização de probióticos

A utilização de antibióticos como promotores de crescimento tem sido amplamente difundida para aumentar a produtividade e para reduzir problemas sanitários decorrentes da maior densidade animal nos sistemas de produção (SANTOS; TURNES, 2005). Entretanto, segundo Vassalo *et al.* (1997), frequentemente antibióticos e quimioterápicos tradicionalmente mostram-se ineficazes no controle de alterações intestinais ocasionadas por microrganismos patogênicos, pois comumente verifica-se resistência, como consequência da seleção promovida com o uso frequente de alguns princípios ativos.

A administração de probióticos em animais pode ser recomendável para auxiliar na manutenção da microbiota intestinal não patogênica, restaurar a estabilidade dessa microbiota após fatores de desequilíbrios. Esses fatores são relacionados a falhas na ingestão de colostro, desmama, alterações alimentares, doenças virais, mudança brusca de ambiente, transporte de animais, uso de antibióticos por via oral e estresse. Podem também serem recomendados para promover a colonização e estabilidade da microbiota intestinal não patogênica em recém-nascidos (FERNANDES *et al.*, 2000).

2.6 Probióticos para bovinos

O papel de probióticos para bovinos é manter o equilíbrio da microbiota intestinal e ruminal, tendo como principal função impedir a colonização intestinal por bactérias patogênicas como a *Escherichia coli* enterotoxigênica (ÁVILA *et al.*, 1988; ÁVILA *et al.*, 1998) e aumentar o ganho de peso (ABE *et al.*, 1995; SIUTA, 1991).

Preparações de bactérias vivas dos gêneros *Ruminobacter*, *Lactobacillus*, *Succinovibrio*, *Bacillus* e *Streptococcus*, são comumente adicionadas como suplementação dietética para manter e estabilizar uma

população de organismos benéficos no trato gastrointestinal, melhorando o crescimento e a eficiência na utilização de alimentos em bovinos (SMITH; LINGGOOD, 1972).

Em estudo realizado em bezerros leiteiros por Chaves *et al.*, (1999), fez-se o fornecimento diário de concentrado com células viáveis de *Lactobacillus acidophilus*, verificou-se redução da ocorrência de diarreias, sem influir no odor e na consistência das fezes; os animais que receberam probiótico nos primeiros 10 dias de vida apresentaram maior número de *Lactobacillus spp.* no intestino delgado. A concentração de coliformes totais no intestino delgado foi maior nos animais controle e menor nos que receberam probiótico nos primeiros 56 dias de vida.

Abe *et al.*, (1995) estudaram os efeitos da administração de um probiótico contendo *Bifidobacterium thermophilum*, *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus acidophilus* no ganho de peso de leitões e bezerros recém-nascidos. A frequência de diarreia em leitões e bezerros foi menor nos grupos tratados com o probiótico. A média do ganho de peso dos bezerros, após 90 dias de experimento, foi 40% maior no grupo tratado com o probiótico quando comparado ao grupo controle.

Ávila *et al.*, (1995) concluíram que o fornecimento de um probiótico contendo *Lactobacillus acidophilus*, combinado com uma vacina contendo *pili* K99 e A14 de *Escherichia coli*, foi eficiente no controle da diarreia de bezerros.

Frizzo *et al.*, (2011), avaliaram o efeito da lactose e um inóculo microbiano integrado por três cepas de bactérias lácticas de origem bovina para melhorar o crescimento, o desempenho e o equilíbrio microbiano intestinal em bezerros jovens. Os resultados evidenciaram que os animais suplementados com o probiótico apresentaram maiores contagens bacterianas lácticas.

Cepas de *L. acidophilus* de origem de bezerros são mais eficazes como adjuvante da dieta do que a cepa de origem humana, uma vez que aumentam a microbiota normal das fezes de bezerros recém-nascidos durante duas semanas após o nascimento (GILLILAND *et al.*, 1980).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostragem e procedimento de coleta

Neste estudo foram amostrados seis bezerros hígidos da raça Nelore (*Bos indicus*) da fazenda experimental do ICA/UFMG localizada em Montes Claros, norte de Minas Gerais. A região do presente estudo localiza-se aproximadamente a 16°51' de latitude e 44°55' de longitude, apresenta temperatura média anual de 24,2°C, clima quente e seco com período de estiagem entre os meses abril e outubro. Os animais foram criados em sistema extensivo, em pastagem de *Brachiaria* spp. junto das mães.

Entre os meses de outubro de 2011 e março de 2012, foram coletados aproximadamente 30 gramas de fezes de cada animal em dois períodos. Primeiramente foram amostrados com três a 10 dias de vida, na fase de ingestão de colostro e, posteriormente, com aproximadamente 90 dias de idade, durante a fase de aleitamento. As fezes foram obtidas por estimulação da ampola retal, massageando a parede do reto com os dedos protegidos por luvas.

Os espécimes clínicos foram acondicionados em sacos plásticos, devidamente identificados, armazenados em caixa isotérmica com gelo e encaminhados imediatamente para o Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais (ICA-UFMG). Todos os procedimentos realizados com os bezerros foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG, no protocolo n°219/2011 (ANEXO).

3.2 Cultivo, isolamento, quantificação de bactérias lácticas

As amostras foram homogeneizadas e diluídas na razão de 1:9 (25 gramas de fezes em 225 mL de água peptonada 0,2 %). Após a diluição decimal, 1000 µL foram inoculados por "pour plate", em placas 90 x 150 mm, contendo o meio sólido Man, Rogosa e Sharpe, MRS (HiMedia Laboratories Pvt.Ltd., Mumbai, Maharashtra India) (KANDLER; WEISS, 1986). As placas

foram acondicionadas em jarras de anaerobiose, devidamente vedadas. Para promover condições de microaerofilia, utilizou-se reator químico. O material foi incubado em estufa BOD a 37 °C, durante 48 h, (PELCZAR *et al.*, 1997). Após contagem total das unidades formadoras de colônias (UFC), com auxílio de contador de colônias, as placas com colônias bem definidas foram selecionadas para o isolamento. Foram selecionadas, no primeiro período das coletas, colônias com morfotipos diferentes para cada animal, totalizando 77 isolados. No segundo período de coleta, foram selecionadas colônias morfologicamente diferentes para cada animal, totalizando 22 isolados.

Para avaliar a capacidade de coagulação do leite, foram utilizados os procedimentos adaptados de Kandler e Weiss (1986). Os isolados foram transferidos para tubos contendo 8 mL de leite desnatado reconstituído (LDR), contendo 12% de extrato seco desengordurado esterilizado a 121 °C por 15 min. Os procedimentos foram realizados em triplicata e incubados a 37 °C durante 48 h e posteriormente os isolados foram novamente repicados em LDR por três vezes consecutivas. O teste foi considerado positivo quando ocorreu coagulação do leite após 48 h de incubação para as três repetições. Os isolados que apresentaram crescimento e sobrevivência após as três incubações consecutivas foram selecionados e submetidos aos testes de caracterização bioquímica.

3.3 Armazenamento e reativação

O total de 82 isolados selecionados na etapa anterior foram cultivados em caldo BHI (Brain Heart Infusion, HiMedia Laboratories Pvt.Ltd., Mumbai, Maharashtra Índia), e criopreservados em glicerol a (50%) a -18 °C. Para preservação, foram adicionados 0,5 mL do isolados crescido em LDR, 0,5 mL de caldo BHI e 0,5 mL de glicerol estéril (RAMÍREZ, 2005). Para cada prova seguinte, a reativação foi promovida com inoculação de 1 % (v/v) das culturas congeladas em tubos contendo 5 mL do caldo BHI e incubação a 37 °C, durante 24 h (MANGONI, 2009).

3.4 Crescimento em aerobiose

Com a finalidade de testar a habilidade de crescimento das bactérias lácticas em condições aeróbicas, promoveu-se a inoculação por estriação em placas contendo meio MRS e incubou-se por 48 horas em estufa BOD à 37 ° C. O resultado foi observado visualmente quanto à presença ou ausência de crescimento da amostra.

3.5 Caracterização morfológica das bactérias lácticas

Foram preparados esfregaços em lâminas corados pelo método de Gram para 99 isolados, sendo 77 de bezerros recém-nascidos e 22 de bezerros aos 90 dias. Todos os isolados que apresentaram formas de bastonetes Gram positivos não esporulados foram selecionados (MANGONI, 2009).

3.6 Atividade de catalase

Para verificar a capacidade de secreção de catalase de 56 isolados, bastonetes Gram positivos, selecionados na etapa anterior, foram adicionadas duas gotas de peróxido de hidrogênio, 3 % (v/v), sobre fragmentos de colônias isoladas e dispostas em lâminas. A capacidade de produção de catalase foi considerada negativa com a ausência de formação de microbolhas de oxigênio em torno das colônias (REQUENA, 1995).

3.7 Caracterização probiótica

3.7.1 Resistência a sais biliares

Com a finalidade de evidenciar as características probióticas, testou-se a resistência aos sais biliares. Nesta etapa, utilizou-se 27 isolados catalase negativos, sendo 13 do primeiro período de coleta e 14 do segundo período. Esses isolados foram previamente cultivados em caldo MRS (HiMedia

Laboratories Pvt.Ltd., Mumbai, Maharashtra India) a 37 °C durante 24 h. Para o estudo de viabilidade às diferentes concentrações de sais biliares, foram inoculados 100 µL do inóculo no ágar MRS, contendo 0; 0,3; 0,5 e 1,0 % de sais biliares (Oxgall, Difco, Detroit, MI, USA). Após incubação a 37 °C durante 48 h em jarra de anaerobiose, o crescimento das colônias frente aos sais biliares foi observado visualmente. Os procedimentos foram realizados em duplicata e foram adaptados de Gilliland *et al.*, (1985) e Noh; Gilliland (1993).

3.7.2 Resistência ao ácido clorídrico

Para avaliar a resistência ao ácido clorídrico, o pH do caldo BHI foi ajustado para 3,0, 4,0, 5,0 e 7,0 com adição de ácido clorídrico estéril PA, utilizando-se um pHmetro digital, de acordo com a metodologia adaptada de Ramírez (2005). Os isolados, previamente cultivados em caldo BHI, em fase exponencial, foram inoculados em proporção de 5 % para cada meio contendo o pH avaliado. A incubação ocorreu a 37 °C e o crescimento foi avaliado após seis horas de exposição ao caldo BHI acidificado. Após esse período, foram inoculados 50 µL desse meio acidificado em placas contendo ágar MRS e espalhados com alça de Drigalski. Os materiais foram cultivados em anaerobiose a 37 °C e após 48 h observou-se visualmente o crescimento comparando com o controle em pH 7. Foi definido o padrão ++++ (100 %) representando o crescimento no controle com pH 7, e +++, ++ e + , respectivamente para 75 %, 50 %, 25 % do crescimento desse controle e - para a ausência de crescimento.

3.8 Caracterização bioquímica de bactérias lácticas

Para caracterização bioquímica de 26 isolados selecionados, sendo 13 de bezerros recém-nascidos e 13 dos bezerros aos três meses de idade, promoveu-se a caracterização em galerias API 50 CHL (BioMérieux SA, Marcy- l'Etoile/ França) mostrado na Figura 1. Esse *kit* permite avaliar a capacidade de fermentação de 49 carboidratos e derivados.

Após o crescimento exponencial, com dois cultivos em ágar MRS a 37 °C, durante 48 h em condições de anaerobiose, foram preparados inóculos em caldo MRS (HiMedia Laboratories Pvt.Ltd., Mumbai, Maharashtra Índia) que foram cultivados nessas mesmas condições. Posteriormente, inóculos de 2 mL foram incorporados ao meio API 50 CHL Médium e transferidos para 49 cúpulas, contendo os diferentes substratos. Cada cúpula foi vedada com uma gota de óleo mineral estéril e a incubação foi em estufa BOD a 37 °C (BIOMÉRIEUX, 2012).

As leituras foram efetuadas em 24 e 48 h após inoculação nas galerias API. Durante a incubação, o catabolismo conduz à formação de ácidos orgânicos que permitem a viragem do indicador do pH. Os resultados obtidos constituem o perfil bioquímico da cepa, facilitando a identificação ou tipagem bioquímica (RAMIRÉZ, 2005). Para análise dos resultados, utilizou-se o programa de probabilidade LAB PLUS software version 4.0 database da BioMerieux, Marcy l'Etoile, France (BIOMÉRIEUX, 2012).



FIGURA 1 - Galerias API 50 CHL utilizadas para a caracterização bioquímica dos isolados de bactérias lácticas provenientes de bezerros criados no norte de Minas Gerais.

Fonte: Da autora.

3.9 Efeito antagonista dos isolados sobre cepas de *Escherichia coli*

O efeito antagonista dos isolados selecionados foi avaliado para três isolados de *Escherichia coli* como bactérias reveladoras, sendo um deles a cepa ATCC 25922 (E1), gentilmente cedido pela Prof.^a Regina Maria Nardi Drummond do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. O segundo isolado foi proveniente de fezes de uma bezerra com um mês de idade (E2) e o terceiro proveniente do intestino delgado de um bezerro macho com dois meses de idade (E3), sendo que ambos bovinos apresentavam diarreia. Os isolados dos bezerros foram obtidos em cultivos contendo o meio sólido Mac Conkey (HiMedia Laboratories Pvt.Ltd., Mumbai, Maharashtra Índia) e identificados presuntivamente, utilizando-se o meio Rugai Modificado e em provas bioquímicas no Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (KONEMAN, 2008).

A inibição do crescimento dessas bactérias patogênicas foi verificada com adaptação do método descrito por Tagg; Mc Given (1971). As culturas puras de cada isolado de *E. coli*, em fase de exponencial, foram inoculadas em toda a superfície de uma placa 90 x 150 mm contendo ágar Mueller Hinton (HiMedia Laboratories Pvt.Ltd., Mumbai, Maharashtra Índia), com o auxílio de um *swab* estéril. Posteriormente, discos de papel de filtro com 6 mm de diâmetro, impregnados com o caldo MRS contendo um dos 26 isolados de bactérias lácticas cultivadas a 37 °C durante 48 h, foram aplicados sobre a superfície do ágar. Após o período de incubação de 48 h, verificou-se a presença ou ausência de halos de inibição, bem como a mensuração dos diâmetros dos halos produzidos de acordo com Santos (1984). Esse autor classifica como muito forte as zonas de inibição de 20 a 25 mm de diâmetro; inibição forte entre 15 a 19 mm, moderada entre 11 a 14 mm; fraca entre 9 a 10 mm; e nenhuma inibição, menor que 9 mm.

Com a finalidade de confirmar o efeito antagonista, fez-se o ensaio para detecção do halo de inibição dos isolados com a técnica de difusão em sobrecamada de ágar, utilizando as bactérias reveladoras E1, E2 e E3 e seguindo a metodologia adaptada descrita por Alvim (2011). As cepas

patogênicas utilizadas como reveladoras foram ativadas com inóculo de 2% (v/v) em caldo BHI ("Brain Heart Infusion" – Acumedia) e crescidas em aerobiose a 37°C por 24 horas.

As placas contendo ágar MRS foram preparadas e armazenadas 24 horas a 4°C. Os isolados de *Lactobacillus* spp. que apresentaram resultado positivo no teste de antagonismo anterior, foram reativados (item 3.3) e inoculados na superfície do ágar MRS, com o auxílio de um *swab*, proporcionando o crescimento da colônia no formato circular com diâmetro médio de 0,4 mm. As placas foram incubadas por um período de 48 horas em anaerobiose a 37°C. Após o período de crescimento dos isolados de *Lactobacillus* spp., as placas foram retiradas da câmara de anaerobiose e os isolados expostos ao vapor de clorofórmio (1 mL em papel filtro), por 30 minutos, para promover a morte das células. Em seguida, as placas foram abertas, por 40 minutos, para evaporação do clorofórmio residual. Posteriormente, uma sobrecamada de 20 mL de meio contendo Ágar Nutriente, a aproximadamente 40° C e previamente inoculado com as amostras reveladoras E1, E2 ou E3, foi vertida sobre a placa.

Posteriormente, as placas foram incubadas 24 horas em anaerobiose a 37°C e o halo de inibição formado ao redor da colônia de *Lactobacillus* spp. foi mensurado com o auxílio de uma régua milimetrada, esse procedimento foi realizado em triplicata. A atividade antagonista foi considerada positiva, se observado uma zona clara de inibição (halo) (largura $\geq 3,0$ mm) ao redor de cada isolado, conforme Sarkar e Banerjee (1996).

3.10 Análise estatística

Após a análise exploratória, os dados obtidos da quantificação das colônias foram transformados para $\log_{10}(X+10)$ e as médias de contagens bacterianas foram comparadas pelo teste t de Student no pacote estatístico SAEG, considerando o nível de significância de 5 % (SAMPAIO, 2002).

Os valores da coagulação do leite, foram comparados utilizando-se o teste qui-quadrado com 5% de significância, com o pacote SAEG, versão 9,1 (2007) (SAMPAIO, 2002).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Cultivo, isolamento, quantificação de bactérias lácticas

Neste presente estudo verificou-se positividade de bactérias lácticas para todos os bezerros avaliados e em ambos os períodos estudados. As amostras apresentaram contagens médias de $25,3 \times 10^9$ e $5,3 \times 10^6$ UFC g^{-1} de fezes para bezerros recém-nascidos e aos 90 dias, respectivamente (TAB. 2).

TABELA 2

Quantificação de bactérias lácticas em meio MRS provenientes de fezes de bezerros Nelore recém-nascidos e aos 90 dias, criados no norte de Minas Gerais, Brasil.

Bezerro com três a 10 dias de vida		Bezerro com 90 dias de vida	
	Média da UFC* g^{-1} de fezes		Média da UFC* g^{-1} de fezes
Be1	$1,75 \times 10^9$	Be1	$5,70 \times 10^6$
Be2	$2,97 \times 10^9$	Be2	$2,0 \times 10^6$
Be3	$77,00 \times 10^9$	Be3	$2,90 \times 10^6$
Be4	$65,00 \times 10^9$	Be4	$9,90 \times 10^6$
Be5	$2,82 \times 10^9$	Be5	$6,70 \times 10^6$
Be6	$2,64 \times 10^9$	Be6	$4,80 \times 10^6$
Média	$25,36 \times 10^9$ A		$5,33 \times 10^6$ B

*Unidade Formadora de Colônias

Nota: Médias com letras diferentes na linha, indica diferença significativa com valor $p < 0,001$, utilizando-se o teste Student .

Fonte: Da autora.

Após análise estatística, verificou-se concentração significativamente superior dessas bactérias nas fezes dos bezerros na fase colostrar. Aos três meses de idade, os bezerros já consumiam outros alimentos como pontas de capim e sal mineral, o que favoreceria outros microrganismos que poderiam competir com as bactérias lácticas. Por outro lado, como a concentração de lactose estaria menor na dieta total disponível aos bezerros aos três meses, poderia ocorrer redução do crescimento das bactérias lácticas, que utilizam preferencialmente essa fonte de carboidrato.

O total de 99 isolados de bactérias lácticas, sendo 77 da fase colostrar e 22 dos bezerros aos 3 meses de idade, foi avaliado quanto à capacidade de coagulação do leite. Observou-se que 80,5 % e 95,5 % de isolados provenientes de bezerros recém-nascidos e os de 90 dias, respectivamente, foram positivos para essa habilidade (TAB. 3). Algumas bactérias lácticas oxidam a lactose do leite, até ácido láctico, reduzindo o pH e coagulando o leite (KANDLER; WEISS, 1986).

4.2 Caracterização morfológica e atividade de catalase das bactérias lácticas

Do total de 62 isolados que coagularam o leite e eram provenientes dos bezerros recém-nascidos, 56,4 % (35 isolados), eram bastonetes Gram positivos. Já na análise micromorfológica dos isolados provenientes dos bezerros aos três meses de idade, 95,5% eram bastonetes Gram positivos (21 isolados). Para os 56 isolados bastonetes Gram positivos, que foram submetidos ao teste de catalase, 40,0 % e 95,2 % foram negativos para excreção dessa enzima em colônias dos bezerros recém-nascidos e aos três meses, respectivamente (TAB. 3).

Observa-se que para os bezerros recém-nascidos a população de bactérias lácticas era constituída por maior diversidade de morfotipos, com características distintas do gênero *Lactobacillus* e por isso, proporcionalmente menos isolados foram selecionados (TAB. 3). Por outro lado, para os bezerros aos 90 dias de vida, verificou-se o predomínio de bactérias catalase negativo, bastonetes Gram positivos e com habilidade de coagulação do leite, características compatíveis com o gênero selecionado

($P < 0,05$) (TAB. 3). Essas diferenças observadas poderiam ser atribuídas ao processo de colonização e estabilização da microbiota autóctone dos bezerros, que é influenciado diretamente pela idade e dieta dos animais (TANNOCK, 1999).

TABELA 3

Quantificação e seleção quanto ao morfotipo, capacidade de coagulação do leite, síntese de catalase e micromorfologia de isolados de bactérias lácticas provenientes de fezes de bezerros Nelore recém-nascidos e aos 90 dias, criados no norte de Minas Gerais, Brasil

Idade dos animais	Morfotipos de colônias	Coagulação do leite	Bastonetes Gram positivos	Catalase negativa
Recém-nascidos	77	62 (80,5%)	35 (56,4%)	14 (40,0%)
Aos 90 dias	22	21 (95,5%)*	21 (100,0%)*	20 (95,2%)*
Total	99	83 (83,8%)	56 (67,5%)	34 (60,7%)

* indica diferença significativa no teste qui-quadrado com valores de $p < 0,05$

Fonte; Da autora.

4.3 Caracterização probiótica

4.3.1 Resistência aos sais biliares

Observou-se que para os bezerros recém-nascidos, 100% dos isolados resistiram à concentração de 0,3 e 0,5 % de sais biliares. Na concentração máxima de 1 % de sal biliar, 92,3 % dos isolados resistiram e apresentaram crescimento. Já para os isolados dos bezerros aos três meses de idade, 100, 92,3 e 84,6 % resistiram à concentração de 0,3, 0,5 e 1 %, respectivamente (TAB. 4).

Em estudo realizado por Chaves *et al.* (1999), com bactérias isoladas de bezerros, observou-se que todas as cepas de *Lactobacillus acidophilus* cresceram bem nas diferentes concentrações de sais biliares. Resultados similares foram observados com *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus fermentum* no mesmo estudo. Esse resultado corrobora o evidenciado nesta pesquisa, uma vez que os isolados Be1 2b (*L. fermentum*), Be5 2b (*L. plantarum*), Be2 ij, Be 2 1h, Be3 1i, Be4 1c2, Be6 1n e Be4 2b (*L. brevis*), cresceram bem nas concentrações de sais biliares de 0,3, 0,5 e 1 %, excetuando o crescimento da colônia Be5 2b na concentração de 1 % (TAB. 4).

A bile é um componente antimicrobiano importante para o sistema digestório e é formada por diferentes substâncias. Os sais biliares são capazes de promover danos à membrana celular e na estrutura do DNA bacteriano (MERRITT; DONALDSON, 2009). Portanto, a tolerância a esses compostos é fundamental para sobrevivência do microrganismo probiótico no trato gastrointestinal (LEBEER, *et al.*, 2008). Um fator que pode favorecer a sobrevivência dos microrganismos no duodeno é a presença de alimentos. As bactérias podem não ficar expostas aos sais de bile, uma vez que o alimento pode interagir com os ácidos biliares, evitando, dessa forma a toxicidade sobre as membranas microbianas (MARTINS *et al.*, 2006).

A Figura 2 mostra o crescimento de bactérias lácticas provenientes de bezerros do norte de Minas Gerais em meio MRS acrescido de Oxgall bile.

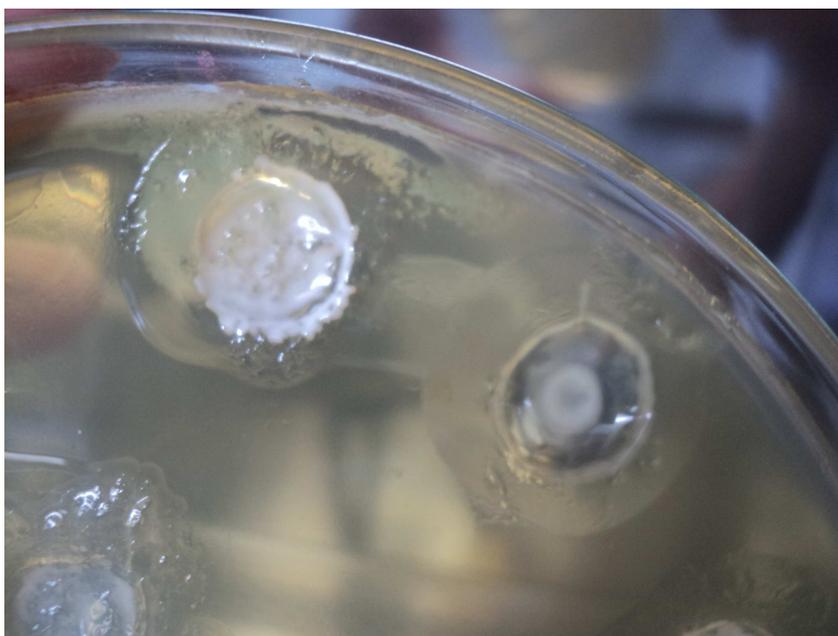


FIGURA 2-Crescimento de bactérias lácticas provenientes de bezerros do norte de Minas Gerais em meio MRS acrescido de Oxgall bile
Fonte: Da autora.

4.3.2 Resistência ao ácido clorídrico

Do total de 13 isolados de bezerros recém-nascidos, 46,2 % e 92,3 % apresentaram bom crescimento (+++ ou ++++), respectivamente, para o meio ajustado com o pH 3 e 4. Para o meio ajustado com pH 5 e 7, todos os isolados apresentaram bom crescimento (++++ ou +++) . Já para os 13 isolados provenientes dos bezerros aos 90 dias de idade, 61,5 % e 76,9 % apresentaram bom crescimento (++++ ou ++) para o pH 3 e 4, respectivamente, o que revela uma alta proporção de colônias com resistência as à alta concentração de ácido clorídrico (TAB. 4).

A Figura 3 mostra o crescimento de bactérias lácticas isoladas de bezerros do norte de Minas, em meio MRS com pH 7, 5, 4 e 3.

Diferentemente dos resultados observados para a resistência ao pH ácido, neste presente estudo, Martins *et al.* (2006), ao avaliarem a resistência de bactérias lácticas isoladas de suínos constataram que nenhum dos isolados selecionados apresentou capacidade de crescer em meios com o pH.

Fuchs (2006), em estudo com *Lactobacillus casei*, constatou que as células foram resistentes às condições ácidas avaliadas com pH 6,0, 4,0 e 2,0, evidenciando assim importante característica probiótica. Dessa forma, a bactéria seria capaz de ultrapassar a primeira barreira fisiológica do trato digestório, que corresponde ao baixo valor de pH do estômago (GIBSON, 2004). Após a ingestão dos alimentos, o estômago se esvazia com aproximadamente duas a quatro horas. As bactérias que sobrevivem às condições fisiológicas desse órgão, posteriormente, deverão resistir às secreções de sais biliares no duodeno (PENNACCHIA *et al.*, 2004).

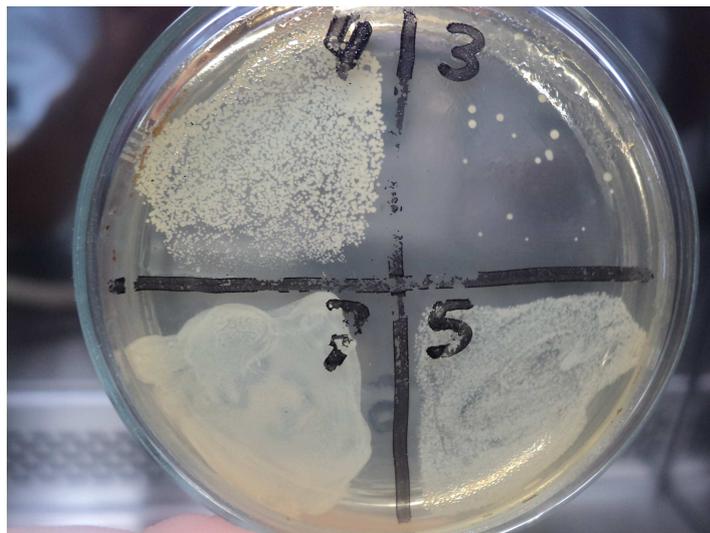


FIGURA 3 – Crescimento de bactérias lácticas isoladas de bezerros do norte de Minas, em meio MRS com pH 7, 5, 4 e 3.
Nota: pH3: +; pH4: ++; pH5: +++ e pH7: ++++.
Fonte: Da autora.

4.4 Crescimento em aerobiose

A capacidade de crescimento em aerobiose foi constatada para 69,2 % dos isolados provenientes das fezes dos bezerros e em proporções iguais para ambas as idades avaliadas (TAB. 4). O crescimento de alguns microrganismos como os do gênero *Lactobacillus*, em condições de aerobiose promove a formação de superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxila (OH^-), que constituem os principais fatores responsáveis pela toxicidade do oxigênio.

TABELA 4

Resistência a sais biliares, ao pH ácido e crescimento em aerobiose de isolados de *Lactobacillus* spp. provenientes de fezes de bezerros Nelore recém-nascidos e aos 90 dias, criados no norte de Minas Gerais, Brasil

Isolados	pH				Sal biliar				Crescimento em aerobiose
	3	4	5	7	0 %	0,3%	0,5%	1%	
Bezerros recém-nascidos									
Be2.1j	+++	++++	++++	++++	+	+	+	+	+
Be2.1h	++	+++	+++	++++	+	+	+	+	+
Be3.1a	++	+++	++++	++++	+	+	+	+	-
Be3.1i	+	++++	++++	++++	+	+	+	+	-
Be3.1c	++	+++	++++	++++	+	+	+	-	+
Be4.1a	+	++++	++++	++++	+	+	+	+	-
Be4.1r	++	++	+++	++++	+	+	+	+	-
Be4.1m	++	++++	++++	+++	+	+	+	+	+
Be4.1c2	+++	+++	++++	++++	+	+	+	+	+
Be4.1c3	+++	+++	+++	++++	+	+	+	+	+
B4.1c	+++	+++	++++	++++	+	+	+	+	+
B4.1l	+++	+++	++++	++++	+	+	+	+	+
Be6.1n	++++	++++	++++	++++	+	+	+	+	+
Bezerros aos 90 dias									
Be1.2b	-	-	+++	++++	+	+	+	+	+
Be1.2d	-	+	+++	++++	+	+	+	+	+
Be2, 2c	+++	+++	++++	++++	+	+	-	+	+
Be3, 2a	-	+	++	+++	+	+	+	+	-
Be3, 2b	-	-	++	+++	+	+	+	+	+
Be4, 2a	+	+	++++	++++	+	+	+	+	-
Be4, 2b	++	+++	++++	++++	+	+	+	+	-
Be4, 2c	+++	+++	++++	++++	+	+	+	+	+
Be5, 2b	-	++	+++	++++	+	+	+	-	+
Be5, 2c	+++	+++	++++	++++	+	+	+	-	+
Be6, 2f	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Be6, 2a	+++	+++	++++	++++	+	+	+	+	-
Be6, 2b	++	+	+++	++++	+	+	+	+	+

Nota: O resultado do pH foi expresso em termos de intensidade de crescimento. A concentração de sal biliar e o crescimento em anaerobiose avaliou-se o crescimento (+) ou não crescimento (-).

Fonte: Da autora.

4.5 Caracterização bioquímica de bactérias lácticas

A TAB. 5 mostra as características fermentativas de 40 carboidratos para os isolados de bactérias lácticas provenientes dos bezerros de corte no primeiro período de vida. Para os 13 isolados avaliados não verificou-se capacidade fermentativa para Glicerol, Eritrol, D- arabinose, L- Xilose, D- Adonitol, Metil- β D- Xilopiranosido, L- Sorbose, Inositol, Metil- α D- manopiranosido, Dulcitol, D- Melezitose, Glicogênio, Xilitol, D- Lixose, D- Fucose e 5- Cetogluconato de potássio.

A TAB. 6 mostra as características fermentativas de 34 carboidratos para os isolados de bactérias lácticas provenientes dos bezerros de corte no segundo período da coleta. Para os 13 isolados, não foi observado capacidade fermentativa para 15 carboidratos, que corresponderam ao Eritrol, D- Arabinose, L- Xilose, D- Adonitol, Metil- β D-Xilopiranosido, L- Sorbose, Dulcitol, Inositol, D-lixose, D-fucose, L-fucose, D-Arabitol, L- Arabitol, 2- Cetogluconato de potássio e 5- Cetogluconato de potássio, D- Melezitose e Xilitol.

A análise presuntiva indicou o predomínio das espécies *Lactobacillus lactis* ssp. e *L. brevis* para os bezerros recém-nascidos, correspondendo a 53,8 e 38,5 % dos isolados identificados. O isolado Be4 1m correspondeu à espécie *Lactobacillus salivarius* com 99,9 % de similaridade. Já para as bactérias lácticas provenientes dos bezerros aos três meses de idade, verificou-se o predomínio da espécie *Lactobacillus pentosus*, que correspondeu a 46,1 % dos isolados (TAB. 6). O isolado Be1 2b foi identificado como *Lactobacillus crispatus* com similaridade de 99,9 % e o Be6 2a correspondeu a *Lactobacillus pentosus* com 89,3 % de similaridade.

De um total de 526 isolados iniciais de fezes de bezerros, Chaves *et al.*, (1999), identificou 12 (2,28 %) cepas de *Lactobacillus acidophilus*, a partir de fezes de bezerros com 1 a 3 dias de idade utilizando a mesma metodologia empregada neste presente estudo.

TABELA 5

Capacidade fermentativa e identificação presuntiva de bactérias lácticas provenientes de fezes de bezerros Nelore recém-nascidos criados no norte de Minas Gerais, Brasil

Carboidratos	Isolados de bactérias lácticas de bezerros recém-nascidos													
	Be2	Be2	Be3	Be3	Be3	Be4	Be6							
	1j	1h	1a	1i	1c	1a	1r	1m	1c2	1c3	1c	1l	1n	
L- arabinose	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	
D- ribose	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	
D- xilose	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	
D- galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
D- glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
D- frutose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
D- manose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L- ramnose	-	-	-	-	-	-	v	v	-	-	-	-	-	
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	v	-	-	-	-	-	-	
D- Manitol	v	v	+	v	+	+	+	+	+	v	+	+	+	
D- Sorbitol	-	-	-	-	-	-	v	+	v	-	-	v	-	
Metil- α D- Glucopiranosido	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	
N- AcetilGlucosamina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Amigdalina	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	
Arbutina	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	
Esculina citrato de ferro	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Salicina	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	
D- celobiose	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	
Glicerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
D- lactose (origem bovina)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
D- melibiose	-	-	-	-	-	-	v	+	v	-	-	-	-	
D- sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
D- trealose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Inulina	-	-	-	v	-	v	-	-	v	-	-	-	-	
D- Rafinose	-	v	v	v	-	-	+	+	v	-	-	-	-	
Amido	v	v	v	v	v	v	+	-	v	v	v	v	-	
Gentiobiose	+	+	+	+	+	+	+	v	+	+	+	+	+	
D- Turanose	v	-	-	-	v	-	-	-	-	-	-	-	-	
D- Tagatose	+	-	-	v	v	v	v	-	+	-	+	+	v	
L- Fucose	-	-	-	-	-	-	v	v	-	-	-	-	-	
D- Arabitól	-	-	-	-	-	-	-	v	-	-	-	-	-	
Gluconato de potássio	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	
2- Cetogluconato de potássio	-	-	-	-	-	-	-	v	-	-	-	-	-	
Identificação presuntiva	L7	L7	L6	L7	L6	L6	L6	L8	L7	L6	L6	L6	L7	

Nota: L1 - *Lactobacillus crispatus*; L2 - *Lactobacillus fermentum*1; L3 - *Lactobacillus pentosus*; L4 - *L. plantarum* 1; L5 - *L. paracasei* ssp.; L6 - *L. lactis* ssp.; L7 - *L. brevis* 1; L8 - *L. salivarius*.

Fonte: Da autora.

TABELA 6

Capacidade fermentativa e identificação presuntiva de bactérias lácticas provenientes de fezes de bezerros Nelore com três meses de idade e criados no norte de Minas Gerais, Brasil

CARBOIDRATOS	Isolados de bactérias lácticas de bezerros aos 90 dias											
	Be1 2b	Be1 2d	Be2 2c	Be3 2a	Be4 2a	Be4 2b	Be4 2c	Be5 2b	Be5 2c	Be6 2f	Be6 2a	Be6 2b
Glicerol	-	v	-	-	v	-	-	-	-	-	-	-
L- arabinose	-	v	+	+	+	+	+	+	v	+	+	+
D- ribose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D- xilose	-	v	+	+	+	+	+	+	v	v	+	+
D- galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	v	v	+	+
D- glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D- frutose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D- manose	+	v	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L- ramnose	-	-	v	v	v	-	v	v	v	v	-	-
D- Manitol	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D- Sorbitol	-	-	+	+	+	v	+	+	v	v	v	+
Metil- αD- Manopiranosido	-	-	-	v	v	-	v	+	v	v	v	-
Metil- αD- Glucopiranosido	-	-	v	v	v	v	v	v	v	v	+	v
N- AcetilGlucosamina	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amigdalina	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arbutina	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Esculina citrato de ferro	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicina	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D- celobiose	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D- lactose (origem bovina)	+	+	+	+	+	+	+	+	v	+	+	+
D- melibiose	+	-	v	v	v	v	v	v	v	v	+	v
D- sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	v	+	+
D- trealose	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inulina	-	-	v	v	v	v	v	v	v	v	v	-
D- Rafinose	+	-	v	v	v	v	v	v	v	v	+	v
Amido	+	-	v	v	v	v	v	+	-	v	v	-
Glicogênio	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	v
Gentiobiose	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
D- Turanose	-	v	-	-	v	-	-	-	+	-	v	-
D- Tagatose	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	v
Gluconato de potássio	-	-	v	v	+	+	+	v	v	v	+	+
Identificação presuntiva	L1	L2	L3	L3	L3	L7	L3	L4	L5	L6	L3	L3

Nota: L1 - *Lactobacillus crispatus*; L2 - *Lactobacillus fermentum*1; L3 - *Lactobacillus pentosus*; L4 - *Lactobacillus plantarum* 1; L5 - *Lactobacillus paracasei* ssp.; L6 - *Lactobacillus lactis* ssp; L7 - *Lactobacillus brevis* 1; L8 - *Lactobacillus salivarius*.

Fonte: Da autora.

A distribuição das espécies de *Lactobacillus* spp. variou para as duas idades avaliadas. Para os bezerros recém-nascidos verificou-se, entre os isolados identificados, 53,8 % de *L. lactis* ssp., 38,5 % de *L. brevis* e 7,7% de *L. salivarium*. Para os bezerros aos 90 dias 53,9 % dos isolados foram identificados como *L. pentosus* e 46,1% deles foram classificados como outras espécies (TAB. 5 e 6).

4.6 Efeito antagonista dos isolados sobre cepas de *Escherichia coli*

No teste de antagonismo avaliado neste estudo, verificou-se que os isolados Be4 1m (*L. salivarius*), Be1 2b (*L. crispatus*) e Be6 2a (*L. pentosus*) apresentaram atividade contra as bactérias reveladoras E3, E2 e E2, respectivamente. De acordo com os parâmetros estabelecidos por Santos (1984), o Be4 1m apresentou inibição muito forte, com halo de 20mm frente à *E. coli* proveniente do intestino delgado de um bezerro macho com dois meses de idade (E3) (TAB. 7). Em metodologia similar, Chaves *et al.* (1999) constatou que quatro isolados apresentaram antagonismo considerado forte frente à cepa de *Escherichia coli* enteropatogênica. A inibição do crescimento de bactérias patogênicas é uma das principais propriedades desejáveis para linhagens probióticas de bactérias do ácido láctico (GUO *et al.*, 2010).

A atividade antimicrobiana do *Lactobacillus acidophilus* em diferentes bactérias é atribuída, em grande parte, à produção de ácido láctico (HAMDAN; MIKOLAJCIK, 1974; STAMER, 1979). Em trabalho semelhante, Santos (1984), avaliando três cepas de *Lactobacillus acidophilus* isoladas de fezes de bezerros, verificou-se após 21 horas de incubação, variação no percentual de ácido láctico produzido entre 0,53 e 0,68%. Paulo (1991), ao avaliar sete cepas de *Lactobacillus acidophilus* provenientes de fezes de suínos, encontrou com 24 horas de incubação variação no percentual de ácido láctico de 0,37 a 0,80%.

Um isolado de *Lactobacillus acidophilus* foi testado por Santos (1984), sendo considerado causador de inibição moderada (13 mm) com 40 horas de incubação frente à *Escherichia coli* K 12 no mesmo estudo, resultados

indicam que quatro isolados apresentaram antagonismo considerado forte frente à estirpe de *Escherichia coli* enteropatogênica

TABELA 7

Valores médios do halo de inibição em milímetros do antagonismo de *Lactobacillus spp.* provenientes de fezes de bezerros Nelore recém-nascidos e aos 90 dias, criados no norte de Minas Gerais, Brasil, frente à três cepas de *E. coli*.

Isolados	Espécie	E1	E2	E3
Be1, 2b	<i>Lactobacillus crispatus</i>	12,3	9,3	13,7
Be4, 1m	<i>Lactobacillus salivarius</i>	15	12,3	13,3
Be6, 2a	<i>Lactobacillus pentosus</i>	12,3	10,7	20

Nota: E1 (ATCC 25922); E2 (proveniente de fezes de uma bezerra com um mês de idade com diarreia); E3 (proveniente do intestino delgado de um bezerro macho com dois meses de idade com diarreia).

Fonte: Da autora.

O *Lactobacillus crispatus* (Be1, 2b) e o *Lactobacillus pentosus* (Be6, 2a), foram mais eficientes na inibição da E3, tendo como média dos halos 13,7 mm e 20 mm respectivamente. Esses mesmos *Lactobacillus* apresentaram valores iguais de halo médio de inibição para a E1, evidenciando assim a mesma eficiência contra essa reveladora. O *Lactobacillus salivarius* (Be4, 1m), apresentou maior antagonismo frente à E1, com o halo médio de inibição de 15 mm.

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

De acordo com o parâmetro estabelecido por Sarkar e Banerjee (1996), os resultados foram positivos, uma vez que as médias foram representativamente maiores que 3 mm.

Em estudo realizado com suínos, Alvim (2011) observou que as reveladoras *E. coli* e *Salmonella. enterica*, apontadas como patógenos de maior impacto sobre a suinocultura moderna, foram fortemente inibidas, nas quais duas amostras de diferentes isolados apresentaram halo de inibição de 28 e 40 mm.

5 CONCLUSÃO

Isolados com características de *Lactobacillus* spp. provenientes de bezerros de corte apresentam resistência a pH ácido e a sais biliares. As espécies *L. lactis* ssp. e *L. brevis* predominam entre os isolados provenientes dos bezerros recém-nascidos, enquanto *L. pentosus* corresponde à espécie mais frequente para os isolados provenientes dos bezerros aos três meses de idade. O isolado *L. salivarius* apresentou forte antagonismo contra uma cepa de *Escherichia coli* proveniente de bezerro com diarreia, indicando promissor potencial probiótico.

REFERÊNCIAS

- ABE, F.; MIYAURA, S.; ISHIBASHI, N. Effect of administration of a probiotic containing bifidobacteria and lactic acid bacteria on newborn piglets and calves. **Nutritional Science Laboratories**, v. 8, p. 141-146, 1995.
- ACRES, E. D. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in newborn calves: a review. **Journal of Dairy Science**, v. 68, p. 229-56, 1985.
- AGOSTONI, C.; AXELSSON, I.; BRAEGGER, C.; GOULET, O.; KOLETZKO, B.; MICHAELSEN, K. F.; RIGO, J.; SHAMIR, R.; SZAJEWSKA, H.; TURCK, D.; WEAVER, L. T. Probiotic bacteria in dietetic products for infants: a commentary by the ESPGHAN committee on nutrition. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 38, p. 365-374, 2004.
- ALEXON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology, In S. Salminen and A. von Wright. **Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects**, 2. Ed. Marcel Dekker, Inc., New York, NY, p. 1-72, 1998.
- ALVES, A. J. **Ocorrência de enteropatógenos em bezerros diarreicos em fazendas de exploração leiteira**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp, Botucatu, SP, 1997.
- ALVIM, B. L. **Identificação molecular e seleção de bactérias lácticas com potencial probiótico isoladas de diferentes mucosas de suínos**. Dissertação (Mestrado em Genética). Universidade Federal de Minas Gerais. 2011.
- ARENAS, S. E.; REIS, L. S. L. S.; FAZATTI-GALLINA N. M.; GIUFFRIDA R.; PARDO, P. E. **Evaluación de la incorporación del probiótico Proenzime® en una mezcla mineral sobre el engorde de bovinos**. In: XII Congreso Latinoamericano de Buiatria, Sociedad Chilena de Buiatria. Valdivia, Anais, p. 169–170, 2005a.
- ARENAS, S. E.; REIS, L. S. L. S.; FAZATTI-GALLINA N. M.; GIUFFRIDA R.; PARDO, P. E. **Proenzime® probiotic increases the humoral immune response in bovines immunized with the rabies vaccine**. In: XVI International Conference Rabies on Rabies in the Americas, Canadian Food Inspection Agency. Ottawa, Anais. p. 99-99, 2005b.
- ÁVILA, F. A.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; LALLIER, R.; QUITANA, J. L. *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in the northern region of state of São Paulo, Brazil. **Ars Veterinária**, v. 4, p. 285-289, 1988.

ÁVILA, F. A.; PAULILLO, A. C.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; QUITANA, J. L. A comparative study on the efficiency of a probiotic and the anti-K99 and anti-A14 vaccines in the control of diarrhea in calves in Brazil. **Revue d'Élevage et de Médecine Veterinaire des Pays Tropicaux**, v. 48, p. 239-243, 1995.

ÁVILA, F. A.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P., QUINTANA, J. L.; BASSO, A.; AMBROSIM, J. A. Utilização de probiótico e vacina no controle de diarreia em suínos causada por *Escherichia coli* enterotoxigênica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 50, p. 505-511, 1998.

ÁVILA, F. A., PAULILLO, A. C., SCHOCKEN-ITURRINO, R. P., LUCAS, F. A., ORGAZ, A., QUINTANA, J. L. Avaliação da eficiência de um probiótico no controle de diarreia e no ganho de peso de bezerros. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, p. 41-46, 2000.

BIOMERIEUX, LAB PLUS. **Software version 4.0**. Disponível em: <apiweb.biomerieux.com>. Acesso em: 30 set. 2012.

BENESI, F.J. Síndrome diarreia dos bezerros. **Revista CRMV-ES**, v. 2, p.10-13, 1999.

BERGEN, W. G.; BATES, D. B. Ionophores: their effect on production efficiency and mode of action. **Journal of Animal Science**, v. 58. p. 1465, 1984.

BLACKBURN, P.; POLAK, J.; GUSIK, S. A.; RUBINO, S. D. **Nisin Composition for use as enhanced broad range bactericides**. International Patent Application n. PCT/US89/02625; Int. Publ. WO89/12399. New York: Applied Microbiology, 1989.

BRIIZUELA, M. A. **Selección de cepas de bacterias ácido lácticas para la obtención de un preparado con propiedades probióticas y su evaluación en cerdos**. Tese (Doctorado) La Habana: Instituto Cubano de los Derivados de la Caña de Azúcar, ICIDCA, Facultad de Ciencias Veterinarias, 2003.

BUZINARO, M. G.; MISTIERI, M. L. A.; CARVALHO, A. A. B.; SAMARA S. I.; REGITANO L. C. A.; JEREZ J. A. Prevalência de rotavírus do grupo A em fezes diarreicas de bezerros de corte em sistema semi-intensivo de produção. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, p. 266-270, 2003.

CASTRO, J. C. Uso de Aditivos e Probióticos em Rações Animais. In: FERREIRA, C. M.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; TEIXEIRA, P. C.; FRANÇA, F. M.; DIAS, D. C. I. Simpósio Brasileiro de Ranicultura e II Ciclo de Palestra Sobre Ranicultura do Instituto de Pesca. **Boletim Técnico do Instituto de Pesca, São Paulo**, v. 34, p. 12-18, 2003.

CHAVES, A. H.; SILVA, J. F. C.; SIGNOR, A.; CAMPOS, O. F.; FILHO S. C. V. Isolamento de *Lactobacillus acidophilus* a partir de fezes de bezerros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 28, p.1086-92, 1999.

COELHO, S. G; CARVALHO, A. U. **Criação de animais jovens**. In: Do Campus para o Campo: tecnologias para a produção de leite. NEIVA, A.C.G., NEIVA, J. M. N. Expressão Gráfica e Editora LTDA, Fortaleza, p.137-157, 2006.

COPPOLA, M. M.; TURNES, C. G. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, v. 34, p.1297-1303, 2004.

COUTINHO, A. S. Pneumonia de bezerros. **Revista Leite Integral**, p. 36-44, 2006.

DE ROISSART, H; LUQUET, F. M. **Bacteries lactiques Aspects Fondamentaux et Technologiques**. Ed. Loriga: France,1994.

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

DELGADO, S.; O'SULLIVAN, E.; MAYO, B. *In vitro* evaluation of the probiotic properties of human intestinal *Bifidobacterium* species selection of new probiotic candidates. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 104, p. 1119-1127, 2008.

EWASCHUK, J. B.; NAYLOR, J. M.; CHIRINO-TREJO, M.; ZELLO, G. A. *Lactobacillus rhamnosus* strain GG is a potential probiotic for calves. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 68, p. 249–253, 2004.

FAGAN, J. G.; DWYER P. J.; QUINLAN J. G. Factors that may affect the occurrence of enteropathogens in the feces of diarrheic calves in Ireland. **Irish Veterinary Journal**, v. 48, p.17-21, 1995.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). **Agriculture Data. Informações sobre exportações e importações de carne bovina**. 2001. (Banco de Dados). Disponível em: <www.fao.org>. Acesso em: 9 maio 2011.

FERNANDES, P. C. C.; LADEIRA, I. Q.; FERREIRA, C. L. L. F.; RODRIGUEZ, N. M.; SILVA, A. V. Viabilidade do uso de probióticos na alimentação de monogástricos. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, p. 53-71, 2000.

FERREIRA, C. L. L. F. **Grupo de bactérias lácticas – Caracterização e aplicação tecnológica de bactérias probióticas**. In: Prebióticos e Probióticos: Atualização e Prospecção. Viçosa: Célia L. L. F. Ferreira, p. 206, 2003.

OLIVEIRA FILHO, J. P.; SILVA, D. P. G.; PACHECO, M. D.; MASCARINI, L. M.; RIBEIRO, M. G.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F.; STIPP, D. T.; BARROS, B. J. P.; BORGES, A. S. Diarreia em bezerros da raça Nelore criados extensivamente: estudo clínico e etiológico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, p.19-424, 2007.

FIORAMONTI, J.; THEODOROU, V.; BUENO, L. Probiotics: What are they? What are their effects on gut physiology? **Best Practice; Research**, v.17, p. 711-724, 2003.

FONTES, F. A. P. V.; CARVALHO, A.U. Diarreias em bezerros. **Revista Leite Integral**, p. 22-27, 2006.

FRANCK, S. M.; BOSWORTH, B. T.; MOON, H. W. Multiplex PCR for Enterotoxigenic, Attaching and Effacing, and Shiga Toxin Producing *Escherichia coli* Strains from Calves. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, p. 1795-1797, 1998.

FRIZZO, L. S.; Soto, L. P.; Zbrun, M. V.; Signorini, M. L.; Bertozzi, E.; Sequeira, G.; Armesto, R. R.; Rosmini, M. R. Effect of lactic acid bacteria and lactose on growth performance and intestinal microbial balance of artificially reared calves. **Livestock Science**, v. 140, p. 246-252, 2011.

FUCHS, H. B. R.; TANAMATI, A. A. C.; ANTONIOLI, C. M.; GASPARELLO, E. A.; DONEDA, I. Utilização de *Lactobacillus casei* e cultura iniciadora na obtenção de iogurte suplementado com inulina e oligofrutose. **B CEPPRA**, v. 24, p. 83-98, 2006.

FULLER, R. The importance of lactobacilli in maintaining normal microbial balance in the crop. **British Poultry Science**, Abingdon, v.18, p. 85-94, 1977.

FULLER, R. Probiotics in man and animals: A review. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 66, p. 365-378, 1989.

FULLER, R. **Probiotics**: The Scientific Basis. Ed. London: Chapman; Hall, p. 398, 1992.

FULLER, R. **Probiotics 2**: applications and practical aspects. London: Chapman; Hall, p. 212, 1997.

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

GAASTRA, W.; GRAFF F. K. Host-specific fimbrial adhesins of noninvasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. **Microbiology Review**, v. 46, p. 129-61, 1982.

GAY, C. C.; BESSER, T. E. ***Escherichia coli* septicemia in calves**. In GYLES, C. L. *Escherichia coli* in domestic animals and humans. Wallingford, CAB International, p.75, 1994.

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

GILLILAND, S. E.; BRUCE, B. B.; BUSH, L. J.; STALEY, T. E. Comparisons of Two Strains of *Lactobacillus acidophilus* as Dietary Adjuncts for Young Calves. **Journal of Dairy Science**, v. 63, p. 964-972, 1980.

GILLILAND, S. E.; NELSON, C. R.; MAXWELL, C. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 49, p. 377-381, 1985.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos, e aplicações tecnológicas. **Biotecnologia Alimentar**, v. 64, p. 12-22, 1999.

GOMES, M. A. B. **Aditivos Probióticos, Prebióticos e Simbióticos na Alimentação Animal**. Disponível em: <www.mariboi.com.br/_assets/artigos/13_artigo.pdf, 2002>. Acesso em: 10 abr. 2011.

GULLIKSEN, S. M.; JOR, E.; LIE, K. I.; HAMNES, I. S.; LOKEN, T.; AKERSTEDT, J.; OSTERÅS, O. Enteropathogens and risk factors for diarrhea in Norwegian dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 5057–5066, 2009.

GUO, X. H.; KIM, J. M.; NAM, H. M.; PARK, S. Y.; KIM, J. M. Screening lactic acid bacteria from swine origins for multistrain probiotics based on in vitro functional properties. **Anaerobe**, Amsterdam, v. 16, p. 321-326, 2010.

HADAD, J. J.; GYLES, C. L. Scanning and transmission electron microscopic study of the small intestine of colostrums fed calves infected with selected strains of *E. coli*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 43, p. 41 - 49, 1982.

HAMDAN, I. Y.; MIKOLAJCIK, E. M. Growth, viability and antimicrobial activity of *Lactobacillus acidophilus*. **The Journal of Antibiotics**, v. 27, p. 631-636, 1974.

HAMES, J; VOGEL, M. **The genus *Lactobacillus***. In: WOOD, B.J.B. and HOLZAPFEL, W. H. *The Genera of Lactic Acid Bacteria*, v. 2. Ed. Chapman; Hall New York USA, p. 397, 1995.

JAY, J. M. **Modern Food Microbiology**. New York: Chapman; Hall, 1996.

JIN, L. Z.; MARQUARDT, R. R.; BAIDOO, S. K. Inhibition of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88, K99 and 987P by the *Lactobacillus* isolates from porcine intestine. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 619-624, 2000.

KABIR, S. M. L.; RAHMAN M. M.; RAHMAN M. B.; RAHMAN M. M.; AHMED S. U. The dynamics of probiotics on growth performance and immune response in broilers. **International Journal of Poultry Science**, v. 3, p. 361-364, 2004.

KANDLER, O.; WEISS, N. **Regular nonsporng Gram-positive rods**. In: SENAETH, P.H.A; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E.; HOLT J.G. (editors). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams and Wilkins, p.1234, 1986.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; PROCOP G. W.; WOODS G. L. **Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido**. 6. Ed., Ed. MEDSI, Rio de Janeiro, 2008.

KONSTANTINOV, S. R.; FAVIER, C. F.; ZHU, W. Y.; WILLIAMS, B. A.; KLUß, J.; SOUFFRANT, W. B.; VOS, W. M.; AKKERMANS, A. D. L.; SMIDT, H. Microbial diversity studies of the porcine gastrointestinal ecosystem during weaning transition. **Animal Research**, v. 53, p. 317–324. 2004.

LANGONI, H.; LINHARES, A. C.; AVILA, F. A.; DA SILVA, A. V.; ELIAS, A. O. Contribution to the study of diarrhea etiology in neonate dairy calves in São Paulo state, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, p. 313-319, 2004.

LEE, Y.; SALMINEN, S. The coming of age of probiotics. **Trends in Food Science; Technology**, v. 6, p. 241-244, 1995.

LEBEER, S.; VANDERLEYDEN, J.; DE KEERSMAECKER, S. C. J. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 72, p. 728 - 764, 2008.

LILLY, B. D. M.; STIWELL, R. H. Probiotics. Growth promoting factors produced for micro-organisms. **Science**, v. 147 p. 747-748, 1965.

LOZADA, A. E. El potencial de la manipulación de la flora intestinal por medios dietéticos sobre la salud humana. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 21, p.106-114, 2001.

MACFARLANE, G. T.; CUMMINGS, J. H. Probiotics, infection and immunity. **Current Opinion in Infectious Disease**, v.15, p. 501-506, 2002.

MAGALHÃES, H.; FREITAS, M. A.; GONÇALVES, W. M. Ocorrência, aspectos bacteriológicos e histopatológicos na colibacilose de bezerros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 29, p. 555-564, 1991.

MAGALHÃES, V. J. A.; SUSCA, F.; LIMA, F. S.; BRANCO, A. F.; YOON, I.; SANTOS, J. E. P. Effect of feeding yeast culture on performance, health, and immunocompetence of dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p.1497–1509, 2008.

MANGONI, J. **Potencial probiótico de lactobacilos de origem suína**. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual do oeste do Paraná, 2009.

MANTOVANI, H. C.; KAM, D. K.; HA, J. K.; RUSSEL, J. B. The antibacterial activity and sensitivity of *Streptococcus bovis* strains isolated from the rumen of cattle. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 37, p. 223-9, 2001.

MARTINS, A. D. O.; MENDONÇA, R. C. S.; SILVA, D. L.; RAMOS, M. S.; MAURO, M. C.; DONZELE J. L., ANDRADE, N. J. Resistência de bactérias lácticas, isoladas de fezes de suínos e sua capacidade antagônica frente a microrganismos indicadores. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v.5, n.1, p. 53-59, 2006.

MENDONÇA, C. L.; LAZARO, N. S.; CASTRO, R. S.; AFONSO, J. A. B.; HOFER, E. Occurrence of enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Salmonella* sp. in calves in the southern Agreste region of the state of Pernambuco, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 16, p.127-131, 1996.

MERRITT, M. E.; DONALDSON, J. R. Effect of bile salts on the DNA and membrane integrity of enteric bacteria. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, p. 1533 - 1541, 2009.

MOLL, G. N.; KONINGS, W. N.; DRIESSEN, A. J. Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 76, p.185-98, 1999.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, p. 109-122, 2006.

MORRELL, E. L.; MOORE, D. P.; ODEÓN, A. C.; POSO, M. A.; ODRIUZOLA, E.; CANTÓN, G.; PAOLICCHI, F.; MALENA, F.; LEUNDA, M. R.; MORSELLA, C.; CAMPERO, C. M. Retrospective study of bovine neonatal mortality: cases reported from INTA. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 2154–2165, 2008.

MOTA, R. A.; SILVA K. P. C.; RIBEIRO, T. C. F.; RAMOS, G. A. B.; LIMA, E. T.; SILVA, L. B. G.; ZÜNIGA, C. E. A. Eficácia do Nuflor no tratamento de diarreias em bezerros e leitões. **Hora Veterinária**, v. 118, p. 21-24, 2000.

MOTA, R. M. J. L. S.; MOREIRA, M. R.; SOUZA, M. F.; HORTA, S. M. R.; TEIXEIRA, E.; NEUMANN, J. R.; NICOLI; NUNES, A. C. Genetic transformation of novel isolates of chicken *Lactobacillus* bearing probiotic features for expression of heterologous proteins: a tool to develop live oral vaccines. **BMC Biotechnology**, v. 6, p. 1-11, 2006.

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

NOH, D. O.; GILLILAND, S. E. Influence of bile on cellular integrity and β -galactosidase activity of *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 1253-1259, 1993.

OGAWA, M.; SHIMIZU, K.; NOMOTO, K.; TANAKA, R.; HAMABATA, T.; YAMASAKI, S.; TAKEDA, T.; TAKEDA, Y. Inhibition of *in vitro* growth of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 by probiotic *Lactobacillus* strains due to production of lactic acid. **International Journal of Food Microbiology**, v. 68, p.135-140, 2001.

OK, M.; GÜLER, L.; TURGUT, K.; OK, Ü.; ŞEN, I.; GÜNDÜZ, I. K.; BİRDANE, M. F.; GÜZELBEKTEŞ, H. The studies on the aetiology of diarrhoea in neonatal calves and determination of virulence gene markers of *Escherichia coli* strains by multiplex PCR. **Zoonoses Public Health**, Berlin, v. 56, p. 94-101, 2009.

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

PENNACCHIA, C.; ERCOLINI, D.; BLAIOTTA, G.; PEPE, O.; MAURIELLO, G.; VILLANI, F. Selection of *Lactobacillus* strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. **Meat Science**, v. 67, p. 309-317, 2004.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. Ed. São Paulo: Makron Books, 1997.

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

PIARD, J. C.; DESMAZEAUD, M. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. Oxygen metabolites and catabolism and products. **Lait**, v. 71, p. 525-541, 1991.

RAMÍREZ, C. **Uso de bactérias lácticas probióticas na alimentação de camarões *Litopenaeus vannamei* como inibidoras de microrganismos patogênicos e estimulantes do sistema imune**. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos). Curitiba: Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, 2005.

REQUENA, T.; PELÁEZ, C. Revisión: Actividad antimicrobiana de bacterias lácticas. Producción de bacteriocinas. **Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos**, v. 35, p. 19 - 44, 1995.

ROBINSON, R. Therapeutics properties of fermented milks. **Elsevier**, p. 185, 1991.

ROSTAGNO, H. S.; TAVERNARI, F. C.; NOGUEIRA, E. T.; ALBINO, L. F. T. **Probióticos e Prebióticos na Alimentação de Aves**. In: Célia L. L. Ferreira. (Org.). Probióticos e Prebióticos: Atualização e Protecção. 2. Ed. Rio de Janeiro - RJ: Rubio, p. 195-212, 2012.

RUSSEL, J. B.; MANTOVANI, H. C. The bacteriocins of ruminal bacteria and their potential as an alternative antibiotics. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 4, p. 347-55, 2002.

RYCKE, J.; GUILLOT, J. F.; BOIVIN, R. Cytotoxins in Non-Enterotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolat from feces of diarrheic calves. **Veterinary Microbiology**, v. 15, p. 137-150, 1987.

SALMINEM, S. Clinical applications of probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 563-572, 1998.

SALVADORI, M. R.; VALADARES, G. F.; LEITE D. S.; BLANCO, J.; YANO, T. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 230-235, 2003.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, 2. Ed p. 265, 2002.

SANDERS, M. E. Probiotics: considerations for human health. **Nutrition Reviews**, New York, v. 61, p. 91-99, 2003.

SANTOS, J. R. G.; TURNES, C. G. Probióticos em Avicultura. **Ciência Rural**, v. 35, p. 741-747, 2005.

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

SARKAR, P. K.; BANERJEE, S. Antibacterial activity of lactic acid bacterial isolates obtained from natural habitats. **Journal Food Science Technology**, v. 33, p. 231 233, 1996.

SIUTA, A. Effectiveness of the activity of probiotic product "Cytzyme" in feeding young beef cattle. Part. 2. Evaluation of the usefulness of "Cytzyme" in feeding of young beff cattle. **Acta Agraria Silvestria**, v. 29, p. 135-145, 1991.

SMITH, H. W.; HALLS, S. Studies on *Escherichia coli* enterotoxin. **Journal of Pathology & Bacteriology**, v. 93, p. 531-543, 1967.

SMITH, H. W.; LINGGOOD, M. A. Further observation on *Escherichia coli* enterotoxins with particular regard to those produced by atypical piglet strains and calf and lamb strains: the transmissible nature of these enterotoxins and of a k antigen possessed by calf and lab strains. **Journal of Medical Microbiology**, v. 5, p. 243-250, 1972.

SMITH, H. W.; HUGGINS, M. B. The influence of plasmid determined and other characteristics of enteropathogenic *Escherichia coli* on their ability to proliferate in the alimentary tract of piglets, calves and labs. **Journal of Medical Microbiology**, v. 11, p. 471-492, 1978.

SMYTH, C. J.; MARRON, M.; SMITH, S. G. J. Fimbriae of *Escherichia coli*. In: Gyles, C.L. (Ed.), *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans, **CAB International**, Wallingford, p. 399, 1994.

STAMER, J. R. The lactic acid bacteria: microbes of diversity. **Food Technology**, v. 33, p. 60-65, 1979.

TANNOCK, G. W. **The normal microflora**: an introduction. Ed. Medical importance of normal microflora. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p. 1-23, 1999.

TAGG, J. R.; MC GIVEN, A. R. Assay sistem for bacteriocins. **Applied Microbiology**, v. 21, p. 943. 1971.

TSENG, C. H.; MONTVILLE, T. J. Metabolic regulation and distribution in *Lactobacillus*. Causes and consequences. **Biotechnology**. v. 9, p. 113-121, 1993.

TORSEIN, M.; LINDBERG, A.; SANDGREN, C. H.; WALLER, K. P.; TÖRNQUIST, M.; SVENSSON, C. Risk factors for calf mortality in large Swedish dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 99, p. 136-47 2011.

VASCONCELLOS, C. H. F.; FONTES, D. O.; CORRÊA, G. S. S; SILVA, M. A. Probióticos, prebióticos e simbióticos na alimentação de suínos. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, v. 53, p. 77-85, 2007.

VASSALO, M.; FIALHO, E. T.; OLIVEIRA, A. I. G. Probióticos para leitões dos 10 aos 30 Kg de peso vivo. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 26, p. 131-138, 1997.

WITTUM, T. E.; SALMAN, M. D.; OODDE, K. G.; MORTIMER, R. G.; KING, M. E. Causes and costs of calf mortality in Colorado beef herds participating the National Animal Health monitoring System. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 203, p. 232-235, 1993.

WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. H. Eds. The genera of lactic acid bacteria. **Aspen Publishers Gaithersburg**, p. 398, 1995.

**ANEXO – Certificado do CETEA/UFMG relativo ao projeto
“Caracterização de *Lactobacillus* spp. isolados de bovinos nelore (*Bos indicus*) com potencial probiótico sobre *Escherichia Coli*.”**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 219/2011**, relativo ao projeto intitulado **“Caracterização de *Lactobacillus SPP* isolados de bovinos nelore (*Bos Indicus*) com potencial probiótico sobre *Escherichia Coli*.”**, que tem como responsável(is) **Igor Viana Brandi**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **19/ 10/2011**.

Este certificado expira-se em **19/ 10/ 2016**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 219/2011**, related to the project entitled **“Characterization of isolated *Lactobacillus SPP* of nelore (*Bos Indicus*) potential probiotic on *Escherichia Coli*”**, under the supervisors of **Igor Viana Brandi**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **October 19, 2011**.

This certificate expires in **October 19, 2016**.

Belo Horizonte, 21 de Outubro de 2011.

Profª. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br